

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI

CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

“Ottimizzazione dell’utilizzo di *Yarrowia lipolytica* come co-starter per la produzione di formaggi”

Tesi in

29588 Microbiologia avanzata e predittiva (c.i.) – 29594 Microbiologia delle fermentazioni

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Rosalba Lanciotti

Candidato:

Lorenzo Magalotti

Correlatori:

Dott. Lorenzo Siroli

Dott. Davide Gottardi

Matricola N° 884602

Anno Accademico / 2019-2020

Sessione unica

Sommario

1. INTRODUZIONE.....	4
1.1 Settore lattiero caseario	4
1.1.1. Mercato del settore lattiero-caseario	4
1.2. Formaggio	5
1.2.1. Processi produttivi.....	5
1.2.2. Parmigiano Reggiano	7
1.2.3. Pecorino Romano	7
1.2.4. Fontina.....	8
1.2.5. Montasio.....	8
1.2.6. Formaggio di Fossa	8
1.2.7. Caciotta.....	9
1.3. Classificazione.....	9
1.4. Ruolo dei microorganismi nella produzione di formaggio	13
1.4.1. Starter e co-starter	13
1.4.2. Batteri lattici	15
1.4.3. Lieviti.....	16
1.4.4. Muffe	17
1.5. Fattori di rischio.....	20
1.5.1. Rischio microbiologico.....	20
1.5.2. Rimedi utilizzati per contenere il rischio biologico:.....	22
2. <i>YARROWIA LIPOLYTICA</i>	24
2.1. Tassonomia e genetica	24
2.2. Biologia della cellula	25
2.3. Condizioni culturali e substrati di crescita.....	26
2.4. Metaboliti di interesse industriale	26
2.4.1. SCO	26
2.4.2. Acidi organici	27
2.4.3. Polialcoli.....	28
2.5. Ruolo tecnologico: applicazione di <i>Y. lipolytica</i> nel settore caseario.....	29
2.6. Svantaggi nell'uso di <i>Yarrowia lipolytica</i> nei formaggi.....	31
3. MATERIALI E METODI	33
3.1. Microrganismi utilizzati	33
3.2. Prova preliminare	33
3.2.1. Tipo di trattamento superficiale.....	33

3.2.2. Tempo e momento di trattamento	34
3.3. Trattamento con <i>Y. lipolytica</i> e microcovering.....	34
3.3.1. Effetto del microcovering su <i>Y. lipolytica</i>	34
3.4. Prova su scala semi-industriale	35
3.5. Campionamento microbiologico	35
3.5.1. Lieviti.....	36
3.5.2. Batteri lattici	36
3.5.3. Positività a <i>Listeria monocytogenes</i>	36
3.6 Analisi dei composti volatili	36
3.6.1. Acidi grassi liberi.....	37
4. OBIETTIVI	38
5. RISULTATI.....	39
5.1. Tipo di trattamento superficiale.....	39
5.2. Tempo e momento di trattamento	39
5.3. <i>Yarrowia</i> con o senza microcovering.....	40
5.4. Effetti del microcovering su diversi ceppi di <i>Yarrowia</i>	42
5.5. Prova su scala semi-industriale	42
6. CONCLUSIONI	45
7. BIBLIOGRAFIA	46
7.1. Sitografia.....	50

1. INTRODUZIONE

Il settore lattiero caseario è il primo settore alimentare italiano che da solo vale più del 12% del fatturato complessivo del food nazionale. Il valore della produzione supera i 14.5 miliardi di euro, con una produzione annua di un milione di tonnellate di formaggi (Assolatte). Tuttavia, la richiesta di innovazione, miglioramento, diversificazione e personalizzazione della qualità dei formaggi è aumentata notevolmente negli ultimi anni, anche a seguito delle richieste dei consumatori. Oltre ad ottenere prodotti con spiccate qualità nutrizionali (abbassamento della concentrazione del sale e dei grassi), l'implementazione del processo produttivo rappresenta un aspetto importante. Infatti, una continua ricerca di nuovi ingredienti, ceppi microbici starter e co-starter, e nuovi metodi di lavorazione hanno un ruolo fondamentale per il miglioramento di sapore, consistenza, sicurezza, conservabilità, e maturazione dei formaggi.

1.1 Settore lattiero caseario

1.1.1. Mercato del settore lattiero-caseario

Nel 2017 gli Stati membri dell'Unione Europea (UE) hanno utilizzato 17.4 milioni di tonnellate di latte scremato e 58.1 milioni di tonnellate di latte intero per produrre 10.2 milioni di tonnellate di formaggio. Di queste, oltre il 90% sono state prodotte da puro latte vaccino, mentre il 2% da latte di pecora o puro latte di capra. Il formaggio fresco rappresentava la quota maggiore della produzione totale di formaggio dell'UE (34%, o 3.5 milioni di tonnellate di formaggio), seguito da formaggio a pasta media (26%, o 2.7 milioni di tonnellate) e formaggio a pasta dura (19%, o 1.9 milioni di tonnellate). Tra gli Stati membri dell'UE, la Germania ha prodotto la maggior parte dei formaggi (2.2 milioni di tonnellate, pari al 22% del totale dell'UE), seguita da Francia (1.9 milioni di tonnellate, o 19%) e Italia (1.3 milioni di tonnellate, o 12%). Questi tre Stati, assieme a Paesi Bassi e Polonia costituiscono il 70% dell'intera produzione di formaggio nell'UE (Eurostat, 2019). Nel 2017, quasi 5.2 milioni di tonnellate di formaggio, per un valore di 20.8 miliardi di euro, sono stati esportati dagli Stati membri principalmente (4.4 milioni di tonnellate) all'interno dell'UE. La Germania è stato il principale esportatore di formaggio (1.2 milioni di tonnellate, pari al 23% delle esportazioni totali degli Stati membri dell'UE), seguita dai Paesi Bassi (0.9 milioni di tonnellate, 17%) e dalla Francia (0.7 milioni di tonnellate, 13%). 830 mila tonnellate di formaggio, invece, sono state esportate in paesi non UE. Di queste, il 17% (140 mila tonnellate) sono andate agli Stati Uniti, l'11% al Giappone (95 mila tonnellate), il 7% alla Svizzera (60 mila tonnellate), il 5% alla Corea del Sud (45 mila tonnellate) e, circa il 5% all'Arabia Saudita (40 mila tonnellate). Per quanto riguarda l'import extra UE, nel 2017 l'UE ha importato circa l'87% dei formaggi dalla Svizzera (52 mila tonnellate), seguita da Nuova Zelanda (2 mila tonnellate, 4%) e Norvegia (circa 2 mila tonnellate, 3%) (Eurostat, 2019). L'Italia rappresenta il terzo produttore europeo di formaggi (11%) e il quarto a livello mondiale (6%). Nel 2014, l'Italia ha prodotto oltre 11 milioni di tonnellate di latte e 1 milione di tonnellate di formaggio. L'industria lattiero-casearia italiana si basa sulla produzione di formaggio. Circa il 25% della produzione casearia italiana esistente possiede la Denominazione di Origine Protetta (DOP). Il formaggio DOP è ottenuto con latte prodotto in specifiche zone del territorio e segue un processo di produzione con specifiche molto rigorose. Circa il 51% di tutto il latte italiano (50% mucca, 80% pecora e capra, 78% bufala) viene utilizzato per produrre formaggio DOP. Nel 2014, in Italia, il formaggio DOP prodotto con latte vaccino ha raggiunto le 433 mila tonnellate, cioè il 44% del mercato dei formaggi di latte vaccino (Dalla Riva et al., 2017).

1.2. Formaggio

Il formaggio è un alimento dalle origini molto antiche e rappresenta una delle prime trasformazioni biotecnologiche adoperate da parte dell'uomo. Dal punto di vista legislativo (*R.D. 15-10-1925 n.2033*) il nome "Formaggio" è riservato solamente al prodotto ottenuto da latte intero, parzialmente scremato o scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti o cloruro di sodio". Nel *Codex Alimentarius* questa definizione viene implementata facendo riferimento ad aspetti tecnologici. Infatti, il formaggio viene definito come prodotto fresco o stagionato, solido o semisolido, che si ottiene per coagulazione di latte intero, latte scremato, latte parzialmente scremato, crema, crema di siero o di latticello, soli o in combinazione, e per cessione parziale di siero. Il formaggio è quindi il risultato di tutta una serie di processi tecnologici (attività enzimatica, microbica, condizioni di maturazione) che si sommano e che vanno a definire il processo finale.

1.2.1. Processi produttivi

Nel processo di trasformazione del latte in formaggio (Fig. 1) si possono distinguere diverse fasi, alcune comuni a tutte le tipologie di formaggio, altre più specifiche per ogni prodotto.

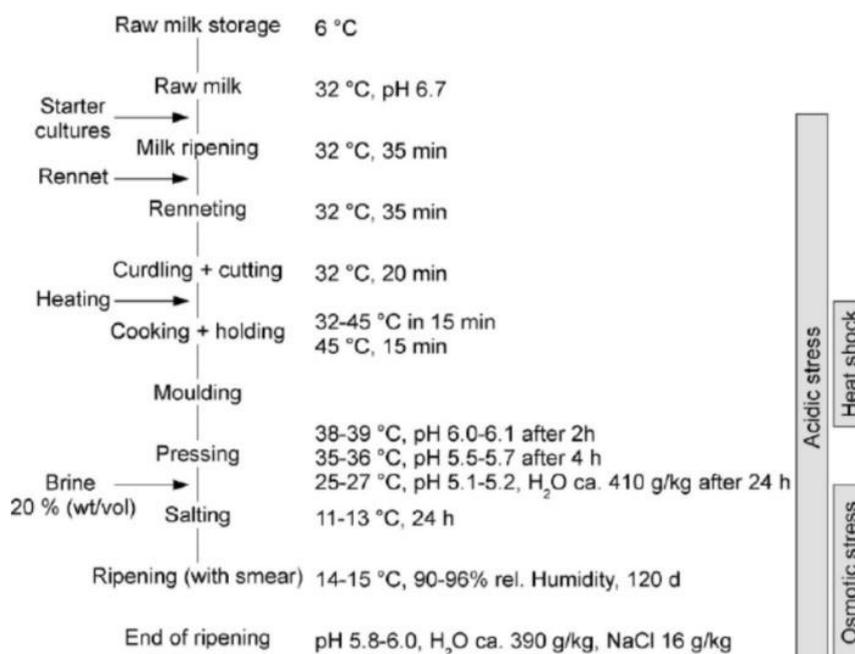


Fig. 1: Schema riassuntivo della produzione di un formaggio tipico a pasta semidura con cottura a 45°C (Peng, et al., 2011).

Per prima cosa, la caseificazione prevede tutta una serie di operazioni per la preparazione del latte, che può essere sottoposto a standardizzazione a titolo di grasso e/o ad eventuali trattamenti termici, come termizzazione o pastorizzazione. In un secondo momento, avviene la coagulazione del latte, che passa dalla forma liquida a una consistenza semisolida e quasi gelatinosa per azione del caglio e di batteri lattici. Dopodiché, si susseguono quelle attività che permettono alla cagliata di raggiungere la giusta composizione, ossia il livello più adatto di umidità e di salatura. Infine, si passa alla stagionatura e che rappresenta il vero momento di trasformazione della cagliata in formaggio.

La stagionatura è una fase molto delicata nella produzione del formaggio, dal momento che è quella in cui hanno luogo tutti i processi biochimici di trasformazione dei costituenti del latte, che

conferiscono al prodotto finale l'aspetto, la consistenza, il sapore e il profumo che li caratterizza. Ovviamente, l'intensità e la durata del periodo di maturazione variano a seconda delle diverse tipologie di formaggio, ma, in linea generale, le reazioni che trasformano la cagliata sono agevolate dalla presenza di enzimi che possono agire al meglio solo in determinate condizioni. Vi sono tre eventi principali che caratterizzano la stagionatura: la fermentazione lattica, la proteolisi e la lipolisi. Durante la caseificazione, il lattosio si trasforma per lo più in acido lattico e l'acidificazione, iniziata in caldaia o durante la formatura, si completa durante la stufatura in camera calda. Anche se il 90% dei carboidrati del latte vengono rilasciati nel siero, la cagliata messa nello stampo può contenere ancora fino all'1.5% di zuccheri, principalmente lattosio. Generalmente continua ad essere consumato dai batteri lattici, tuttavia, se vi sono batteri che non utilizzano il galattosio, tale zucchero potrà contribuire nel formaggio maturo alla fermentazione propionica (quella che provoca l'aspetto lucido dell'Emmental) o alla fermentazione butirrica (che causa un gonfiore tardivo nei formaggi dalla lunga stagionatura). La proteolisi, invece, indica un insieme di trasformazioni della caseina per azione di complessi enzimatici che concorrono alla formazione della struttura del formaggio, al rilascio di componenti sapide durante la masticazione e alla modificazione della consistenza e del pH della pasta. Infatti, durante proteolisi si ha il rilascio di ammoniaca e anidride carbonica. Infine, la lipolisi è un processo metabolico di scissione dei trigliceridi con conseguente liberazione di acidi grassi liberi. Tale reazione ha un ruolo molto importante nella determinazione del gusto e dell'aroma del formaggio. Nella maggior parte dei casi viene vista come un fenomeno negativo, che conferisce al prodotto un profumo particolarmente forte e intenso, ma nella cultura casearia italiana è considerato un evento gradito, se ben controllato, come nel caso dei formaggi duri a base di latte di pecora e di alcuni erborinati come il gorgonzola. Questi processi agiranno in modo più o meno efficiente in base alle condizioni di temperatura, umidità relativa (UR), ventilazione e durata della stagionatura. In tale modo si ottengono quelle caratteristiche che rendono tipico ogni formaggio. Ad esempio, con una stagionatura di oltre 9 mesi, a temperature superiori a 12 °C e con umidità relativa inferiore al 90% si ottengono formaggi a crosta compatta e resistente (es. Grana); invece, con una maturazione di 60 giorni, a temperature di 2-8°C ed umidità relativa al 90% si impedisce la formazione di una crosta troppo spessa nei formaggi a pasta molle (Assolatte).

Pertanto, la composizione chimica e le caratteristiche organolettiche dei formaggi variano lungo tutto l'arco del processo produttivo fino a raggiungere un livello qualitativo ottimale per poi decadere più o meno lentamente. Oltre agli aspetti microbiologici, la variabilità dei metodi di lavorazione e stagionatura influenzano sia la composizione chimica del formaggio fresco che il suo potenziale enzimatico durante la maturazione. I fattori fondamentali della caseificazione includono: il metodo di coagulazione utilizzato per trasformare il latte di caseificazione originale in un coagulo (ad esempio acido piuttosto che enzimatico); i parametri di acidificazione (es. velocità e tempo) dalla formazione del coagulo fino alla lavorazione del formaggio fresco, che definiscono il grado di mineralizzazione della caseina ma anche la perdita di umidità. E, infine, le fasi aggiuntive durante il processo di produzione del formaggio per controllare i livelli di umidità del formaggio giovane (ad esempio temperatura di cottura, condizioni di pressatura e salatura). Inoltre, nel caso dei formaggi stagionati, è importante considerare le caratteristiche delle condizioni di maturazione (temperatura, umidità relativa e tassi di O₂, CO₂ e NH₃) che in ultima analisi influenzano il carattere e la diversità delle microflora del formaggio, (Almena-Aliste e Mietton, 2014).

Le specifiche variazioni nei processi lavorativi determinano la creazione di prodotti tradizionali e locali con caratteristiche uniche. Di seguito verranno presi in esame i processi produttivi di alcuni tra i formaggi italiani più rinomati e consumati.

1.2.2. Parmigiano Reggiano

Uno dei più importanti formaggi di produzione italiana, per consumo interno ed esportazione, è il Parmigiano Reggiano, un prodotto DOP a pasta dura, cotto e di lunga stagionatura, ottenuto da latte crudo, seguendo un rigoroso procedimento di fabbricazione. Nel caso del formaggio a latte crudo, la qualità del latte, in termini di composizione chimica e caratteristiche microbiche, è uno dei principali fattori che influenzano l'efficienza del processo di caseificazione. Tale formaggio è prodotto con il metodo approvato dal Consorzio di riferimento ed appartenenza. In un primo step, al latte viene aggiunta una coltura starter di siero di latte naturale (circa 2.5–3 L per ogni 100 kg di latte), ottenuta per acidificazione spontanea del siero del giorno precedente (siero innesto). Viene quindi riscaldato a 33 °C e fatto coagulare mediante aggiunta di caglio di vitello (2.5 g/100 kg di latte). La coagulazione richiede circa 10-12 minuti, dopo la quale la cagliata formatasi viene spezzettata in piccoli granuli (circa le dimensioni di un chicco di riso) e cotta. Infatti, la temperatura viene aumentata a 55 °C e mantenuta costante per 10-15 minuti. In questa fase la cagliata viene agitata continuamente. Finita la cottura, che è servita a far perdere umidità ai granuli di cagliata, la cagliata viene fatta riposare per 45-60 minuti in modo tale da far depositare le particelle sul fondo della caldaia, così che si aggregano e amalgamano spontaneamente. La massa di formaggio viene, quindi, estratta dalla vasca con teli di lino, divisa in due parti, e posta in apposite forme chiamate “fascere” per due giorni. Durante questo periodo le forme di formaggio vengono raffreddate naturalmente e periodicamente ribaltate per consentire un'essiccazione omogenea. Nello stesso arco di tempo, il pH scenderà da circa 6.0 (all'estrazione dalla vasca) a circa 5.1 per azione dei batteri lattici, aggiunti come starter naturali tramite il siero innesto, che consumano lattosio e rilasciano acido lattico. Le forme di formaggio sono poi poste in una salamoia satura, per un periodo di 20–25 giorni. Infine, si procede con la fase di stagionatura (12-24 mesi), al termine della quale le forme di formaggio avranno una forma cilindrica, con un lato leggermente convesso, un'altezza di 22-24 cm, un diametro di 40–45 cm ed un peso di 35-36 kg (Franceschi et al., 2019).

1.2.3. Pecorino Romano

Il Pecorino Romano è un formaggio DOP a pasta dura semicotta, prodotto su scala industriale. La Sardegna è il più grande produttore di latte e formaggi di pecora italiani. In particolare, è la regione con la maggiore quantità di latte di pecora raccolto annualmente, che rappresenta circa il 70% della totalità della produzione italiana. La maggior parte di questo latte rappresenta la materia prima per la produzione del Pecorino Romano, ovvero il latticino italiano più conosciuto ottenuto da latte ovino e uno dei formaggi italiani più esportati nel mondo.

Osservando nello specifico il processo di produzione, secondo la relativa specifica DOP, il latte intero di pecora viene solitamente termizzato a una temperatura di 68 °C per almeno 15 secondi e raffreddato alla temperatura di coagulazione (37–39 °C). Successivamente viene inoculato con una coltura starter naturale (scotta-innesto) ottenuta dalla fermentazione del siero di latte residuo proveniente dalla lavorazione della ricotta. Il latte viene coagulato mediante aggiunta di caglio in pasta di agnello, ottenuto da animali allevati localmente. Il caglio in pasta contiene una quantità equilibrata di enzimi coagulanti e ad azione lipolitica. In questo modo, durante la stagionatura del formaggio, vengono rilasciati acidi grassi liberi (FFA). Dopo coagulazione, il coagulo viene tagliato in piccoli granuli (circa 2-4 mm di dimensione) e la cagliata viene agitata per 10 minuti e cotta a 45-46 °C. Successivamente, viene trasferita in una vasca di scolo, pressata, tagliata in blocchi, modellata e marchiata. Il Pecorino Romano viene poi salato a secco per 4-5 volte in locali con una temperatura di 10-12 °C, per un periodo di circa settanta giorni. La stagionatura minima è di cinque mesi per il formaggio da tavola, mentre per il formaggio grattugiato è di otto (Addis et al., 2015).

1.2.4. Fontina

Esplorando le produzioni tradizionali italiane dell'estremo Nord-Ovest, la Fontina è un prodotto di grande importanza. Il nome "Fontina" designa un formaggio italiano DOP semicotto, naturalmente acido, prodotto utilizzando latte crudo intero di una sola mungitura. La lavorazione avviene entro due ore dalla mungitura. Il latte vaccino non viene raffreddato prima della produzione, viene riscaldato delicatamente a 37 °C per la coagulazione e cotto a 47–48 °C prima dello stampaggio. La Fontina viene prodotta utilizzando esclusivamente il latte di vacche appartenenti alle razze valdostane (Valdostana Pezzata Rossa e Valdostana Pezzata Nera). Le vacche vengono alimentate prevalentemente con fieno locale, a parte d'estate in cui viene impiegato foraggio fresco dato che la produzione estiva viene effettuata direttamente sugli alpeggi d'alta quota. Le fontine seguono una stagionatura che va da tre a sei mesi a 8-11 °C e in ambienti con un'elevata umidità relativa (90-98%). Il maggior contenuto di carotene nei foraggi verdi conferisce un colore più giallo alle produzioni estive, che sono poi consumate da dicembre a giugno. La lavorazione della Fontina avviene in tutta la Regione Autonoma della Valle d'Aosta, situata nell'Italia nord-occidentale, secondo il disciplinare di produzione DOP (DPR 30 ottobre 1955-GURI n. 295 del 22 dicembre 1995) elencato nel "Registro delle denominazioni di origine e delle indicazioni geografiche protette" (regolamento CE 1107/96). Nei formaggi a latte crudo, il contributo da parte della microflora fermentativa autoctona all'aroma è preponderante e quindi per la caseificazione viene utilizzata solo una specifica combinazione batterica di ceppi lattici starter, isolati nella regione Valle d'Aosta e reperibili presso il consorzio produttori (Disciplinare Fontina DOP). In generale, quando nei formaggi non sono aggiunti fermenti lattici, in quanto non obbligatorio, come per la Fontina, la microflora microbica presente deriva dal latte crudo utilizzato ed è specifica della zona geografica di produzione. Pertanto, risulta fondamentale conoscere i principali microrganismi che contribuiscono alla produzione di formaggi DOP. Questo tipo di conoscenza può rivelarsi essenziale se si vuole garantire caratteristiche di qualità del prodotto, autenticità e tracciabilità lungo l'intera catena di produzione (Giannino et al., 2009).

1.2.5. Montasio

Il formaggio Montasio è un formaggio DOP, semiduro, prodotto nel Nord-Est Italia da latte vaccino, crudo o termizzato, utilizzando colture starter naturali. Tali starter termofili vengono prodotti mediante incubazione del latte termizzato (63 °C per 20 minuti) a 44 °C per 18-20 ore. I formaggi sono prodotti giornalmente da latte misto crudo che, dopo mungitura, viene sottoposto a fermentazione, con un innesto di fermenti lattici poco acidi, e successiva pastorizzazione a basse temperature. La cagliata viene trattata con uno strumento particolare, detto lira. Infine, la pasta viene estratta e fatta spurgare dal siero prima di essere pressata e riposta nelle fascere che imprimono nello scalzo il nome Montasio. Ogni forma viene poi contrassegnata con la data di produzione, salata, in salamoia o a secco, e stagionata per almeno due mesi (Marino et al., 2003). Il Montasio DOP si presenta con una forma cilindrica dal diametro di 30-35 cm, uno scalzo di circa 8 cm e un peso che può variare dai 6 agli 8 kg. La crosta del Montasio fresco è sottile e liscia, dal colore paglierino, mentre diventa sempre più dura e dal colore più intenso con il procedere della stagionatura. Anche la pasta, che nel Montasio fresco è compatta, di consistenza semidura e untuosa, dal colore bianco, cambia con la stagionatura diventando sempre più dura e friabile. Si tratta di un formaggio grasso, dal sapore delicato e sempre più intenso fino al piccante nel Montasio Stravecchio (Assolatte).

1.2.6. Formaggio di Fossa

Il formaggio di Fossa è un prodotto tipico delle regioni Emilia-Romagna e Marche, ma anche di alcune altre aree del centro Italia. La produzione di formaggio di fossa è aumentata negli ultimi dieci anni, da circa 120 tonnellate a 200 tonnellate, per soddisfare la domanda del mercato transalpino. Il

formaggio di Fossa si differenzia notevolmente dai formaggi stagionati in fabbrica per durezza, umidità e sapore. Il suo colore varia dal giallo paglierino al marrone chiaro ed è limpido, morbido, friabile e con un sapore dolce, talvolta un po' piccante. La sua superficie può essere caratterizzata dalla presenza di piccole zone ricoperte da colonie di muffe, facilmente asportabili mediante leggera raschiatura prima della commercializzazione. Il protocollo per la preparazione (miscela di latte e starter batterico), lavorazione e stagionatura del formaggio di Fossa è descritto nel disciplinare specifico. In breve, il formaggio è ottenuto da una miscela di latte vaccino pastorizzato (massimo 80%) e di pecora (minimo 20%). Viene quindi maturato nel caseificio per un periodo non inferiore a sessanta giorni a 6–14 °C e 75–92% di umidità relativa (RH). Infine, il formaggio viene stagionato sottoterra in una fossa per tre mesi. Le fosse sono scavate nelle rocce di tufo e vengono preparate secondo tradizione, utilizzando materiali naturali. Per prima cosa si puliscono e si asciugano con un fuoco di paglia e rametti secchi. Quindi le pareti sono ricoperte da una struttura in legno e canne e rivestita di paglia. Solo allora le fosse vengono riempite di formaggi e chiuse ermeticamente per evitare che aria e luce solare entrino nell'ambiente. All'interno la temperatura rimane costante, tra i 17 ed i 25 °C, durante tutti i tre mesi di stagionatura, mentre l'umidità relativa sale dall'80% al 95% nelle prime ventiquattro ore per poi rimanere stabile per tutto il periodo di maturazione. Le condizioni ambientali della fossa sono responsabili dell'elevato livello di attività enzimatica che porta ad un'elevata concentrazione di aminoacidi liberi e ad un elevato livello di esteri tra i composti organici volatili. Inoltre, questo ambiente favorisce lo sviluppo superficiale della microflora fungina, composta principalmente dai generi *Penicillium* e *Aspergillus* (Barbieri et al., 2012).

1.2.7. Caciotta

Uno dei formaggi più antichi prodotti nel centro Italia è la **Caciotta**. Con una produzione annua di circa 23 mila tonnellate, tale formaggio richiede l'impiego di latte vaccino pastorizzato (a volte con una miscela di latte vaccino e di pecora) e l'utilizzo di starter termofili. La maturazione dura circa 15 giorni per la varietà fresca o più spesso per due mesi per la varietà invecchiata (sostanza secca circa 60%). La salatura può avvenire a secco o in salamoia. I formaggi sono di forma cilindrica (4–8 cm di altezza e 8–16 cm di diametro) e pesano 0.8–2.0 kg. La crosta della varietà invecchiata è sottile e gialla. Difetti occasionali per la varietà invecchiata sono sapori soffici e spenti che sono, rispettivamente, attribuiti a fermentazioni incontrollate e all'accumulo di oligopeptidi amari. La maturazione della Caciotta stagionata con l'aggiunta di lattobacilli mesofili selezionati può abbreviare i tempi di maturazione, prevenire eventuali difetti e garantire proprietà sensoriali più consistenti (Di Cagno et al., 2011).

1.3. Classificazione

La diversità e la complessità delle varietà di formaggio rendono complessa la loro classificazione e caratterizzazione. La maggior parte dei sistemi di classificazione classici si basa esclusivamente su uno dei seguenti criteri: proprietà tessiturali (consistenza), tipo di latte, metodo di coagulazione, temperatura di cottura, composizione del formaggio e agente di maturazione caratteristico.

Tuttavia, pochi modelli di classificazione si basano su approcci integrativi che mostrano un quadro più accurato della diversità del formaggio e della differenziazione tra le molte varietà. Inoltre, una valutazione internazionale dei sistemi di classificazione da parte delle famiglie indica anche due approcci principali ma diversi, che in alcuni casi possono essere fonte di confusione. L'approccio "europeo" (utilizzato principalmente in Francia e nell'Europa meridionale) utilizza i processi tecnologici come criteri di classificazione, mentre il modello di classificazione "anglosassone" si basa principalmente sulle proprietà tessiturali (compattezza). Pochissimi studi hanno analizzato ed evidenziato l'interesse e l'importanza di utilizzare un approccio globale per la classificazione e

caratterizzazione di diversi formaggi. La classificazione di Lenoir propone un modello per raggiungere tale obiettivo di armonizzazione (Almena-Aliste e Mietton, 2014).

La classificazione proposta (Fig. 2), mostra come la diversità dei formaggi francesi si basa sulle tre fasi chiave di lavorazione: coagulazione, drenaggio e maturazione. Tali fasi definiscono il tipo di tecnologia e le caratteristiche chimiche di ciascuna varietà di formaggio. Tuttavia, le tre fasi sono interconnesse. Ad esempio, il tipo di coagulazione utilizzato per coagulare il latte (ad esempio, tipo lattico rispetto a tipo enzimatico o caglio) modella le caratteristiche del gel in termini di struttura, compattezza e coesione. Per drenare l'umidità dal gel risultante, tecniche specifiche possono includere azioni meccaniche (es. taglio e rimescolamento della cagliata e condizioni di pressatura) che possono essere più o meno vigorose e intense e, come nel caso dei formaggi a caglio coagulato, può anche includere diverse temperature di cottura della miscela di siero di latte e cagliata (ad esempio, crudo se $<40\text{ }^{\circ}\text{C}$, semicotto se $<50\text{ }^{\circ}\text{C}$ e cotto se $>50\text{ }^{\circ}\text{C}$) per contribuire all'espulsione di più acqua dalla cagliata. Il formaggio fresco risultante da queste fasi sarà più o meno umido e indirettamente più o meno acido e mineralizzato. I livelli di umidità e mineralizzazione influenzano la dimensione del formaggio e la capacità di invecchiamento del prodotto (Montserrat e Mietton, 2014). I formaggi di grande formato (varietà a caglio coagulato e cotto) hanno l'umidità più bassa, un più alto contenuto di calcio e possono essere stagionati per diversi mesi o addirittura anni. Al contrario, le piccole varietà coagulate con acido sono consumate principalmente fresche, hanno alti livelli di umidità (più del 70% di acqua) e una struttura molto demineralizzata (solo dallo 0.2 allo 0.5% di calcio), associata ai livelli di acidificazione alla coagulazione e al drenaggio (Fig. 2). Durante la stagionatura, i formaggi freschi possono essere modificati dall'azione (o meno) di muffe (interne o esterne) o di altri microrganismi. Speciali applicazioni durante la maturazione portano allo sviluppo di una crosta naturale, comprendente una microflora più o meno complessa costituita da lieviti, micrococchi, e corinebatteri, per i formaggi a crosta spalmata, o muffe bianche (principalmente *Penicillium camemberti*) per i formaggi a crosta fiorita, nonché, in alcuni casi, lo sviluppo di muffe interne (principalmente *Penicillium roqueforti*). Durante la maturazione, in alcune varietà potrebbe essere indotta, all'interno della massa, una fermentazione secondaria ad opera di propionibatteri e lattobacilli eterofermentanti del gruppo II. Tali microrganismi portano allo sviluppo di formaggi con occhiatura (ad esempio, Emmental) che si vanno a contrapporre a quelli senza occhiatura (ad esempio, Beaufort e Abondance).

Come accennato precedentemente, da una prospettiva internazionale, alcuni fattori tecnologici storici possono essere fonte di confusione nella definizione di alcune varietà di formaggio. Questa confusione si applica in particolare al caso dei formaggi molli e semi molli. Ciò è dovuto al fatto che in base al sistema di classificazione francese, la terminologia "formaggio a pasta molle" è riservata esclusivamente ad un tipo di tecnologia del formaggio che non prevede alcuna attività di pressatura (ad esempio, Camembert, Brie e formaggi erborinati). Così, mentre nel modello anglosassone soft e semi-soft sono usati per descrivere formaggi di consistenza più o meno morbida, nel modello francese rappresentano due tecnologie molto diverse: tecnologia del tipo Camembert e tecnologia del tipo pressato. Riguardo a questo problema, si è stabilito che il termine francese "pâte molle" fosse equiparato a "formaggio a pasta molle". Tuttavia, tale traduzione non sarebbe molto appropriata. Pertanto, è stato proposto un modello di doppia classificazione basato su criteri tecnologici e strutturali. In questo doppio modello, i formaggi molli ma pressati, come il Reblochon e il Vacherin Mont-d'Or, sono classificati come "Formaggi pressati molli e crudi ($<35\text{ }^{\circ}\text{C}$)". La figura 2 è una versione leggermente modificata della versione francese originale proposta da Lenoir, specificatamente per la famiglia dei formaggi molli e semi molli, al fine di evitare possibili fonti di confusione tra informazioni tecniche e di traduzione. I termini aggiunti alla figura per evitare confusione tecnologica nella traduzione del termine "pâte molle" dallo schema originale sono

contrassegnati da un asterisco. Al contrario, da una prospettiva globale, al di fuori del panorama dei formaggi francesi, la classificazione di Lenoir, presenta alcune sfide tecniche. In primo luogo, i tipi di coagulazione riflessi in questa classificazione non contengono la forma termo-acida (poiché non è rilevante per i formaggi francesi); quindi, il modello non è del tutto preciso quando il formaggio è considerato in modo generico. Per una versione più completa di questa classificazione, devono essere prese in considerazione tutte le forme di coagulazione (acido, caglio o enzimatico e calore acido). In secondo luogo, quando si descrive la natura della materia prima per la produzione del formaggio, il modello di classificazione originale si riferisce solo al latte (Fig. 2). Tuttavia, una classificazione globale dovrebbe considerare tutte le materie prime utilizzate nella produzione del formaggio (ad esempio, siero di latte, panna e colostro).

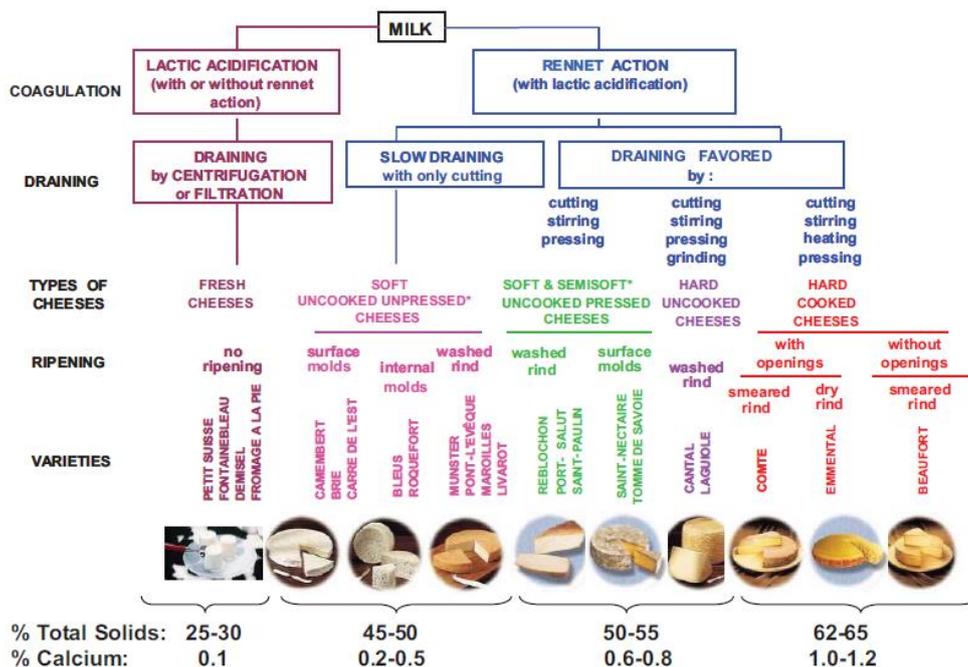


Fig. 2: Classificazione del formaggio di Lenoir. Mostra la diversità delle tecnologie casearie in Francia da Almena-Aliste e Mietton, 2014.

Questa versione rivista del modello originale rappresenta un approccio più completo perché integra anche la natura delle materie prime e le caratteristiche della coagulazione e delle principali fasi di lavorazione, nonché una descrizione più specifica delle proprietà di consistenza del formaggio. Infine, nella classificazione originaria di Lenoir, non c'è alcun riferimento alla categoria dei formaggi a pasta filata. Sarebbe anche difficile integrare in questo modello alcuni formaggi coagulati con acido lattico che sono stagionati per un breve periodo (ad esempio da 1 a 3 settimane) ma che subiscono importanti cambiamenti nelle proprietà durante l'invecchiamento, dagli aspetti microbiologici a quelli chimici e sensoriali di qualità del prodotto finale. Il modello di Lenoir può essere ampliato per creare uno schema di classificazione più raffinato e inclusivo. Un solido punto di partenza di questo esercizio è presentato in figura 3 e 4. La parte iniziale del diagramma (comprese le cagliate "lattiche", "miste" ed "enzimatiche"), include i formaggi a pasta filata insieme a informazioni aggiuntive per alcune tecniche, soprattutto per i formaggi erborinati. La seconda parte del diagramma include varietà coagulate a caldo, nonché formaggi a base di colostro, panna e siero di latte, insieme a formaggi lavorati (Fig. 4). Lo schema rappresenta un modello completo per la classificazione dei formaggi. Include fattori tecnologici chiave, come il diagramma di Lenoir, mentre copre le lacune discusse sopra

per il loro modello. Allo stesso tempo, contiene esempi di varietà di formaggi internazionali (Almena-Aliste e Mietton, 2014).

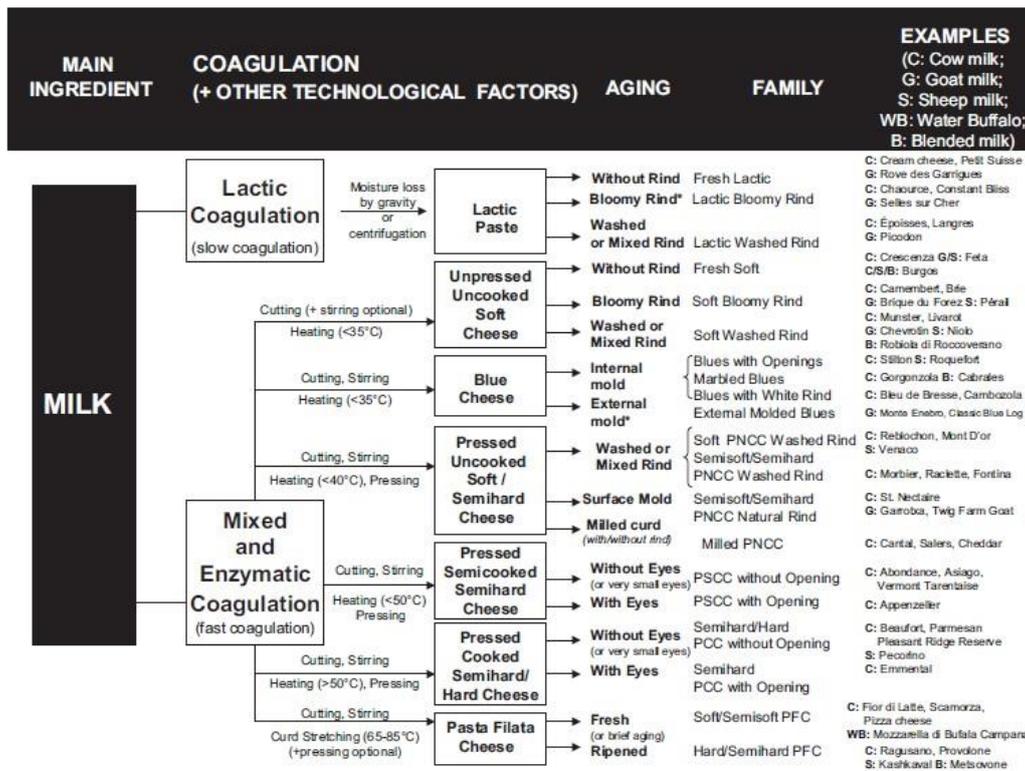


Fig. 3: Illustra le diverse tecnologie casearie in termini di fondamentali caratteristiche tecnologiche e microbiologiche. PNCC, formaggio pressato non cotto; PSCC, formaggio semicotto a pasta pressata; PCC, formaggio cotto pressato; PFC, formaggio a pasta filata da Almena-Aliste e Mietton, 2014.

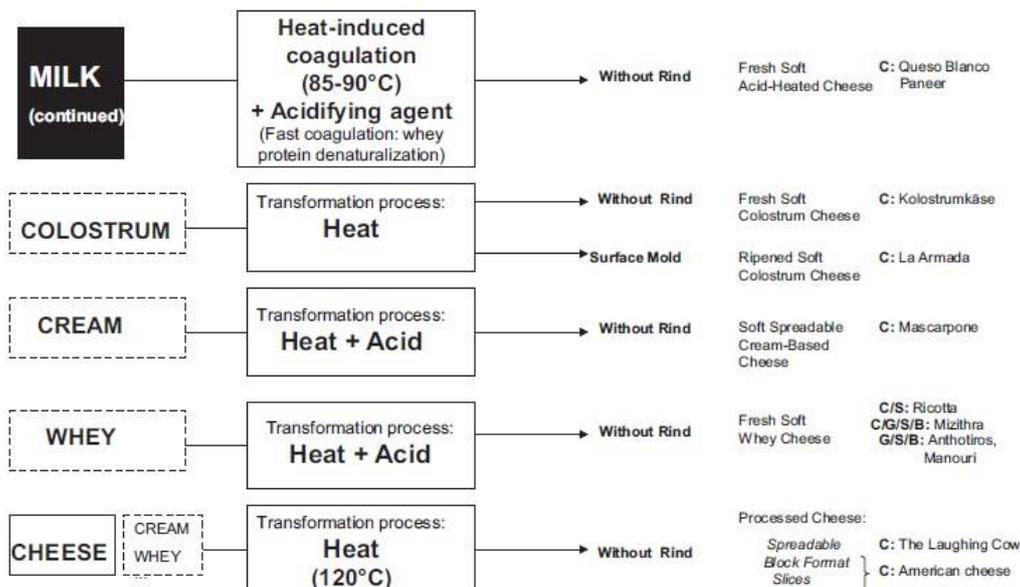


Fig. 4: Illustra le diverse tecnologie casearie in termini di fondamentali caratteristiche tecnologiche e microbiologiche. PNCC, formaggio pressato non cotto; PSCC, formaggio semicotto a pasta pressata; PCC, formaggio cotto pressato; PFC, formaggio a pasta filata da Almena-Aliste e Mietton, 2014.

1.4. Ruolo dei microorganismi nella produzione di formaggio

Gli alimenti fermentati, come pane, birra, vino, yogurt e formaggio, occupano una posizione centrale nella nostra dieta e sono stati ampiamente consumati per secoli. La preparazione di cibi fermentati in unità domestiche o su piccola scala comporta pratiche e attrezzature abbastanza semplici. La fermentazione è una tecnica antica ed economica sviluppata per produrre e preservare gli alimenti dal deterioramento. Oltre alla prolungata conservazione, i prodotti fermentati hanno caratteristiche sensoriali (ad esempio il sapore e l'aroma) e nutrizionali (maggiore digeribilità e presenza di composti bioattivi) potenziate. Entro la metà del diciannovesimo secolo, l'industrializzazione e la scoperta di microrganismi hanno avuto un impatto significativo sull'espansione sia dei prodotti fermentati sia sui processi che utilizzano colture microbiche definite. Gli alimenti fermentati hanno un grande mercato internazionale e la loro diffusione tra i consumatori è in forte crescita grazie alle loro benefiche proprietà (Kandasamy et al., 2018). In tutto questo, i microrganismi svolgono un ruolo chiave dato che sono i responsabili dei processi fermentativi. Nella produzione del formaggio, ad esempio, essi sfruttano gli zuccheri, i grassi, le proteine e tutti gli altri nutrienti del latte per crescere. Il metabolismo di questi substrati dà luogo a molecole che evolvono continuamente in maturazione e apportano caratteristiche peculiari e distintive al prodotto (Almena-Aliste e Mietton, 2014). Nei processi produttivi i microrganismi possono funzionare come starter, e quindi avere un ruolo fondamentale per la fermentazione principale, oppure come co-starter, ovvero contribuire alle caratteristiche sensoriali finali del prodotto senza però svolgere la fermentazione primaria (Caplice e Fitzgerald, 1999).

1.4.1. Starter e co-starter

La fermentazione spontanea, che sfrutta una microflora indefinita e, in alcuni casi, sconosciuta, è stata applicata negli alimenti tradizionali per molto tempo. Con l'avvento delle nuove tecnologie molecolari, la produzione di alimenti fermentati è stata migliorata mediante l'utilizzo di colture starter specifiche e ben caratterizzate. Infatti, una coltura starter è una formulazione tecnologica, costituita da uno o più microrganismi, capace di innescare un processo fermentativo desiderato. In questo modo i processi diventano più efficienti, più prevedibili, più controllabili e più sicuri. I principali parametri tecnici e di sicurezza delle colture starter sono stati descritti dettagliatamente da diverse istituzioni come la International Dairy Federation (IDF), la Food and Drug Administration (FDA), l'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) e l'European Food and Feed Cultures Association (EFFCA). Attualmente, un inventario razionalizzato dei microrganismi (batteri, muffe o lieviti) utilizzati nelle fermentazioni alimentari ha riportato 195 specie di batteri e 69 specie di lieviti e muffe, (Kandasamy et al., 2018).

L'uso di processi biotecnologici può essere di fondamentale importanza per la produzione di prodotti qualitativamente superiori (sia dal punto di vista tecnologico che nutrizionale) oppure per la semplificazione del processo produttivo, basato su pochi ceppi (colture starter). In entrambi i casi un processo biotecnologico può garantire l'ottenimento di caratteristiche sensoriali elevate ma anche omogenee/standard. Le colture starter comprendono generalmente batteri, lieviti, muffe o loro combinazioni. Tra questi, i batteri lattici (LAB) e i lieviti svolgono un ruolo centrale nei processi di fermentazione. I metabolismi più comuni ed utilizzati sono quello della fermentazione alcolica, dove i lieviti producono come metaboliti principali etanolo e CO₂, e quello della fermentazione lattica, dove in base al tipo di LAB, si producono principalmente acido lattico oppure acido lattico ed altri metaboliti (etanolo, acetato, CO₂). Al giorno d'oggi, le colture starter sono preparate su scala commerciale in diverse forme (liquida, disidratata e concentrata), una delle più diffuse è la forma liofilizzata avente un'alta concentrazione di cellule vive e capace di mantenere le proprie caratteristiche a lungo. La scelta della coltura iniziale dipende dalla tipologia di substrato o dalla

materia prima coinvolta nella fermentazione (Kandasamy et al., 2018). La fermentazione lattica è necessaria per la produzione del formaggio. Anche se alcuni formaggi sono ancora prodotti con latte non pastorizzato e quindi sfruttando la sola microflora naturale, la maggior parte viene prodotta su scala commerciale utilizzando colture starter appropriate. Le colture batteriche starter più diffuse possono essere caratterizzate come mesofile o termofile, a seconda della loro crescita ottimale ed alle temperature di produzione impiegate per la coltivazione. In generale, le colture mesofile aumentano e producono acido lattico a una temperatura più bassa (30 °C), mentre le colture termofile funzionano in modo ottimale a una temperatura più alta (42 °C). Esempi di starters caseari mesofili includono *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *L. lactis subsp. cremoris* e *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, mentre gli starter termofili sono *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus* e *Streptococcus thermophilus*. I ceppi termofili sono generalmente utilizzati nei formaggi con una temperatura di cottura elevata come i tipi svizzeri e italiani (Caplice e Fitzgerald, 1999).

La produzione di starter naturali ha avuto origine dall'antico metodo del back-slopping (inoculare una matrice nuova utilizzando l'inoculo di un elemento fermentato in precedenza) e/o sottoponendola a condizioni specifiche come pH basso, calore o temperatura di incubazione. Durante la coltivazione di starter, non sono richieste misure di sicurezza specifiche per prevenire la contaminazione dalla fonte esterna, così come per gli ambienti di coltura. A causa di queste modalità, gli starter naturali si sviluppano costantemente come miscele indefinite costituite da numerose culture e/o specie. Il vantaggio degli starter naturali è la loro capacità di impartire caratteristiche sensoriali specifiche e di essere più resistenti alle contaminazioni da fagi. Allo stesso modo, sembrano beneficiare delle interazioni microbiche, difatti, vari ceppi esprimono una capacità di produzione di acido inadeguata se coltivati come ceppi individuali (Kandasamy et al., 2018).

Le colture naturali rispecchiano le caratteristiche ambientali della zona di produzione e sono difficilmente ottenibili in altre condizioni. Esse possono essere prodotte a partire dalle seguenti matrici: latte, siero e scotta. Un esempio di starter naturale è il "siero-innesto", ottenuto dal siero di latte del giorno precedente incubato a una temperatura che diminuisce gradualmente. I batteri lattici termofili selezionati dal processo di cottura della cagliata sono la microflora dominante del siero di latte naturale. Gli starter naturali del siero di latte contengono lattobacilli termofili superiori a 10⁸ CFU/mL e il *L. helveticus* è solitamente la specie dominante (Gatti et al., 2003).

Alcuni recenti sviluppi hanno portato alla caratterizzazione di colture starter da impiegare nel settore della biosicurezza, dei probiotici e nel miglioramento delle rese. Attualmente le colture starter per alimenti fermentati vengono migliorate per "strategia" anziché per "screening". Gli standard della strategia si basano sulla comprensione del metabolismo e della fisiologia degli organismi insieme alla loro funzione nei prodotti alimentari. Genomica, proteomica e metabolomica, insieme all'automazione di laboratorio e alle tecniche di selezione ad alto rendimento, costituiscono gli strumenti di qualità alimentare per la progettazione e lo sviluppo di nuove colture starter. Il miglioramento della cultura starter rispetto alla fermentazione dei carboidrati, la proteolisi, la produzione di composti aromatici e la protezione dal danno derivante da un attacco fagico sono stati oggetto di numerose ricerche negli ultimi anni, (Kandasamy et al., 2018).

La microflora secondaria viene aggiunta in alcuni processi per influenzare la consistenza (ad esempio, la produzione di CO₂ da *Propionibacterium* nel formaggio svizzero) e il sapore (ad esempio, dalla produzione di diacetile). Muffe, lieviti e batteri diversi dai batteri lattici, protagonisti della fermentazione primaria, sono usati come microflora secondaria (Co-starter) in alcune varietà di formaggio (ad esempio, *Penicillium roqueforti* nei formaggi a venature erborinate), (Caplice e Fitzgerald, 1999).

1.4.2. Batteri lattici

I LAB sono i microrganismi predominanti utilizzati nell'industria alimentare e sono considerati generalmente "food-grade" o/e GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro). Per lo più, i LAB fermentano la fonte di carbonio disponibile negli alimenti crudi in acido lattico (Fig. 5) determinando, in questo modo, una riduzione del pH. Pertanto, lo sviluppo di LAB in un prodotto fermentato ha un effetto antagonistico nei confronti di organismi indesiderati e, allo stesso tempo, contribuisce a migliorare le caratteristiche nutrizionali e sensoriali del prodotto finale. Tra i vari prodotti fermentati ci sono i latticini come latticello, formaggio, yogurt e latte fermentato.

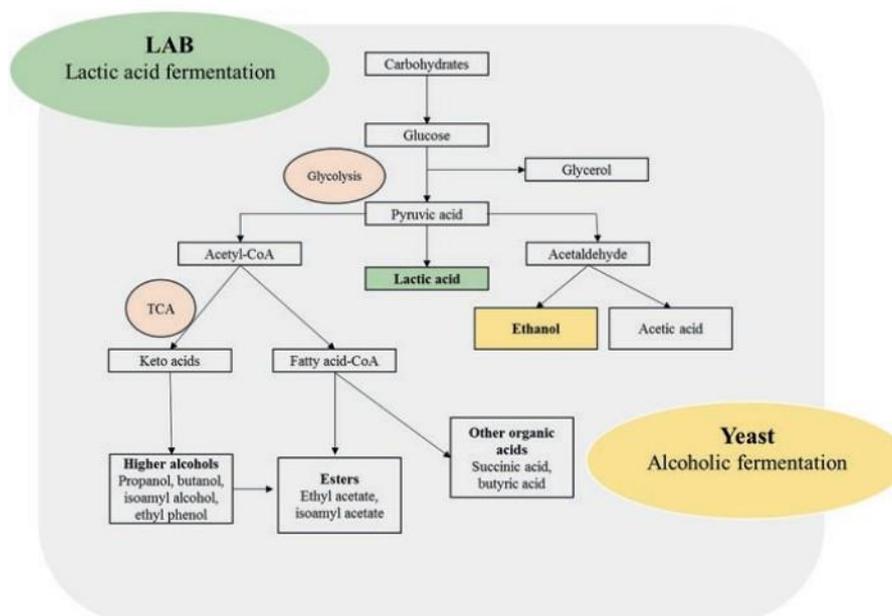


Fig. 5: Rappresentazione delle principali vie metaboliche e prodotti finali di LAB e Lieviti, (Kandasamy et al., 2018).

I LAB sono noti per produrre composti aromatici, antimicrobici, enzimi, polisaccaridi, vitamine o dolcificanti. Alcuni ceppi hanno dimostrato anche azione probiotica. Gli aspetti tecnologici desiderati includono la crescita a diversi livelli di pH, temperatura e sale (NaCl), e specifiche capacità acidificanti e metaboliche (deaminazione dell'arginina, idrolisi dell'esculina, produzione di acetoino). Numerose specie di LAB vengono utilizzate in base alla natura della materia prima per ottenere un prodotto fermentato desiderato. I latticini, come il formaggio, contengono generalmente *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. lactis var. diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Lactobacillus casei*. La specie microbica dipende dal tipo di formaggio da produrre.

L'approvvigionamento e il consumo di substrato sono molto importanti per la crescita microbica durante la maturazione del formaggio. La cagliata di formaggio è una matrice complessa contenente fonti di carbonio e/o azoto che, in base alla loro natura e disponibilità, giocano un ruolo significativo nel processo di maturazione (McSweeney e Sousa, 2000).

I LAB sono in grado di produrre composti aromatici come diacetile, acetaldeide ed esteri. I principali produttori di diacetile includono *Lactobacillus spp.*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Streptococcus thermophilus*. *Lactococcus lactis biovar diacetylactis* è ampiamente noto per la produzione di grandi quantità di questo composto, mentre l'acetaldeide è prodotta per mezzo di una cooperazione tra *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* nello

yogurt. I LAB appartenenti a *Lactococcus lactis* producono esteri etilici e tioesteri durante la produzione del formaggio.

Un'altra caratteristica fondamentale nei LAB è il fatto che dispongano di tutta una serie di enzimi capaci di impartire le caratteristiche tecnologiche e sensoriale desiderate al prodotto finito. Questi giocano un ruolo fondamentale durante la maturazione. Infatti, a seguito di lisi cellulare, che avviene in stagionatura, le colture starter rilasciano enzimi proteolitici intracellulari, come peptidasi e proteasi, che portano alla formazione di piccoli peptidi e amminoacidi precursori di composti aromatici. L'uso di starter selezionati può pertanto servire a definire il sapore del prodotto e a controllare l'amarezza nella stagionatura del formaggio (Kandasamy et al., 2018).

Infine, i LAB producono diverse sostanze antimicrobiche non specifiche come acidi grassi a catena corta, etanolo e perossido di idrogeno, batteriocine, sostanze inibitorie simili alla batteriocina (BLIS) e composti antifungini. A causa di questo tratto funzionale, oggi i LAB rappresentano un'alternativa naturale per la biopreservazione alimentare. Tra i composti antimicrobici prodotti da LAB, le batteriocine sono le più promettenti e possono essere applicate *ex situ*, come ingredienti alimentari, o *in situ*, utilizzando una coltura starter che le produce. Nelle industrie alimentari, i metaboliti secondari prodotti da alcune colture starter *in situ* vengono utilizzati come composti aromatici negli additivi alimentari.

1.4.3. Lieviti

Nell'antichità le persone utilizzavano inconsciamente i lieviti per produrre cibi e bevande fermentati; mentre la conoscenza del loro ruolo nel convertire carboidrati in etanolo e anidride carbonica (CO₂) (Fig. 5), è stata descritta solo nella seconda metà dell'Ottocento da Louis Pasteur. I lieviti sono organismi unicellulari eucariotici noti per la loro presenza in un'ampia gamma di alimenti fermentati tradizionali prodotti da materie prime di origine vegetale e animale. I lieviti svolgono una funzione significativa nella fermentazione degli alimenti, attraverso la produzione di enzimi o molecole contribuiscono alla caratterizzazione del prodotto finale. La maggior parte dei lieviti utilizzati negli alimenti appartengono ai generi *Saccharomyces*, specialmente *S. cerevisiae*. Ricerche su altri generi hanno portato alla scoperta di *Candida spp.*, *Endomycopsis spp.*, *Hansenula spp.*, *Pichia spp.*, *Rhodotorula spp.*, *Saccharomycopsis spp.* I ruoli principali dei lieviti negli alimenti fermentati includono la produzione di alcol, il miglioramento della consistenza mediante lievitazione, l'acidificazione, la produzione di antitossine per la conservazione, l'aumento dei valori nutritivi, la rimozione di componenti anti-nutrizionali e la produzione di peptidi bioattivi e vitamine (Fig. 5). Durante la fermentazione del latte con lieviti starter è stata riportata anche la produzione di acidi organici (acido acetico, acido butirrico, acido lattico, acido propionico e acido piruvico). Enzimi idrolitici (intracellulari ed extracellulari) come amilasi, cellulasi, β -glucosidasi, invertasi, lipasi, pectinasi, proteasi, fitasi e xilanasi possono essere prodotti dal lievito. I lieviti sono indicati anche per la produzione di peptidi bioattivi mediante l'azione delle loro carbossipeptidasi e aminopeptidasi. *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* sono le specie di lievito comunemente riportate nella produzione di formaggio. Il lievito accelera il processo di maturazione e migliora le componenti aromatiche in numerosi prodotti caseari. Durante la maturazione del formaggio, i lieviti lipolitici producono alcoli, metilchetoni e lattoni che svolgono il loro ruolo principale nella produzione di aromi. *Candida zeylanoides*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* e *Trichosporon cutaneum* sono le specie di lievito più importanti legate al processo di maturazione del formaggio per il miglioramento del sapore (Kandasamy et al., 2018).

I lieviti possono rappresentare una parte sostanziale della microflora di diversi formaggi come formaggi spalmabili, molli, semiduri e stagionati. Il loro ruolo dipende dal tipo di formaggio: in

alcune varietà sono responsabili del deterioramento, provocando sapori fruttati, accumulo di CO₂, alterazione di consistenza e scolorimento, mentre in altre sono coinvolti nel processo di maturazione e contribuiscono alle interazioni microbiche, ai cambiamenti di consistenza e alla biosintesi dei composti aromatici. I lieviti vanno a definire il sapore e l'aroma mediante il rilascio di etanolo, acetaldeide, acetato di etile e butirrato di etile. Il profilo aromatico può essere modulato anche da composti non direttamente prodotti ma generati per mezzo di enzimi extracellulari con attività proteolitica e lipolitica (amminoacidi, acidi grassi ed esteri) (Mansour et al., 2008). Il principale contributo dei lieviti al processo di maturazione è dato dal consumo di acido lattico che, facendo aumentare il pH (disacidifica la cagliata), favorisce la crescita di batteri acido-sensibili sulla superficie del formaggio e avvia la seconda fase di maturazione del prodotto. Il catabolismo del lattato è stato riportato per *Debaryomyces hansenii*, *Kluveromyces lactis* e *Kluveromyces marxianus*. Ad esempio, *D. hansenii* assimila lattosio e lattato mentre *G. candidum* e *Y. lipolytica* assimilano lattato ma non lattosio. I fenomeni che portano alla disacidificazione del prodotto alimentare sono sicuramente legati al consumo di lattato ma anche al catabolismo degli amminoacidi. Quest'ultimo è stato studiato in diversi lieviti tra cui *Y. lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *K. lactis* e *D. hansenii*, rispetto alla biosintesi dei composti solforati volatili (VSC). La degradazione degli amminoacidi avviene per opera di un'aminotransferasi che trasferisce il gruppo amminico di un amminoacido ad un alfa-chetoacido (alfa-chetoglutarato), determinando la formazione dell'amminoacido corrispondente e chetoacidi, che vengono successivamente degradati per aromatizzare i composti, (Mansour et al., 2008).

I lieviti possono ridurre la crescita di organismi patogeni e degradativi negli alimenti fermentati producendo fattori antibiotici, acidi organici, tossine e perossido di idrogeno. Allo stesso tempo possono stimolare la popolazione lattica producendo vitamine, amminoacidi, purine e zuccheri liberi mediante la conversione di carboidrati complessi che sono cruciali per la crescita dei batteri lattici. Allo stesso modo, i batteri lattici producono acidi organici e riducono il pH medio, creando così un ambiente che favorisce la crescita dei lieviti. Inoltre, i lieviti possono avere attività intrinseche di tipo probiotico, come è stato riportato in alcuni ceppi delle specie di *D. hansenii*, *Torulasporea delbrueckii*, *Kluveromyces lodderae*, *K. marxianus*, *K. lactis* e *Yarrowia lipolytica*. L'applicazione di lieviti produttori di metaboliti bioattivi specifici che promuovono la salute, polifenoli liberi, peptidi e oligosaccaridi come co-starter negli alimenti fermentati è un ulteriore vantaggio (Kandasamy et al., 2018).

Microrganismi come *Yarrowia lipolytica*, lievito ubiquitario a sviluppo naturale, crescono sulla superficie del formaggio come microflora avventizia ambientale (salamoia, scaffali di maturazione e personale). Tuttavia, in diversi casi, possono superare rapidamente le colture commerciali. Per tale motivo, *Y. lipolytica* può avere un effetto contrastante sulla maturazione dei formaggi. Mentre in alcuni casi velocizza eccessivamente i processi di maturazione, portando ad un più repentino deterioramento del formaggio con la produzione di pigmenti indesiderati o aromi non voluti, in altri casi la sua presenza è fondamentale (Kandasamy et al., 2018).

1.4.4. Muffe

I formaggi stagionati mediante l'utilizzo di muffe rappresentano una piccola parte della produzione mondiale di formaggio. Tuttavia, stanno diventando sempre più popolari tra i consumatori. Tra i più rinomati si ricorda Roquefort, Gorgonzola, Stilton e Danish Blue. La produzione di formaggi molli stagionati in superficie, come il Camembert, è stata per lungo tempo limitata alla Francia, ma negli ultimi anni molti Paesi hanno sviluppato una loro propria produzione. La presenza di muffe all'interno del formaggio (*Penicillium roqueforti*) o sulla superficie (*P. camemberti*) conferisce al prodotto un aspetto diverso e le elevate attività biochimiche di queste muffe producono un aroma e un gusto

caratteristico. Inoltre, il processo di maturazione risulta più complesso rispetto ad altre varietà di formaggio con flora semplice. Il Camembert tradizionale ne è un buon esempio: la cagliata che si ottiene possiede un pH di 4.5-4.6 e contiene principalmente gli starter che erano stati aggiunti nel latte, e cioè i lattococchi (*Lactococcus lactis*, spp. *Lactis* e *cremoris*). Durante la maturazione, i lieviti crescono in superficie, formando uno strato denso di circa 200µm di spessore; *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Debaryomyces hanseni* sono le specie di lievito più comuni. La muffa, *Geotrichum candidum*, compare contemporaneamente ai lieviti ma la sua crescita è limitata dalla salatura. Dopo 6 o 7 giorni di stagionatura si osserva la crescita di *Penicillium camemberti* e un feltro bianco ricopre l'intera superficie del formaggio. Dopo 15-20 giorni, quando il *Penicillium* ha consumato l'acido lattico e disacidificato il formaggio, si stabilisce in superficie una flora batterica aerofila sensibile all'acido. Questa flora è formata da micrococchi e batteri corineformi, tra cui *Brevibacterium linens*. All'interno del formaggio, i lattococchi sono nettamente dominanti, la popolazione di lievito rimane inferiore rispetto alla superficie (circa 10⁶ cellule/g invece di 10⁸ cellule/g). Nella produzione di questi formaggi a partire dal latte pastorizzato (come è il caso per la grande maggioranza dei formaggi Camembert), la flora è meno diversificata, contenente principalmente organismi aggiunti come starters, cioè lattococchi e *P. camemberti*. Le popolazioni di altri microrganismi sono ridotte e il formaggio ottenuto è diverso da quello prodotto da latte crudo: il suo gusto e il suo aroma sono più neutri e meno accentuati. Un altro esempio di formaggio erborinato è il Bleu d'Auvergne. In questo caso, la cagliata viene forata per far favorire l'areazione e, conseguentemente, la crescita di *P. roqueforti*, la cui sporulazione è visibile dopo 2-3 settimane dalla produzione. È chiaro che sia nei formaggi con muffe superficiali che nei formaggi erborinati, le diverse specie di *Penicillium* svolgono un ruolo importante. Si ritiene generalmente che i formaggi stagionati siano limitati a quelli stagionati in superficie e ai formaggi erborinati. In effetti, ci sono un piccolo numero di altre varietà meno conosciute di formaggi stagionati in muffa che vengono prodotti in quantità più limitate. In Francia, si tratta di formaggi semiduri chiamati "Saint-Nectaire" e "Tome de Savoie". La superficie di questi formaggi è ricoperta da una complessa flora fungina contenente *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Epicoccum* e *Sporotrichum*. È stata segnalata muffa anche sulla superficie di formaggi italiani come il Taleggio (*Penicillium*, *Mucor*) e la Robiola (*Geotrichum*), (Gripon, 1993).

Il Gammelost è un formaggio semiduro prodotto in Norvegia con latte scremato. Dopo l'acidificazione, il latte viene riscaldato a 65 °C e la caseina precipitata viene raccolta. Dopo la formatura, la cagliata viene tenuta per circa due ore in siero di latte bollente e il giorno successivo viene spruzzata sulla superficie una sospensione di *Mucor*. Il colore marrone del formaggio è dovuto allo sviluppo di questa muffa. L'interno del formaggio è giallo bruno e questo colore si intensifica con la maturazione del formaggio. Il Gammelost ha un gusto piccante e aromatico ed è stato osservato che *P. roqueforti* può svilupparsi all'interno di questo formaggio. In questo caso il formaggio viene forato con aghi metallici ricoperti di spore di *P. roqueforti* per permettere lo sviluppo di tale muffa. La proteolisi è molto intensa nei formaggi erborinati. Più del 50% dell'azoto totale (TN) è solubile a pH 4.6 nel Roquefort maturo e circa il 65% nel Danish Blue. Questa frazione solubile contiene un gran numero di piccoli peptidi e di azoto non proteico (NPN: azoto solubile in acido tricloroacetico al 12%), che rappresenta circa il 30% di TN. Anche gli amminoacidi liberi sono abbondanti, rappresentando il 10% dell'azoto totale nel Danish Blue. Sono state osservate e riportate quantità equivalenti o superiori a 280-500 mg/10 g di formaggio. Inoltre, è stato osservato che la proteolisi è più limitata nelle parti esterne rispetto al centro del formaggio per la presenza di NaCl che limita la crescita del *Penicillium* e la sua azione proteolitica. Pertanto, nella parte esterna di un Camembert a latte crudo maturo, circa il 35% dell'azoto è solubile, mentre solo il 25% è disponibile all'interno del formaggio. Questi valori sono inferiori a quelli del formaggio erborinato ma mostrano comunque

un'ampia proteolisi. La frazione di azoto solubile contiene molti piccoli peptidi (l'NPN è circa il 20% dell'N totale). Nei formaggi Camembert tradizionali, l'ammoniaca rappresenta il 7-9% dell'azoto totale e si forma per la marcata deaminazione degli amminoacidi. Il profilo degli amminoacidi liberi ottenuto è diverso da quello della caseina idrolizzata intera: alanina, leucina e fenilalanina sono presenti in proporzioni maggiori e acido aspartico, tirosina e lisina in proporzioni inferiori; arginina e serina sono presenti in quantità particolarmente basse. Ciò mostra un rilascio preferenziale di amminoacidi durante la proteolisi e anche il catabolismo degli amminoacidi liberi (Gripon, 1993).

Studi sulla flora controllata nella cagliata ottenuta per azione enzimatica, in cui *P. roqueforti* o *P. camemberti* si sviluppano da soli in assenza di altri microrganismi, hanno evidenziato e consentito la definizione dell'intensità della proteolisi causata da queste due muffe. Dopo 40 giorni di maturazione, l'azoto solubile a pH 4.6, NPN, e l'azoto solubile in acido fosforico rappresentavano rispettivamente circa 50%, 30% e il 10% dell'azoto totale. Questi valori erano molto più alti di quelli per la cagliata di controllo (dove erano attivi solo caglio e plasmina) e dimostrano che c'era un'ampia produzione di peptidi ad alto e basso peso molecolare nonché di amminoacidi liberi. Queste muffe hanno quindi un'azione sia endopeptidasi che esopeptidasi. Sebbene il caglio, la plasmina o altra flora abbiano un effetto, è chiaro che *Penicillium spp.* gioca un ruolo proteolitico importante nei formaggi stagionati in muffa. I sistemi proteolitici extracellulari di *P. roqueforti* e *P. camemberti* sono in qualche modo simili. Entrambi sintetizzano una metalloproteinasi e una proteinasi ad aspartato, nonché una carbossipeptidasi acida e un'aminopeptidasi alcalina. Inoltre, *P. roqueforti* sintetizza una o più carbossipeptidasi alcaline e alcuni ceppi producono anche una proteinasi alcalina. I ceppi di *P. camemberti* hanno potenziali enzimatici molto simili. Quando l'aspartico-proteinasi di *P. roqueforti* o la metalloproteinasi di *P. camemberti* sono state aggiunte a cagliate di controllo asettiche, gli elettroforetogrammi ottenuti dopo la maturazione erano molto simili a quelli del formaggio normale, dimostrando che queste proteinasi svolgono un ruolo importante nella maturazione con muffa dei formaggi. In queste cagliate di controllo, gli enzimi hanno aumentato notevolmente il livello di azoto solubile a pH 4.6 e NPN ma non hanno rilasciato amminoacidi liberi. Inoltre, è stata studiata l'evoluzione dell'attività proteolitica della cagliata durante la maturazione del Camembert. Al centro del formaggio, questa attività è molto bassa e difficilmente cambia durante la stagionatura. Tuttavia, nella regione esterna, aumenta improvvisamente dopo 6-7 giorni di maturazione, cioè quando il *Penicillium* inizia a crescere. L'aspartico-proteinasi e la metalloproteinasi raggiungono il massimo della loro concentrazione dopo circa 15 giorni di maturazione del formaggio e poi diminuiscono lentamente. Questi due enzimi sono quindi abbastanza stabili nel formaggio. Anche i batteri lattici partecipano alla proteolisi, principalmente producendo piccoli peptidi e amminoacidi liberi. Tuttavia, il pH ottimale delle loro peptidasi è solitamente più vicino alla neutralità che al pH dei formaggi con una flora prevalentemente lattica. Il pH più elevato dei formaggi stagionati con muffe potrebbe quindi favorire la loro azione (Gripon, 1993).

La parte esterna del Camembert subisce notevoli modificazioni di consistenza e la cagliata che all'inizio della maturazione è soda e friabile, successivamente diventa morbida. L'ammorbidimento è visibile in una sezione trasversale del formaggio e si estende gradualmente verso il centro. Il contenuto di acqua del Camembert è di circa il 55% e, se è troppo alto, la parte più esterna tende a scorrere quando il formaggio maturo viene tagliato. Questi cambiamenti sono solitamente attribuiti all'alto livello di proteolisi esercitato da *P. camemberti*. Tuttavia, come visto in precedenza, la diffusione della proteasi fungina è limitata e può interessare solo i pochi millimetri esterni. Un altro cambiamento importante causato da *P. camemberti* e dalla flora superficiale è l'instaurazione di un gradiente di pH dalla superficie al centro dovuto al consumo di acido lattico e alla produzione di ammoniaca. Questo gradiente di pH può essere simulato incubando Camembert fresco (3 giorni di

maturazione senza semina di *Penicillium*) in un'atmosfera ammoniacale. L'ammoniaca si dissolve nella cagliata e, dopo il raggiungimento dell'equilibrio, il gradiente di pH stabilito viene espresso dall'ammorbidimento del formaggio; questo processo è più evidente vicino alla superficie dove il pH è più alto. L'aumento del pH, quindi, gioca un ruolo importante facendo ammorbidire il formaggio (Gripon, 1993). Ciò può essere spiegato dal fatto che l'aumento del pH aumenta la carica netta sulla caseina e modifica le interazioni proteina-proteina. Cambiano anche le interazioni proteina-acqua e quindi la capacità di assorbimento dell'acqua delle caseine. Infatti, durante la maturazione, la parte esterna del Camembert ha un contenuto d'acqua maggiore rispetto al centro, nonostante l'evaporazione superficiale, che è inevitabile. L'intensità dell'attività biochimica di *P. roqueforti* varia considerevolmente tra i ceppi, pertanto la loro scelta ha un effetto importante sulla qualità del formaggio erborinato. Le caratteristiche dei ceppi desiderati variano anche da una varietà di formaggio all'altra. Il formaggio Bleu d'Auvergne, ad esempio, richiede ceppi altamente proteolitici che hanno una bassa attività lipolitica, mentre Fourme d'Ambert necessita di ceppi con bassa attività proteolitica e lipolitica. Il controllo della crescita del ceppo è un altro fattore cruciale. Se la crescita della muffa è troppo estesa o troppo limitata, l'aroma sarà difettoso o debole. *P. roqueforti* si sviluppa all'interno della cagliata perché tollera un basso livello di O₂ e un alto livello di CO₂. L'aerazione e lo spazio per la crescita della muffa dipendono dal fatto che la cagliata sia più o meno forata. Quando si aggiungono *Leuconostoc spp.* eterofermentanti al latte durante la produzione di Roquefort, si produce CO₂, che provoca la formazione di spazi che favoriscono lo sviluppo miceliale. Anche il contenuto di sale, particolarmente elevato (6-8% della fase liquida) nei formaggi erborinati, influisce sulla crescita di *P. roqueforti*. A seconda del ceppo, tali concentrazioni possono ritardarne la crescita. Il prolungamento della salatura fa diminuire la velocità di proteolisi e lipolisi. La salatura, oltre ad agire sul *Penicillium*, influenza anche la collocazione di micrococchi e lieviti sulla superficie del formaggio Roquefort. La scelta del ceppo di *P. camemberti* è importante anche nella produzione di formaggi molli a muffa superficiale. Tuttavia, l'attività proteolitica dei diversi ceppi non varia tanto quanto le loro attività ossidative e lipolitiche. La scelta di un ceppo di *P. camemberti* è guidata anche dal tasso di crescita, colore, densità e altezza del micelio che gioca un ruolo nell'aspetto e nell'attrattiva dei formaggi con muffe superficiali (Gripon, 1993).

1.5. Fattori di rischio

1.5.1. Rischio microbiologico

Sebbene i formaggi siano generalmente considerati alimenti sicuri a causa delle loro proprietà fisico-chimiche, in Unione europea lo 0.4% di tutti i focolai di origine alimentare nel 2006 era correlato a questi tipi di prodotto. I focolai erano il risultato della contaminazione da *Staphylococcus aureus*, un batterio che può causare mastiti nelle mucche, e che quindi può essere trasferito nel latte come contaminante. Negli Stati Uniti, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes* sono stati isolati da formaggio morbido non pastorizzato. In generale la contaminazione può essere favorita da un'igiene impropria durante il processo di produzione del formaggio. A questo si può aggiungere il fatto che alcuni formaggi possono favorire meglio la proliferazione dei patogeni a causa delle loro caratteristiche chimico-fisiche. Ad esempio, *L. monocytogenes* è stato spesso trovato nel formaggio a pasta molle, che ha un alto contenuto di umidità (67% di umidità su base priva di grassi o ≥ 50 % di contenuto di umidità). Questi dati suggeriscono che il formaggio può rappresentare un fonte di rischio per i consumatori. Alla luce di questo quadro, sono state stabilite rigide linee guida per controllare i patogeni di origine alimentare nel formaggio, in particolare per *L. monocytogenes*. Ad esempio, per i formaggi con un pH medio superiore a 5 e un A_w medio superiore a 0.94, insieme a una durata di conservazione superiore a 5 giorni, la legislazione dell'Unione europea richiede zero unità formanti

colonia (CFU) di *L. monocytogenes* in cinque campioni di formaggi al momento della produzione, e meno di 100 CFU/g in cinque campioni nel punto vendita, (Choi et al., 2016).

La produzione di formaggio si basa sull'uso di colture starter definite e sulla presenza di popolazioni microbiche indigene indefinite. In Francia la produzione annua di formaggio è stimata in 1.8 milioni di tonnellate di cui quasi l'11% è prodotto da latte crudo. Comprendere le complesse comunità microbiche e le loro dinamiche durante la produzione del formaggio (dal latte crudo, dall'ambiente di mungitura, durante la fermentazione e la maturazione) sono fattori chiave per garantire la sicurezza alimentare e controllare le proprietà sensoriali dei prodotti finali. Nel nucleo del formaggio, la microflora dominante di solito corrisponde a specie di LAB mentre i batteri catalasi-positivi Gram-positivi, lieviti, muffe e diversi batteri Gram-negativi (*Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas spp.*) costituiscono la microflora sottodominante o anche la microflora co-dominante. Sulla superficie dei formaggi si osserva un'elevata diversità di genere e specie e i principali gruppi microbici corrispondono a stafilococchi coagulasi-negativi e membri degli Actinobacteria (*Micrococcus*, *Corynebacterium*), mentre la microflora sottodominante corrisponde a specie di Gram-negativi, come *Pseudomonas spp.*, *Pseudoalteromonas spp.*, *Halomonas spp.*, *Psychrobacter spp.* e specie appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae come *Hafnia alvei*. I batteri Gram-negativi sono spesso isolati sia dalla superficie dei formaggi che dal nucleo del formaggio e, in particolare, la conta delle Enterobacteriaceae può raggiungere 10^6 - 10^7 CFU/g nel nucleo del formaggio durante i primi giorni di stagionatura per poi diminuire lentamente. In ultima analisi, le condizioni che coadiuvano la presenza e distribuzione delle Enterobacteriaceae dipendono da: processo produttivo, attività dell'acqua (a_w), aumento del pH, disponibilità di ossigeno, proteolisi e contenuto di sale. Infine, i batteri dell'ambiente di maturazione possono contaminare il prodotto, (Coton et al., 2012).

Da un lato, la presenza di alcuni batteri Gram-negativi viene spesso utilizzata come marker per valutare le condizioni igieniche, poiché i coliformi sono indicativi di contaminazione fecale e sono anche considerati contaminanti indesiderati del formaggio. È stato dimostrato che *Pseudomonas spp.* sono state in grado di produrre un'ampia gamma di composti volatili che possono contribuire negativamente alla qualità sensoriale del formaggio. Inoltre, difetti nella consistenza e nel sapore del formaggio sono stati attribuiti ai batteri Gram-negativi *Enterobacter aerogenes* ed *Escherichia coli* mentre altri membri della famiglia delle Enterobacteriaceae come *Serratia spp.* e *Kluyvera spp.* possono influenzare la qualità sensoriale del formaggio tramite attività lipolitiche e proteolitiche. Inoltre, è stato segnalato che alcuni batteri Gram-negativi producono ammine biogene (BA) volatili e non volatili negli alimenti, in particolare nel pesce, ma anche nelle verdure e nei formaggi, che possono essere un serio problema in un contesto alimentare a causa del loro potenziale impatto negativo sulla fisiologia umana (principalmente per istamina e tiramina). Le BA vengono prodotte e possono accumularsi negli alimenti contenenti amminoacidi liberi attraverso vie cataboliche batteriche intracellulari che coinvolgono almeno una decarbossilasi o deaminasi e un trasportatore responsabile dell'assorbimento dell'amminoacido e della secrezione dell'ammina. I BA corrispondono a composti azotati basici a basso peso molecolare e si formano a bassi livelli all'interno delle cellule viventi. Alcuni studi hanno anche riportato una certa resistenza agli antibiotici nei batteri Gram-negativi isolati da alimenti come verdure, carne macinata e formaggi portoghesi. L'antibiotico resistenza dei microrganismi rappresenta un serio problema che si sta sempre più ampliando a causa dell'utilizzo spropositato di antibiotici in medicina, agricoltura e allevamento animale/ittico. Questo può determinare la comparsa di ceppi altamente resistenti che poi possono diventare pericolosi per la salute umana. D'altra parte, però, bisogna tenere conto che la presenza di alcuni batteri Gram-negativi nel formaggio può svolgere un ruolo importante per quanto riguarda la maturazione del formaggio e la produzione di composti aromatici e quindi le qualità sensoriali complessive del formaggio. Tra i batteri Gram-negativi precedentemente isolati dai formaggi, *Proteus vulgaris* è stato in grado di

produrre alte concentrazioni di composti aromatici, in particolare composti solforati volatili e alcoli a catena ramificata, durante la maturazione di un formaggio modello, (Coton et al., 2012).

1.5.2. Rimedi utilizzati per contenere il rischio biologico:

La prevenzione della crescita delle muffe indesiderate è una questione importante per l'industria alimentare perché le perdite economiche dovute al deterioramento fungino degli alimenti possono essere considerevoli. A parte alcuni alimenti deliberatamente fermentati, i prodotti contenenti muffe o lieviti visibili non sono generalmente accettati dai consumatori. La prevenzione della crescita dei funghi è una questione importante nell'industria del formaggio. Il formaggio può essere considerato un buon substrato per molte specie di muffe e lieviti. Le condizioni di conservazione e stagionatura del formaggio rendono questo prodotto ancora più suscettibile alla crescita fungina. L'umidità relativa (RH) dell'aria nei caseifici è solitamente alta, ad esempio intorno all'80-85% nei magazzini moderni dove vengono stagionati i formaggi di tipo Gouda. I formaggi vengono spesso stagionati all'aria aperta, il che significa che durante tutto il periodo di maturazione si può verificare la contaminazione con spore fungine o micelio. Durante la loro crescita, alcuni funghi o muffe possono produrre micotossine che devono essere evitate per i loro possibili effetti pericolosi sulla salute dell'uomo. La rimozione superficiale di muffe e lieviti visibili dai prodotti alimentari non dà quindi alcuna garanzia di sicurezza al consumatore. Tale trattamento non è molto efficace e non influenza i metaboliti tossici che potrebbero essere stati rilasciati dall'agente contaminante. Oltre ad eseguire processi produttivi in condizioni igieniche, in alcuni casi l'uso di un agente antifungino è solitamente l'unico modo per prevenire il deterioramento. Da oltre 30 anni la natamicina è diventata il conservante più usato nell'industria alimentare a causa della sua efficacia nel controllare la crescita dei funghi e lieviti anche a basse concentrazioni. Viene utilizzato principalmente per il trattamento superficiale dei formaggi. Poiché la natamicina non ha attività antibatterica, i processi naturali di maturazione dei formaggi non vengono influenzati in modo negativo. La natamicina, nota anche come pimarcina, appartiene al gruppo degli antimicotici polienici macrolidi. Viene prodotto su scala industriale mediante fermentazione con *Streptomyces natalensis*. Finora, la natamicina è l'unico composto antifungino di derivazione microbica utilizzato come conservante alimentare. La natamicina è una polvere di colore che vira da bianco a crema, con poco o nessun odore o sapore. Pertanto, non influenza il gusto, l'aspetto e le caratteristiche del formaggio. A causa del suo carattere anfotero, la natamicina ha una bassa solubilità nella maggior parte dei solventi e ha un punto isoelettrico di 6.5. In generale una sospensione acquosa di natamicina avrà un valore di pH compreso tra 5 e 7.5. La solubilità della natamicina in acqua è di circa 30 ppm (mg/L), (Brik, 1981). Altri studi hanno riportato valori di 50-100 ppm, (Clark et al., 1964). In considerazione del fatto che la concentrazione minima inibitoria (MIC) di natamicina per la maggior parte dei funghi che alterano il cibo è inferiore a 10 ppm (Hoekstra et al., 1998), la solubilità della natamicina di solito sarà più che sufficiente per inibire quei microrganismi. D'altra parte, per l'inibizione di funghi con una MIC relativamente alta, la bassa solubilità della natamicina può essere un problema. Pertanto, quando si tratta di specie più tolleranti è importante sapere quale sarà la reale solubilità nelle condizioni dell'applicazione. La natamicina come triidrato è un composto stabile se protetto dalla luce e dall'umidità, (Stark e Tan, 2003). A causa della sua bassa solubilità in sistemi acquosi con un pH intorno a 7, la natamicina è presente principalmente sotto forma di cristalli sulla superficie del prodotto. La frazione disciolta di natamicina penetra a malapena nel formaggio. Il fatto che la natamicina rimanga sulla superficie del prodotto è un vantaggio importante rispetto ad altri conservanti come il sorbato. È stato riferito che la penetrazione della natamicina nel formaggio è limitata a 2-4 mm. Lo standard della Comunità Europea relativo alla massima profondità di penetrazione consentita della natamicina nel formaggio è di 5 mm. La forma cristallina della natamicina è molto stabile e garantisce un tempo di lavorazione

prolungato, ma solo la frazione disciolta di natamicina ha attività antifungina. Essa è meno stabile dei cristalli di natamicina, e la sua eliminazione viene compensata in parte da quella sottoforma di cristalli e in parte da quella diffusa sulla superficie del formaggio. L'eliminazione della natamicina disciolta si verifica quando la natamicina interagisce con l'ergosterolo della membrana cellulare fungina, mentre l'inattivazione può avvenire a seguito di decomposizione causata dalla luce ultravioletta o dall'idrolisi. In sistemi acquosi come le superfici dei formaggi saranno presenti 30-50 ppm di forma attiva. La concentrazione richiesta dipende dal tipo di formaggio, dal tempo di conservazione e dal numero di trattamenti. Inoltre, la quantità effettiva nel rivestimento può anche essere influenzata dalla qualità e dall'omogeneità della dispersione. In generale, dopo il primo trattamento la protezione è di tre settimane o più. La maggior parte dei formaggi viene trattata più di una volta per mantenere una protezione per un periodo di tempo più lungo. Ad esempio, un formaggio di tipo Gouda di 5 mesi di solito è stato trattato quattro o cinque volte con un rivestimento di formaggio contenente 100-250 ppm di natamicina. La natamicina può essere aggiunta alla dispersione acquosa del polimero (solitamente polivinilacetato) che viene applicata alla crosta del formaggio come rivestimento. Può essere applicato anche per immersione o spruzzatura. In alternativa, la natamicina può essere aggiunta al bagno di salamoia. I formaggi vengono posti in scaffalature mobili con file di strutture permeabili ai liquidi per la salamoia facendo passare le scaffalature sotto un sistema di irrigazione fisso. Successivamente vengono trattati con un rivestimento versandone la quantità necessaria sulla superficie in modo tale da ottenere uno strato sottile ed omogeneo (Stark e Tan, 2003). Il formaggio può anche essere immerso in una sospensione acquosa di natamicina, solitamente di 1-3 g/L di acqua (1.000-3.000 ppm). L'applicazione di immersione viene eseguita dopo la salamoia, preferibilmente con il formaggio essiccato.

In alcuni casi, la natamicina viene impiegata assieme ai sorbati, altri additivi alimentari capaci di controllare muffe, lieviti e alcuni batteri. In uno studio (De Ruig e Van den Berg, 1985) effettuato su formaggio Gouda trattato con natamicina (100 e 250 ppm) o sorbato (3-10%), entrambi i prodotti hanno mostrato efficacia nel proteggere il formaggio dalla crescita di muffe. La quantità di sorbato doveva essere 200 volte superiore alla quantità di natamicina. La crosta dei formaggi trattati con sorbato di potassio o sorbato di calcio non era maturata e si era potuto osservare una colorazione rosa della crosta. Anche dopo diverse settimane i formaggi avevano ancora una lucentezza più o meno giallo rosata. Inoltre, erano stati notati i cosiddetti aromi chimici, principalmente appena sotto la crosta. Il trattamento con rivestimenti contenenti natamicina, invece, non aveva influito negativamente sulla qualità del formaggio. Sia il sorbato di calcio che di potassio sono stati rilevati nelle parti interne del formaggio e dopo 10 settimane anche al centro del formaggio. La natamicina è stata rilevata solo nella buccia (circa 1 mm di spessore). Questo aspetto riguardante il sorbato può essere limitante per i formaggi in cui una muffa deve crescere all'interno del prodotto. Inoltre, possono verificarsi sapori sgradevoli e possono svilupparsi specie di *Penicillium* resistenti al sorbato. L'immersione di "formaggio Blue" in una sospensione di 1 g/L di natamicina, prima della ceratura, è stata sufficiente per prevenire la crescita di funghi sulla superficie del formaggio. L'applicazione della natamicina sui formaggi italiani come Fontina, Taleggio, Montasio, Asiago, Provolone e Pecorino Romano è stata studiata ed hanno testato l'effetto inibitorio della natamicina sulla crescita di muffe su un formaggio tipo Caciotta, (Stark e Tan, 2003).

2. *YARROWIA LIPOLYTICA*

Yarrowia lipolytica è una delle specie di lievito più studiate dopo *Saccharomyces cerevisiae*. È classificato come GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro) per le produzioni industriali dall'American Food and Drug Administration (FDA) e si presume che sia sicuro per le applicazioni alimentari e per mangimi dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), (EFSA NDA Panel, 2019). Questa specie di lievito è molto diffusa in natura e possiede la capacità di accumulare lipidi, dunque, è classificata come microrganismo oleoso. *Y. lipolytica* è fondamentale per la maturazione di alcuni formaggi tradizionali e salsicce a fermentazione secca, ed è stata isolata anche da altre matrici alimentari, come yogurt, kefir, salsa di soia, margarina rancida, insalate di gamberi, lievito naturale e altri ambienti differenti, come ad esempio terra, suolo contaminato da olii, fiumi e acqua di mare inquinati. In alcuni casi la sua crescita nel cibo non è desiderata. Questo lievito psicrotrofo ha sviluppato un ampio spettro di caratteristiche biologiche uniche per adattarsi ad ambienti molto differenti fra loro. Può crescere sfruttando una vasta gamma di substrati, sia idrofili che idrofobi, e in un'ampia gamma di condizioni chimico-fisiche; nello specifico pH (da 2.5 a 8) e temperature (da 2 °C a 32 °C). Inoltre, è in grado di tollerare bene gli ioni metallici (come nichel, cadmio, zinco, cobalto e solfato di rame) e soluzioni saline (fino al 12% (v/v)), (Liu et al., 2015). Questa naturale capacità di inserirsi in ambienti diversi, alternativi e, in alcuni casi, estremi, con una limitata fonte di nutrienti, rende *Y. lipolytica* un potenziale alleato per affrontare il problema degli sprechi dell'industria agro-alimentare.

2.1. Tassonomia e genetica

La specie era classificata come *Candida*, poiché non era stato descritto alcuno stato sessuale. La forma perfetta di *C. lipolytica* è stata identificata alla fine degli anni '60 da Wickerham presso il Northern Regional Research Laboratory dell'USDA a Peoria. Si scoprì che una coltura isolata nel 1945 da un barattolo di fibra sterile in un impianto di lavorazione del mais formava aschi attaccati agli elementi ifali quando messi su un substrato adatto. Da questi aschi è stato possibile isolare da una a quattro spore di varie dimensioni e forma, ma la vitalità delle spore è risultata molto bassa. La maggior parte degli isolati naturali sono aploidi (o quasi aploidi). La forma perfetta è stata riclassificata prima come *Endomycopsis lipolytica* sempre da Wickerham nel 1970, poi come *Saccharomycopsis lipolytica* pochi anni dopo, e infine come *Yarrowia lipolytica* da Van der Walt e Von Arx nel 1980, (Barth and Gaillardin, 1996).

Dall'inizio degli anni '90, sono stati intrapresi sforzi importanti per riclassificare le specie di lievito utilizzando approcci filogenetici. Questi studi hanno fornito informazioni significative sul posizionamento filogenetico di *Y. lipolytica* e delle specie anamorfiche legate a questo genere, nonché sui confini delle specie all'interno di questo gruppo. Attraverso confronti di SSU rRNA e sequenze di geni di rRNA 26S parziali, *Y. lipolytica* è risultato essere filogeneticamente lontana dalla maggior parte dei membri di *Candida* e altri generi di lievito "ascomiceti" noti (Fig.6), (Groenewald et al., 2014).

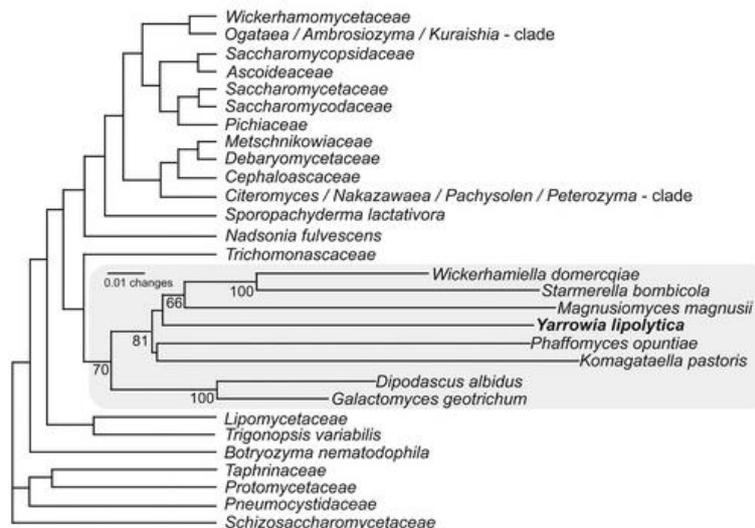


Fig. 6: Relazioni filogenetiche tra i generi di lieviti ascomiceti che mostrano la posizione di *Yarrowia lipolytica* da Groenewald et al., 2014.

2.2. Biologia della cellula

Y. lipolytica è un microrganismo dimorfico che può assumere dunque diverse morfologie. Il lievito può presentarsi sottoforma di cellule tradizionali, pseudoife e ife settate come meccanismo di difesa contro condizioni avverse, come la variazione di substrati, di ossigeno, pH, carbonio e azoto, (Liu et al., 2015). Testando varie condizioni di coltivazione Ruiz-Herrera e Sentandreu (2002) hanno riportato che la formazione di micelio era massima a pH neutro, mentre quasi solo la forma cellulare era presente a pH 3 e in presenza di citrato. D'altra parte, Bellou et al. (2014) hanno osservato che la concentrazione di ossigeno disciolto (e non fonti di carbonio o azoto) era il parametro principale che influenzava il dimorfismo del lievito. *Y. lipolytica* cresce come un aerobio stretto su un'ampia gamma di fonti di carbonio (Fig. 7). Tra gli zuccheri, può degradare diversi esosi, come glucosio, fruttosio, mannosio e galattosio. Mentre il glucosio è il substrato preferito per tutti gli isolati, l'efficienza nel catabolizzare il fruttosio è ceppo specifica. Il saccarosio e il lattosio non possono essere utilizzati da ceppi "wild type" ma solamente un isolato dal suolo (*Y. lipolytica* B9) che era lattosio positivo. Ciò non sorprende data l'elevata variabilità dei fenotipi tra i diversi ceppi. Anche il galattosio può essere consumato da *Y. lipolytica* W29 solo in presenza di glucosio a concentrazioni superiori allo 0,4%. Il lievito possiede anche il metabolismo genetico completo per l'utilizzo di xilosio e arabinosio, tuttavia, sono stati pubblicati risultati non consistenti sul loro utilizzo reale. Un altro substrato ideale per *Y. lipolytica* è il glicerolo. Quando non sono presenti glicerolo o glucosio, il lievito può utilizzare anche etanolo, acido acetico, propionico, butirrico, malico, succinico, citrico e lattico. Quest'ultimo può anche essere utilizzato come substrato se nel mezzo non sono presenti altre fonti di azoto (ad esempio amminoacidi liberi).

La caratteristica principale di *Y. lipolytica* è la capacità di crescere e consumare alcani, acidi grassi e triacilgliceroli. Pertanto, oli vegetali, esteri degli acidi grassi, acidi grassi liberi puri, grassi animali, oli vegetali e oli di pesce grezzi possono essere facilmente utilizzati come substrati. Anche le fonti di azoto sono fondamentali e la loro presenza e disponibilità sul terreno può influenzare le vie metaboliche e, di conseguenza, i metaboliti prodotti dal lievito. Ad esempio, le condizioni di limitazione dell'azoto sono considerate ottimali per l'accumulo di lipidi quando nel mezzo sono presenti glucosio o glicerolo. Tuttavia, alcuni ceppi hanno prodotto lipidi quando l'azoto era ancora presente (o appena dopo il suo esaurimento), mentre hanno consumato questi lipidi immagazzinati successivamente durante l'incubazione, quando sono state raggiunte condizioni limitate di azoto

(CDW), se coltivati su zuccheri, oppure valori più alti se coltivati su substrati idrofobici (Papanikolaou et al., 2006). A seconda del substrato, la produzione di lipidi potrebbe avvenire in due modi: ex novo e de novo. Il cosiddetto accumulo “ex novo” avviene quando i materiali idrofobici (grassi ed oli) sono la principale fonte di carbonio ed energia, e, quindi, la produzione di lipidi rappresenta il processo anabolico primario della cellula. Questo è indipendente dalle limitazioni dell'azoto e, insieme a SCO, vengono generati materiali privi di lipidi. Di solito, *Y. lipolytica* incorpora rapidamente acidi grassi insaturi (cioè acido oleico) per esigenze di crescita e produzione di acido organico, mentre gli acidi grassi saturi (come l'acido stearico) vengono lentamente incorporati e utilizzati in parte per esigenze di crescita e in parte per la produzione di SCO (Papanikolaou e Aggelis, 2010). La cosiddetta produzione “de novo” di lipidi si verifica quando *Y. lipolytica* viene coltivata su zuccheri o composti metabolizzati in modo simile (ad esempio il glicerolo). In questo caso, i lipidi vengono sintetizzati durante un metabolismo secondario eseguito di solito quando il terreno ha un rapporto C/N elevato o una limitazione di azoto (Papanikolaou e Aggelis, 2010). Tuttavia, le due vie di accumulo di lipidi non si escludono a vicenda. Infatti, Papanikolaou et al. (2006) hanno osservato la biosintesi degli acidi grassi de novo quando entrambi i substrati idrofobici del glucosio e degli scarti venivano applicati simultaneamente. Nel caso in cui l'azoto (N) fosse sbilanciato, innesca una cascata di eventi biochimici con il conseguente accumulo e rilascio di citrato dai mitocondri nel citosol. E proprio nei mitocondri viene scisso dall'ATP-citrato liasi in acetil-CoA che verrà utilizzato per sintetizzare gli acidi grassi (Papanikolaou e Aggelis, 2010). Bellou et al., (2016) hanno riportato che una limitazione sia dell'azoto che del magnesio favoriva un maggiore accumulo di lipidi rispetto alla presenza di uno solo di essi (dal 13.6% al 38.5%). Tuttavia, né la limitazione dell'azoto né un elevato rapporto C/N sembrano sempre sufficienti a garantire un'elevata produzione di lipidi. Infatti, in alcuni studi, i lipidi sono stati prodotti già durante la prima fase di crescita, nonostante la presenza di azoto e glicerolo grezzo come unica fonte di carbonio (Filippousi et al., 2019). Kuttiraja et al., (2018) hanno suggerito che il controllo del pH del sistema può anche far aumentare l'accumulo di lipidi. Rispetto ad altri lieviti oleosi (come *Rhodospiridium toruloides*, *Lipomyces starkeyi*, *Cryptococcus curvatus*), *Y. lipolytica* tende a consumare rapidamente (turnover) lipidi dopo aver raggiunto un valore massimo senza alcuna causa apparente, anche se sono ancora presenti quantità elevate di substrato. Questo è solitamente associato alla produzione di acido citrico e polioli (Makri et al., 2010). Gli SCO accumulati sono composti principalmente da TAG e in misura minore da acidi grassi liberi, lipidi neutri, steroli e frazioni polari. Gli acidi grassi più rappresentativi accumulati sono generalmente gli acidi oleico, palmitico e linoleico (Liu et al., 2015), tuttavia, su misura SCO può essere ottenuto modulando le condizioni di crescita o i substrati (Papanikolaou e Aggelis, 2010). Ad esempio, le cellule che crescono su diversi oli o residui dell'industria petrolifera generano SCO ricchi di acido oleico, mentre gli acidi grassi saturi sono più abbondanti se coltivati con la stearina. Inoltre, i lipidi con una composizione simile al burro di cacao sono stati ottenuti utilizzando come substrato una miscela di olio di colza idrolizzato e stearina (50:50), (Papanikolaou e Aggelis, 2011).

2.4.2. Acidi organici

Y. lipolytica secerne grandi quantità di acidi organici in condizioni di limitazione della crescita ed eccesso di carbonio. L'acido citrico è utilizzato in commercio come regolatore di acidità ed esaltatore di sapidità nelle bevande e nella fabbricazione di prodotti farmaceutici. La produzione di acido citrico da parte di *Y. lipolytica* è stata documentata da molto tempo. Con le appropriate condizioni di crescita e opportuni substrati, ceppi wild type di *Y. lipolytica* possono produrre fino a 80-90 g/L di acido citrico, mentre i ceppi ingegnerizzati arrivano a valori che superano le centinaia. Le varie strategie impiegate per ottimizzarne la produzione sono schematizzate in figura 8 (Zinjarde, 2014).

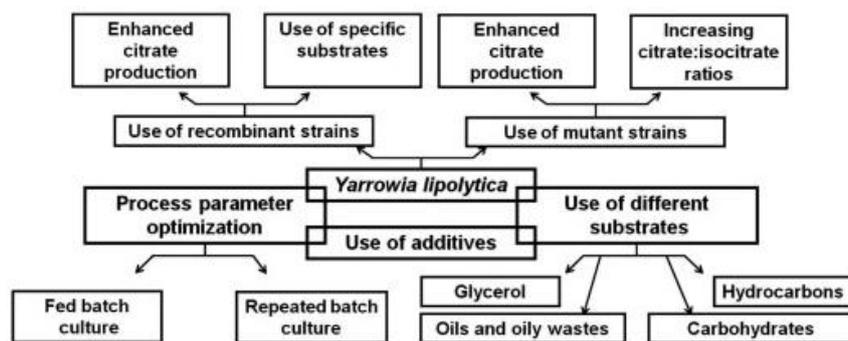


Fig. 8: Produzione di acido citrico da *Yarrowia lipolytica*: riassunto schematico delle strategie coinvolte (Zinjarde, 2014).

L'acido α -chetoglutarico (KGA) e l'acido piruvico (PA) sono importanti chetoacidi negli alimenti, nei prodotti farmaceutici, nei mangimi per animali e in altri settori. Il prezzo di mercato di KGA e PA (12-15 \$/kg) è significativamente più alto di quello di altri acidi organici, come l'acido citrico (0,5 \$·kg/1), l'acido succinico (2.5 \$·kg/1), e acido fumarico (1.5 \$·kg/1). La carenza di tiamina, il basso pH e la degradazione del substrato tramite la glicolisi (come il glicerolo) contribuiscono alla secrezione di KGA e PA alterando il ciclo di Krebs. Al contrario, l'utilizzo di substrati che seguono la β -ossidazione (ad esempio, olio di colza) non consente l'accumulo di PA (Rywińska et al., 2020). La possibilità di ottenere specificamente KGA è stata studiata negli ultimi anni, migliorando la separazione dei due acidi oppure evitando la produzione di PA. Nell'ultimo caso, è stato valutato lo screening dei ceppi selvatici o il cambiamento delle condizioni di crescita (Morgunov et al., 2013).

2.4.3. Polialcoli

Due importanti zuccheri utilizzati come additivi alimentari per le loro proprietà esaltatrici di sapidità, dolcificanti e umettanti sono l'eritritolo e il mannitolo, (Grembecka, 2015). In generale, gli alcoli zuccherini sono prodotti da piante, funghi, lieviti e batteri per contrastare condizioni di stress, come la presenza di stress osmotico. In *Y. lipolytica*, un rapporto C/N elevato, zuccheri elevati o composti metabolizzati in modo simile, pH basso (3-3.5) e ossigeno basso sono parametri chiave che sono stati associati alla produzione di polioli (Papanikolaou et al., 2017). Tuttavia, come già discusso per la produzione di CA, la risposta dei lieviti è specifica del ceppo. Recentemente, Egermeier et al. (2017) hanno mostrato che a pH 3.5 e dopo 48 ore di coltivazione, 15 dei 20 ceppi testati con glicerolo producevano principalmente mannitolo (max 30 g/L), eritritolo e arabitolo. Gli altri cinque ceppi, oltre ai polioli, hanno prodotto quantità importanti di CA (28.9 g/L). Come previsto, l'aumento del pH a 5.5 per 72h, ha determinato uno spostamento del metabolismo verso la produzione di CA, che in alcuni casi ha raggiunto valori superiori a 40 g/L. Tuttavia, gli stessi 15 ceppi sopra menzionati, a parte una quantità leggermente superiore di CA, hanno continuato a produrre polioli. Questi 15 ceppi erano tutti isolati da latte mentre tra i rimanenti c'erano ceppi di laboratorio primari, W29, NRRLYB-423 e H222 isolati rispettivamente dalle acque reflue, dall'impianto di lavorazione del mais e dal suolo. Pertanto, le condizioni di coltura hanno dimostrato di influenzare la produzione di metaboliti, ma anche l'origine dei ceppi ha un impatto. Per quanto riguarda la percentuale di polioli, l'eritritolo è solitamente il più abbondante, mentre, a seconda del ceppo, il mannitolo potrebbe essere dominante (circa 80-88%), (Filippousi et al., 2019). Con il mutante MK1, Mirończuk et al., (2015) hanno riportato una produzione di eritritolo fino a 225 g/L dal glicerolo. Rispetto ai mutanti, i tipi selvatici producono meno polioli (Liu et al., 2020; Mirończuk et al., 2015). Ad esempio, partendo dal glicerolo grezzo, il mutante *Y. lipolytica* Wratislavia K1 ha prodotto più eritritolo del ceppo wild type A-15

(80 e 65 g/L, rispettivamente), (Tomaszewska et al., 2012). Tuttavia, l'isolato di tipo selvatico ha prodotto simultaneamente concentrazioni più elevate di mannitolo rispetto al ceppo ricombinante (rispettivamente 14 vs 4 g/L) quando la concentrazione di NaCl è stata modificata nel terreno. Ciò mostra la specificità e la maggiore efficienza dei ceppi ingegnerizzati, ma una minore flessibilità per adattarsi ai cambiamenti ambientali. Come discusso per CA, anche la configurazione utilizzata per il processo influisce sulla resa finale del poliolo (Mirończuk et al., 2014). Alla fine, è stato riportato che i polioli possono essere completamente ri-consumati dal microrganismo, esclusivamente per il fabbisogno energetico di mantenimento, dopo l'esaurimento del glicerolo (André et al., 2009). Questo è un aspetto importante da considerare per definire i migliori parametri di lavoro.

2.5. Ruolo tecnologico: applicazione di *Y. lipolytica* nel settore caseario

Più di 60 pubblicazioni scientifiche riportano la presenza di *Y. lipolytica* in una varietà di formaggi diversi (formaggi stagionati con muffe, spalmabili, con venature blu e freschi). *Yarrowia lipolytica* è stata identificata nel formaggio prodotto e/o venduto in circa 20 Paesi sparsi in tutti i cinque continenti, sebbene la maggior parte degli studi sia stata condotta in Europa. Confrontando il formaggio prodotto con latte crudo rispetto a quello pastorizzato, non è stata osservata alcuna differenza evidente nella prevalenza di *Y. lipolytica*. Tuttavia, tra le diverse fonti di latte, il latte vaccino sembra essere sovra-rappresentato, il che non sorprende se si considerano i volumi di produzione annuale molto più grandi di latte vaccino rispetto a quello di pecora, latte di capra e bufala e formaggio. Al contrario, quando si normalizzano i volumi di produzione annuali, i dati sembrano suggerire una maggiore prevalenza di *Y. lipolytica* nei formaggi di pecora, capra e bufala rispetto al formaggio di vacca, forse a causa delle differenze nel contenuto di grassi e proteine nel latte. Nella produzione di formaggio commerciale, *Y. lipolytica* finora non è stata inclusa deliberatamente nelle colture di maturazione. Pertanto, la sua presenza nel formaggio deve derivare dalle materie prime (ad esempio, latte) o dalla contaminazione ambientale (ad esempio, attrezzature, superfici corporee degli operatori o grembiuli nell'ambiente di produzione del formaggio). Nonostante il fatto che *Y. lipolytica* non venga aggiunto deliberatamente, è stato spesso segnalato come una tra le prime specie di lievito (assieme a *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis*, *K marxianus*) più diffuse nel formaggio e addirittura, in alcuni casi, supera le altre specie di lievito. Poiché *Y. lipolytica* è segnalato per essere strettamente aerobico, è stato principalmente identificato nella microflora superficiale, o all'interno della ricotta venata blu e dove è disponibile l'ossigeno. Occasionalmente, *Y. lipolytica* è stata trovata anche all'interno di altri formaggi con un ambiente presumibilmente ostile per la crescita di questa specie (Groenewald et al., 2014). Tra le specie di lievito che potrebbero avere gli attributi necessari per assistere i batteri lattici nella maturazione del formaggio, *Y. lipolytica* è stata considerata un candidato idoneo. *Yarrowia lipolytica* ha proprietà chiave che offrono vantaggi competitivi per la crescita e la predominanza nei prodotti lattiero-caseari come la tolleranza ad alta concentrazione di sale e bassa temperatura, l'assimilazione di lattato e citrato e la produzione di enzimi proteolitici e lipolitici extracellulari. Gli attributi fisiologici e metabolici associati a *Y. lipolytica* sono riassunti nella figura 9. Queste caratteristiche sono responsabili dei cambiamenti che si verificano durante il processo di produzione del formaggio.

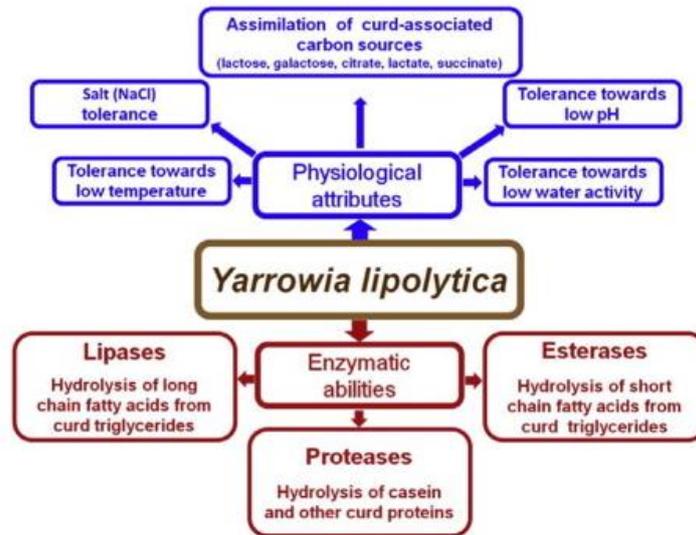


Fig. 9: Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*, Zinjarde, 2014.

Tuttavia, le attività enzimatiche dei ceppi di *Y. lipolytica*, e di conseguenza il loro reale contributo alla maturazione del formaggio, sono fortemente influenzate dalle condizioni fisico-chimiche e ambientali. Come già ottenuto con i batteri lattici starter, è necessaria una selezione preliminare dei ceppi idonei ad essere inoculati come agenti di maturazione. Poiché l'uso deliberato di queste specie non è una pratica comune, è necessario identificare i criteri di selezione in relazione alle caratteristiche del formaggio desiderate. Un'indagine su un numero rilevante di ceppi di diversa origine ambientale ha evidenziato un'elevata biodiversità all'interno della specie di *Y. lipolytica* per le attività proteolitiche e lipolitiche, nonché per la composizione degli acidi grassi di membrana (Suzzi et al. 2001).

Le attività biochimiche dei ceppi di *Y. lipolytica* possono svolgere un ruolo importante nelle caratteristiche organolettiche dei formaggi, grazie alla produzione di composti aromatici e/o dei loro precursori come metilchetoni, alcoli, lattoni ed esteri. In effetti, è noto che un gran numero di peptidi bioattivi sono prodotti dall'idrolisi delle proteine del latte. È stato dimostrato che gli isolati di *Y. lipolytica* dai formaggi erborinati idrolizzano la tributirina e mostrano una forte assimilazione di lattosio, galattosio, lattato e acido citrico in condizioni ambientali simili a quelle che si verificano nella maturazione del Danablu (Van den Tempel e Jakobsen, 2000). La scomposizione della tributirina si traduce in acido butanoico, che ha un odore simile al formaggio. Questa è una parte importante del sapore di molti tipi di formaggio, tra cui il Cheddar e i formaggi stagionati come il Camembert. L'idrolisi della caseina richiede l'azione delle proteasi che sono spesso fornite dai ceppi di *Y. lipolytica* associati al formaggio. La scissione proteolitica di α s1-caseina e β -caseina da parte delle proteasi *Y. lipolytica* genera peptidi e aminoacidi liberi. Questi prodotti finali sono di particolare importanza nella produzione di formaggi erborinati. Le specie di *Penicillium* associate a queste varietà metabolizzano gli aminoacidi e producono NH_3 . Questo a sua volta disacidifica la cagliata e favorisce la stagionatura. Alcuni ceppi mostrano anche un buon potenziale amminobiogenico e decarbossilano ornitina, fenilalanina, tirosina e lisina. *Y. lipolytica* produce diversi tipi di lipasi ed esterasi che contribuiscono nei processi di stagionatura andando a formare tutta una serie di composti aromatici o loro precursori. I ceppi di *Y. lipolytica* producono anche composti solforati volatili (VSC) che si aggiungono ai sapori del formaggio. Recentemente è stato riesaminato il metabolismo dello zolfo in *Y. lipolytica* basato su un confronto tra forniture ad alto e basso tenore di zolfo (solfato, metionina o cistina) mediante approcci combinati (trascrittomica,

profilo metabolico e analisi VSC). Il lievito ha la capacità intrinseca di sintetizzare diverse molecole contenenti zolfo strutturalmente diverse che possono contribuire a creare note aromatiche. In uno studio con *Y. lipolytica* CBS 2075, è stata osservata principalmente la presenza di solfuri, furani e chetoni a catena corta come composti aromatici associati al formaggio. Dimetilsolfuro (DMS), dimetildisolfuro (DMDS) e dimetiltrisolfuro (DMTS) sono stati segnalati inoltre come alcuni VSC specifici (Zinjarde, 2014).

L'attività lipolitica e proteolitica di *Y. lipolytica* può influenzare lo sviluppo dell'aroma dei formaggi. L'analisi che sfrutta la gascromatografia combinata alla spettrometria di massa ha dimostrato che molte specie di lievito, tra cui *Y. lipolytica*, sono in grado di produrre quantità significative di composti aromatici al di fuori della matrice del formaggio, inclusi composti solforati, esteri, acidi grassi liberi, alcoli e chetoni, l'ultimo dei quali sono particolarmente importanti per l'aroma del formaggio erborinato. Tuttavia, è noto che i profili volatili osservati con l'analisi strumentale non sono sempre evidenti nella percezione sensoriale dell'aroma. Inoltre, la percezione dell'aroma delle singole persone può variare. Per questo motivo l'analisi sensoriale è necessaria per valutare il contributo di particolari specie microbiche alla produzione di aromi e il grado di somiglianza dei profili volatili prodotti dai lieviti con quelli di un vero formaggio (Van den Tempel e Jakobsen, 2000). Andando a riassumere le principali potenzialità tecnologiche possiamo osservare che: a fronte delle sue attività lipolitiche e proteolitiche, *Y. lipolytica* è stata implicata nella stagionatura del formaggio o al contrario, se si è spinto troppo oltre, nel suo deterioramento. È stato segnalato che *Yarrowia lipolytica* contribuisce a determinare caratteristiche organolettiche superiori, in termini di aroma, corpo e/o consistenza del formaggio. Lo sviluppo dell'aroma sembra essere dovuto, in gran parte, alla produzione di composti solforati volatili, come metantiolo, dimetilsolfuro o dimetildisolfuro. Nelle prove di caseificazione, i panel sensoriali hanno assegnato i punteggi organolettici più alti ai formaggi inoculati con *Y. lipolytica*. Ulteriori vantaggi di *Y. lipolytica* includono una riduzione dei tempi di maturazione, con benefici economici associati ed eventualmente anche una maggiore durata commerciale del formaggio. Inoltre, è stato suggerito che *Y. lipolytica* abbia attività anti-listeria e inibisca la crescita di *Bacillus cereus* e muffa verde (Zinjarde, 2014).

2.6. Svantaggi nell'uso di *Yarrowia lipolytica* nei formaggi

Per quanto concerne invece gli effetti indesiderati nella stagionatura del formaggio, *Y. lipolytica* è stata segnalata per produrre sapori sgradevoli, influenzare negativamente la struttura del formaggio, stimolare la formazione di ammine biogene e inibire la crescita di *Penicillium roqueforti* (Groenewald et al., 2014). Sono state osservate differenze ceppo-specifiche in queste proprietà e si è affermato che le concentrazioni di ammine biogene (fino a 120 mg/kg) non danno motivo di preoccupazioni per la salute. Alla fine, le elevate attività proteolitiche e lipolitiche di *Y. lipolytica* creano un pool di precursori per la produzione di ammine biogene da parte di *Y. lipolytica* stessa e/o da altri organismi nella microflora del formaggio. In effetti, i geni (candidati) della decarbossilasi eventualmente coinvolti nella formazione di ammine biogene sono presenti nel genoma di *Y. lipolytica*. Inoltre, *Y. lipolytica* è stata anche implicata nei difetti di doratura superficiale del formaggio. Sebbene questo difetto non intacchi la qualità nutritiva o il gusto del formaggio, l'aspetto è sufficientemente sgradevole da consentire ai consumatori di rifiutare il prodotto, con concomitante perdita finanziaria. Si ritiene che il pigmento piomelanina responsabile di questo difetto di decolorazione sia formato dall'auto-ossidazione extracellulare del catabolita della tirosina, l'acido omogentisico. Tuttavia, sono state fatte anche alcune osservazioni contrastanti: (1) negli studi sul formaggio Camembert, quando usato in combinazione con *Penicillium candidum*, *Y. lipolytica* non ha avuto alcun effetto o ha persino ridotto l'imbrunimento, (2) *Candida famata*, piuttosto che *Y. lipolytica* è stato segnalato per essere responsabile della produzione di un pigmento brunastro da Van Den Tempel e Jakobsen (2000), e (3)

sebbene i conteggi di *Y. lipolytica* nella ricotta aumentassero verso la fine della durata di conservazione, questo lievito non è stato identificato nella zona di deterioramento del formaggio. Pertanto, se *Y. lipolytica* contribuisce effettivamente a difetti di decolorazione, è dunque corretto concludere che questo aspetto mostra differenze pronunciate specifiche del ceppo. Come accennato in precedenza, sembra esserci una linea piuttosto sottile tra gli effetti desiderabili e benefici di *Y. lipolytica* nella stagionatura del formaggio e il suo contributo occasionale e non intenzionale al deterioramento. Inoltre, le preferenze di gusto e sapore possono essere molto diverse tra i soggetti; quindi, ciò che può essere desiderabile per alcuni può essere considerato come un deterioramento da parte di altri. Per la produzione di formaggio commerciale, l'eventuale paura della crescita eccessiva di *Y. lipolytica*, la comparsa di cattivi odori e l'inibizione della crescita di *P. roqueforti* può essere superata (1) utilizzando comunità microbiche bilanciate piuttosto che singoli ceppi come colture di maturazione, (2) utilizzando enzimi o estratti isolati da *Y. lipolytica* piuttosto che colture vive, o (3) aggiunta di aroma di formaggio prodotto con l'aiuto di *Y. lipolytica*. (Groenewald et al., 2014).

3. MATERIALI E METODI

3.1. Microrganismi utilizzati

Per questo progetto sperimentale è stato utilizzato il lievito *Yarrowia lipolytica* DG1, appartenente alla collezione del dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna. Il ceppo è stato inoculato in 10 mL di terreno di coltura liquido appropriato, Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) e poi incubato per 72h ore a 24°C. Successivamente si è fatto un passaggio intermedio in un volume maggiore (200 mL) in beute contenenti YPD e incubate a 24°C per 72h in agitazione a 125 rpm (Table universal – Shaker 709).

3.2. Prova preliminare

La biomassa di *Y. lipolytica* per questa prova preliminare è stata ottenuta facendo sviluppare il ceppo in terreno di coltura YPD. Due beute sterili da 5 L sono state riempite con 3.5 L di terreno in modo tale da poter trattare i formaggi in tempi diversi e da poter avere un replicato di crescita (n=2). Una volta inoculato il ceppo di *Y. lipolytica* l'incubazione è stata fatta avvenire in agitazione (125 rpm) a circa 24 °C per 48-72h. Subito dopo l'inoculo (giorno zero), si è provveduto a campionare il brodo culturale per valutare il livello iniziale di *Y. lipolytica*. Il terreno contenuto nelle due beute da 3.5 litri è stato nuovamente campionato prima e dopo l'immersione delle forme, a 48 e 72h (giorno 2 e 3). È stato, inoltre, determinato il valore di pH della beuta prima e dopo l'inoculo con *Y. lipolytica* per monitorarne la crescita. Il pH è stato misurato mediante pH-metro (BASIC 20, Crison, Modena, Italy) (Fig. 10), correttamente tarato con gli standard a pH 4 e pH 7. Un'aliquota di campione è stata pipettata all'interno di un'eppendorf, e in essa è stata introdotta la sonda per misurare il pH.



Fig. 10: pH-metro

3.2.1. Tipo di trattamento superficiale

Sono state testate tre tipologie di trattamento per trasferire *Yarrowia lipolytica* sulle superfici dei formaggi:

- **Immersione:** una parte del terreno con *Y. lipolytica* contenuto nelle due beute è stato centrifugato (ALC centrifuge PK110, Thermo Electron Corporation) per 10 minuti a 4000 rpm e il pellet risospeso in soluzione salina. Questo è stato poi trasferito in un contenitore sterile sufficientemente grande da poter introdurre i formaggi. Le caciotte sono state immerse

in questa soluzione contenente il lievito (concentrazione iniziale di 8 log UFC/mL di siero) per un tempo stabilito (T1).

- **Nebulizzazione:** La stessa soluzione usata per l'immersione è stata posta sterilmente in un recipiente dotato di tappo spray in grado di nebulizzarlo. Le forme così trattate sono state ricoperte completamente su tutte le superfici.
- **Spargimento manuale del concentrato:** Una parte del pellet descritto nelle condizioni precedenti è stato risospeso in un volume inferiore di soluzione salina rispetto a quello iniziale, così da concentrare la biomassa (concentrazione iniziale di 9 log UFC/mL). Il concentrato è stato versato sulle forme di caciotta e sparso manualmente.

Tutti i formaggi una volta trattati sono stati posti sopra un vassoio sterile, siglati per un successivo riconoscimento e posti una notte in cella a 4°C. Il giorno seguente sono stati recuperati dalla cella e campionati.

3.2.2. Tempo e momento di trattamento

Per quanto riguarda il trasferimento di *Y. lipolytica* sulla superficie dei formaggi, sono stati testati tempi (T1, T2, T3) e momenti differenti (d0 e d1). In tutto sono state testate sette condizioni, tra cui il controllo. Lo schema della prova è rappresentato di seguito:

- 1) **Controllo:** caciotta prodotta (d0) e ricoperta con microcovering (E235+E201) (d1);
- 2) **Yarrowia T1-d0:** Caciotta prodotta (d0) e immersa in siero contenente *Y. lipolytica* per T1 (d0);
- 3) **Yarrowia T2-d0:** Caciotta prodotta (d0) e immersa in siero contenente *Y. lipolytica* per T2 (d0);
- 4) **Yarrowia T3-d0:** Caciotta prodotta (d0) e immersa in siero contenente *Y. lipolytica* per T3 (d0);
- 5) **Yarrowia T1-d1:** Caciotta prodotta (d0) e immersa in siero contenente *Y. lipolytica* per T1 (d1);
- 6) **Yarrowia T2-d1:** Caciotta prodotta (d0) e immersa in siero contenente *Y. lipolytica* per T2 (d1);
- 7) **Yarrowia T3-d1:** Caciotta prodotta (d0) e immersa in siero contenente *Y. lipolytica* per T3 (d1);

In breve, l'effetto dell'immersione dei formaggi è stato valutato sia variando la durata di immersione (T1-T2-T3) che il momento di immersione (d0, lo stesso giorno di produzione; d1, il giorno dopo la produzione). Una volta trattati i formaggi sono stati risposti in cella frigo (4°C) per una notte e successivamente trasferiti in cella a 6°C. Il campionamento è stato effettuato dopo 1 e 7 giorni dal trattamento, in base al tipo di prova.

3.3. Trattamento con *Y. lipolytica* e microcovering

Dato che nella produzione di formaggio tradizionale è presente uno step di copertura delle forme con microcovering contenente natamicina e potassio sorbato, l'effetto della presenza/assenza di tale prodotto sulla capacità di legame superficiale e crescita di *Y. lipolytica* è stata valutata nel tempo. A d1, giorno successivo alla produzione, alcuni formaggi sono stati ricoperti con microcovering mentre altri no. A d2, tutti i formaggi sono stati immersi nella soluzione contenente *Y. lipolytica*. In questa prova è stato valutato il trattamento per immersione rapida e quello prolungato. I campioni sono stati conservati a 6°C per 1, 7 e 14 giorni al termine dei quali è stato eseguito il campionamento.

3.3.1. Effetto del microcovering su *Y. lipolytica*

È stato testato l'effetto del microcovering e del solo sorbato di sodio su diversi ceppi di *Y. lipolytica* (DG1-DG3-DG5-DG8-DG9-DG10) attraverso la diffusione in piastre YPD di diverse concentrazioni

del prodotto (Agar-well diffusion method). Le concentrazioni prescelte sono state tal quale (TQ), 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, ottenute mediante diluizione. Si è poi proceduto ottenendo quattro pozzetti per ogni piastra, riservando due pozzetti per ogni concentrazione e procedendo così in duplicato. I pozzetti sono stati scavati con un puntale sterile per micropipette sotto la cappa aspirante (SterilGard III Advance, The Baker Company, Sanford ME, USA) per mantenere le condizioni di sterilità. Tutte le piastre sono poi state poste in fase di incubazione a temperatura ambiente, circa 27°C, per un tempo di 72h. Una volta sviluppati i ceppi e formatosi l'alone di inibizione, la sensibilità del ceppo è stata calcolata mediante misurazione del diametro in centimetri, con un righello, dell'alone di inibizione (figura 11) facendo una media aritmetica del duplicato.



Fig. 11: Valutazione della sensibilità del ceppo al microcovering mediante tecnica "Agar-well diffusion"

3.4. Prova su scala semi-industriale

Dopo la caseificazione i formaggi sono stati trattati al d1 mediante immersione rapida nella soluzione contenente *Y. lipolytica* e potassio sorbato. Per quanto riguarda il controllo è stata prodotta una caciotta tradizionale. I formaggi, successivamente al trattamento sono stati conservati secondo le specifiche di maturazione delle caciotte. Analisi chimiche (composti volatili e acidi grassi liberi) e microbiologiche (quantificazione di lieviti, batteri lattici e *Listeria monocytogenes*) sono state effettuate a 30 giorni di maturazione. Per i conteggi microbiologici i campioni sono stati analizzati immediatamente, mentre per le analisi chimiche i campioni sono stati conservati a -20°C prima di essere analizzati.

3.5. Campionamento microbiologico

Il campionamento di *Y. lipolytica* è stato effettuato mediante diluizioni seriali decimali in soluzione salina e un'aliquota nota di ciascuna diluizione è stata piastrata superficialmente su terreno di coltura selettivo per il lievito. Le forme di caciotte sono state campionate inizialmente in due diverse modalità: la caciotta è stata dapprima tagliata in condizioni sterili in otto fette e poi è stata prelevata o la sola superficie del formaggio (Superficie) oppure la fetta intera (Totale). Sia la superficie che il totale è stato preso da vari punti del formaggio. Una volta saggiato il tipo di campionamento, per le prove successive si è sempre eseguito campionamento superficiale. 25 g dei campioni prelevati sono stati inseriti in buste sterili per il campionamento, contenenti una membrana filtrante. Ad essi sono stati addizionati stesse quantità in peso di acqua fisiologica (diluizione 1:1). Successivamente sono stati posti nello Stomacher (BagMixer, Interscience, Francia) per 3 minuti. Una volta che il campione è stato omogenizzato si è proceduto al campionamento mediante diluizione seriali decimali in soluzione salina, e un'aliquota nota di ciascuna diluizione è stata pipettata sui terreni di coltura selettivi agarizzati, tramite piastramento superficiale.

3.5.1. Lieviti

Per i lieviti si è utilizzato Yeast extract Peptone Dextrose (YPD – Oxoid, Milano, Italia).

Composizione del terreno:

- Estratto di lievito (10g/L);
- Peptone (10g/L);
- D-glucosio (20g/L);
- Cloramfenicolo (0.2g/L);
- Agar (16g/L);

Una volta risospeso, il terreno è stato autoclavato a 121 °C per 15 minuti e poi versato nelle piastre petri. La conta delle colonie di lievito è stata fatta dopo incubazione a temperatura ambiente per 48-72h.

3.5.2. Batteri lattici

Per quantificare i batteri lattici è stato utilizzato il terreno De Man Rogosa Sharpe (M.R.S. – Oxoid, Milano, Italia). Una volta risospeso, il terreno è stato autoclavato a 121 °C per 15 minuti, supplementato con cicloesimide (0,2 g/L) e, infine, versato nelle piastre petri. La conta delle colonie di batteri lattici è stata fatta dopo incubazione a 37 °C per 48h.

3.5.3. Positività a *Listeria monocytogenes*

Per testare la positività dei formaggi a *L. monocytogenes* è stato fatto prima un pre-arricchimento mettendo 25 g di campione in 225 mL di Terreno di Arricchimento per *Listeria* (UVM1) (Oxoid, Milano, Italia). Passate 24h a 37 °C, 0.1 mL sono stati trasferiti in 10 mL di terreno liquido Fraser (Oxoid, Milano, Italia) ed incubati nuovamente a 37 °C per 24h. Un'ansata di questo arricchimento è stata piastrata su tre terreni specifici per *L. monocytogenes* (ALOA e Palcam agar base, Oxoid, Milano, Italia) incubati per ulteriori 24h. La positività al microrganismo si ha in presenza di colonie cresciute sui diversi terreni. Questa analisi è stata fatta in triplicato per ogni campione.

3.6 Analisi dei composti volatili

La tecnica di microestrazione in fase solida (SPME), abbinata alla gas-cromatografia (GC) e alla spettrometria di massa (MS) è la metodologia utilizzata per la caratterizzazione delle molecole volatili. 3 g di formaggio sono stati inseriti in un vial e ad essi è stato aggiunto lo standard interno, 4-metil-2-pentanololo a 200 ppm (concentrazione finale). Infine, i vial sono stati chiusi ermeticamente con setto e ghiera metallica. Per l'analisi SPME-GC/MS i campioni sono stati prima condizionati ad una temperatura di 40°C per 10 minuti. Successivamente si è passati alla fase estrattiva che avviene esponendo la fibra (SPME Carboxen/PDMS, 85µm, Stalleflex Supelco, Bellefonte, PS, USA) allo spazio di testa del campione da analizzare; in tale fase gli analiti si ripartiscono tra il campione e la fibra fino al raggiungimento di un equilibrio. La durata di questa fase è stata di 30 minuti, tempo necessario per permettere l'adsorbimento delle molecole volatili presenti allo stato di vapore. Trascorso il tempo indicato, le molecole adsorbite sulla superficie della fibra sono state fatte desorbire in colonna Chrompack CP-Wax 52 CB (Chrompack, Middelburg, Olanda) con le seguenti caratteristiche: lunghezza 50 metri, diametro interno 0.32 mm per un tempo di 10 minuti. L'analisi è stata eseguita con un gascromatografo Agilent Technology 7890N, Network GC System abbinato a uno spettrometro di massa Network Mass Selective detector HP 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Il programma utilizzato era il seguente: 50°C per 1 minuto, con successivo aumento di 4.5°C/min fino a 65°C e ulteriore aumento di 10°C/min fino a 230°C. Come gas carrier è stato

usato l'elio ad un flusso di 1 mL/min; mentre, le temperature dell'iniettore, dell'interfaccia e della sorgente di ioni erano 250 °C per i primi due e 230°C per la terza. L'impatto elettronico è avvenuto a 70 eV e ha portato alla frammentazione di ioni che sono poi stati separati con un analizzatore di massa a quadrupolo. L'identificazione delle diverse molecole aromatiche è stata svolta mediante confronto tra gli spettri di massa ottenuti e quelli di composti puri presenti nelle librerie NIST (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 2011.

3.6.1. Acidi grassi liberi

Gli acidi grassi sono stati estratti dai formaggi (sia superficie che parte interna) e quantificati mediante il metodo riportato di seguito, dopo 30 giorni di maturazione. 20 g di campione sono stati posti in una beuta in cui sono stati aggiunti 100 mL di cloroformio:metanolo (1:1). I campioni sono stati posti in stufa a 60 °C per 20 minuti e successivamente si sono aggiunti 75 mL di cloroformio. La soluzione è stata filtrata su carta Watmann e introdotta in imbuto separatore. Ad esso sono stati aggiunti 35 mL di KCl 1M e lasciato incubare a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno successivo, la fase organica è stata filtrata su NaSO₄ e collezionata in palloni di vetro. I campioni sono stati portati a secco (40 °C per 10 min a 200 rpm) mediante l'ausilio di un rotavapor (IKA RV8). La sostanza grassa è stata pesata e risospesa in esano prima di riporla a -20 °C. Gli acidi grassi liberi sono stati estratti in fase solida (SPE) mediante l'ausilio di colonnine NH₂ dopo loro attivazione. Gli acidi grassi liberi sono stati eluiti con dietil-etero contenente 2% di acido formico. I campioni sono stati portati a secco, pesati, derivatizzati con qualche goccia di diazometano e risospesi in esano per ottenere una concentrazione finale di 20 mg/mL. Uno standard interno (C13 metilato) è stato aggiunto alla concentrazione finale di 25 ppm. Gli acidi grassi liberi sono stati separati mediante GC-MS colonna Agilent J&W DB-5 (Agilent Technologies, USA) con le seguenti caratteristiche: lunghezza 60 metri, diametro interno 0.25 mm. L'analisi è stata eseguita con GC-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Il programma utilizzato era il seguente: 130 °C per 7 minuti, con successivo aumento di 14 °C/min fino a 180°C, sosta di 5 minuti, ulteriore aumento di 8 °C/min fino a 240 °C dove rimane per 27 minuti. Come gas carrier è stato usato l'elio ad un flusso di 1 mL/min. Il campione è stato analizzato in modalità split 30:1. L'impatto elettronico è avvenuto a 70 eV e ha portato alla frammentazione di ioni che sono poi stati separati con un analizzatore di massa a quadrupolo. L'identificazione dei diversi acidi grassi è stata svolta mediante confronto tra gli spettri di massa ottenuti e quelli di composti puri presenti nelle librerie NIST (NIST/EPA/NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 2011. I risultati sono la media delle due ripetizioni effettuate per ogni campione.

4. OBIETTIVI

Questa tesi sperimentale si va a collocare all'interno di un progetto più articolato che ha il fine di produrre formaggi di tipo caciotta a rapida maturazione grazie all'impiego, come co-starter, del lievito *Yarrowia lipolytica*.

La maturazione dei formaggi è un processo importante nella caseificazione perché va a definire aroma, texture e corpo del prodotto finale. Questi parametri sono il risultato di una cascata di eventi biochimici e microbiologici, mediati dal flusso metabolico di starter, co-starter e microrganismi ambientali in sinergia con enzimi del latte e del caglio. Si tratta di un processo lento, complesso, ed economicamente dispendioso (Beresford et al. 2001). Pertanto, risulta importante trovare strategie volte a velocizzare il tempo di maturazione, riducendo in questo modo anche i costi di produzione, senza impattare drasticamente sugli attributi sensoriali dei formaggi e sulla loro qualità. A tal proposito, diversi studi hanno valutato l'aggiunta nella cagliata di enzimi chiave per la maturazione, come ad esempio lipasi e proteasi, per aumentarne l'attività (Rani e Jagtap, 2019). Un'altra strategia, invece, può essere quella di aggiungere co-starter come batteri lattici nella cagliata (Asahina et al., 2020). In questo caso si parla di un processo a maturazione interna. Alternativamente, l'aggiunta di co-starter all'esterno del formaggio, favorirebbe una maturazione superficiale.

Yarrowia lipolytica è un lievito non convenzionale dalle caratteristiche industrialmente molto interessanti. Anche se in certi prodotti è stata associata a processi degradativi, questo lievito rappresenta uno tra i più abbondanti microrganismi non starter, di origine ambientale, presenti in alcuni tipi di prodotti fermentati come formaggi e insaccati. La peculiarità di *Y. lipolytica* è la sua capacità di rilasciare lipasi e proteasi che quindi possono giocare un ruolo fondamentale nei processi di maturazione e nella caratterizzazione sensoriale del prodotto finale. Nel lavoro di Lanciotti et al. (2005) *Y. lipolytica* era già stata utilizzata per la produzione di formaggi dimostrandosi in grado di accelerare i processi lipolitici e proteolitici, determinando la produzione di formaggi con caratteristiche organolettiche specifiche. Tuttavia, l'applicazione del co-starter era avvenuta centrifugando il lievito e addizionandolo direttamente nella cagliata.

Lo scopo di questo progetto è quello di valutare l'aggiunta di *Y. lipolytica* seguendo un nuovo approccio. Basandosi sulle caratteristiche metaboliche di *Y. lipolytica*, che è un lievito strettamente aerobio, si è voluto ottimizzare il processo del suo trasferimento solo a livello superficiale. Pertanto, in questa tesi sperimentale, si è andati prima ad ottimizzare la procedura di trasferimento del lievito sulla superficie del formaggio. Per far ciò si è valutato il processo tradizionale seguito nel caseificio e, in base a quello, si sono selezionati e testati metodi alternativi in modo tale da poterli integrare al processo già in atto nell'azienda. Successivamente, si sono comparati due metodi diversi di campionamento che tenevano in considerazione solo la parte superficiale del formaggio o intere fette del prodotto. In base ai dati ottenuti si è effettuata una prima prova preliminare in azienda. Sui formaggi prodotti si sono valutati: carica microbiologica, profilo volatile e acidi grassi generati.

5. RISULTATI

5.1. Tipo di trattamento superficiale

Tre tipi di trattamento sono stati testati per trasferire *Yarrowia lipolytica* sulle superfici dei formaggi: immersione, nebulizzazione, spargimento manuale di un concentrato di lievito. Una volta trattati i campioni, sono stati lasciati a 4°C una notte e il giorno successivo sono stati campionati. Partendo da una concentrazione iniziale del lievito di 8 log UFC/mL di siero (9 per quello concentrato), i tre diversi processi di applicazione avevano poi determinato una concentrazione finale sul prodotto di 5.7±0.3, 6.1±0.1 e 6.9±0.3 Log UFC/g, rispettivamente. Come è possibile evincere dai conteggi, l'uso del prodotto concentrato favorirebbe il processo con una resa maggiore, dato che con gli altri due trattamenti era stato ottenuto un 1 Log in meno. Allo stesso tempo, non si erano osservate differenze significative tra il trattamento per immersione e quello per nebulizzazione. Da un punto di vista tecnico/pratico, lo spargimento di *Yarrowia* concentrata sarebbe il meno funzionale dato che richiederebbe comunque fasi di centrifugazione e quindi costi aggiuntivi. Le altre due opzioni, da questo punto di vista, potrebbero essere quelle meno impattanti. Inoltre, da un punto di vista microbiologico, la possibilità di avere superficialmente concentrazione di *Y. lipolytica* dell'ordine di 5.7-6.1 Log UFC/g, invece che 6.9 Log UFC/g, potrebbe favorire una maturazione accelerata ma senza eccessi di lipolisi e proteolisi che poi andrebbero ad avere in impatto negativo sul prodotto finale. Pertanto, tra i due processi rimasti, è stato deciso di proseguire con quello ad immersione dato che una fase simile era già presente nel processo produttivo.

5.2. Tempo e momento di trattamento

Il trattamento superficiale con *Yarrowia lipolytica* potrebbe essere effettuato in diversi modi. Per definire come procedere, si è prima analizzato il processo tradizionale seguito nel caseificio e in base a quello si sono selezionati e testati dei modi alternativi integrabili al processo già in uso. Nel processo tradizionale, le forme, appena generate (d0), vengono conservate una notte a 4°C per consentire un ulteriore spurgo del siero. Il giorno seguente (d1), prima di essere messe in cella di stagionatura a 6-7°C per un mese, i formaggi vengono ricoperti con un microcovering contenente natamicina e potassio sorbato. Partendo da queste informazioni, si è deciso di testare il trattamento con *Y. lipolytica* sia a d0 che d1.

Tabella 1: Trattamento subito dopo produzione (d0)

	Giorno 1		Giorno 7	
	Totale	Superficie	Totale	Superficie
C	-	-	-	3.9
T1	5.6	6.0	6.8	7.1
T2	5.3	6.0	6.9	7.0
T3	5.7	5.4	7.0	7.0

Il procedimento per immersione è stato valutato su formaggi andando a variare il tempo di trattamento. Infatti, una volta prodotte, le forme sono state immediatamente (d0) immerse nella soluzione contenente *Yarrowia lipolytica* con una carica iniziale di circa 8 Log UFC/mL. Il trattamento volto a trasferire il lievito sulla superficie dei formaggi è stato effettuato attraverso immersioni a tempi specifici (T1, T2 e T3). Al termine del trattamento, l'eccesso di liquido è stato

fatto scolare e i formaggi sono stati stoccati a 4°C fino al giorno seguente. A quel punto i campioni sono stati campionati in due diversi modi: prelevando la sola superficie del formaggio (superficie) oppure utilizzando fette intere (Totale). Dato che il lievito era stato aggiunto superficialmente, si voleva vedere se c'era una differenza nei due tipi di campionamento. Le diluizioni seriali decimali sono poi state piastrate su terreno YPD. Come è possibile vedere dalla tabella 1, i valori del campionamento superficiale erano tendenzialmente più alti rispetto a quelli totali, tuttavia la differenza in alcuni casi non era significativa. Non si sono notate differenze significative nemmeno a seguito dei vari tempi di trattamento, infatti, i conteggi erano dell'ordine di circa 5.5 Log CFU/g (campionamento totale) e 6 Log CFU/g (campionamento superficiale). Al giorno 1, il controllo non presentava lieviti. Nei campioni analizzati dopo 7 giorni di conservazione a 6°C non solo *Yarrowia lipolytica* era ancora presente ma la sua concentrazione era aumentata di 1-1.5 Log/g. Anche nel controllo erano stati quantificati dei lieviti, di tipo ambientale, ma solo con il campionamento superficiale. In generale quindi, campionamenti superficiali portano in alcune condizioni ad avere valori più alti, anche se non sempre significativi. Inoltre, i tempi di trattamento testati non sono risultati significativamente diversi.

Tabella 2: Trattamento dopo incubazione overnight a 4°C (d1)

	Giorno 1		Giorno 7	
	Totale	Superficie	Totale	Superficie
C	-	-	4.5	5.1
T1	5.9	6.5	6.9	7.5
T2	5.8	6.6	7.0	7.8
T3	5.6	6.6	7.5	8.0

Successivamente si è saggiato il trattamento con *Y. lipolytica* dopo la notte passata a 4°C, e non, come fatto sopra, il giorno stesso della produzione. Partendo da una concentrazione di lievito in siero di 8 Log UFC/mL, i conteggi ottenuti nel campionamento effettuati il giorno successivo al trattamento erano stati dell'ordine di tra 5.6 e 5.9 Log UFC/g (totale) e tra 6.5-6.6 Log UFC/g (superficiale). Questi valori sono tendenzialmente più alti rispetto a quelli ottenuti con il trattamento effettuato il giorno stesso della produzione. Probabilmente la conservazione a 4°C per l'intera notte aveva eliminato l'eccesso di terreno derivante dalla lavorazione e aveva permesso una migliore adesione di *Y. lipolytica*. Anche in questo caso, come nel precedente, la conservazione per successivi 7 giorni a 6°C aveva portato ad un aumento della concentrazione finale del co-starter. Tuttavia, in questo caso il campionamento superficiale determinava una capacità di quantificare *Y. lipolytica* superiore di 0.5 Log UFC/g. Dato che il campionamento superficiale garantiva di quantificare meglio *Y. lipolytica*, seppure in alcuni casi le differenze non erano significative, si è deciso nelle fasi successive di proseguire con l'analisi della sola superficie.

5.3. *Yarrowia* con o senza microcovering

Nella produzione di formaggio simil-caciotta il processo prevede l'applicazione di un microcovering composto dall'antibiotico natamicina e il preservante potassio sorbato. Pertanto, si è voluto valutare l'impatto di tale componente sui formaggi trattati con *Yarrowia*. In questo caso, i formaggi trattati o meno con microcovering (d1) sono poi stati ricoperti con *Y. lipolytica* (d2). Dato che nelle prove precedenti i tempi testati non sembravano impattare la quantità di cellule trasferite, in questa prova si

è testato anche una semplice immersione veloce nella soluzione contenete il lievito. I campioni sono stati analizzati a 1, 7 e 14 giorni dal trattamento.

Tabella 3: Trattamento dei formaggi con microcovering

	Giorno campionamento	Conteggi (Log UFC/g)	
		<i>Y. lipolytica</i>	Altri lieviti
Controllo	giorno 1	nd	4.5
	giorno 7	nd	3.8
	giorno 14	nd	4.1
Trattamento veloce	giorno 1	4.2	5.2
	giorno 7	3.8	4.1
	giorno 14	nd	4.9
Trattamento lungo	giorno 1	4.5	5.0
	giorno 7	4.0	3.9
	giorno 14	nd	4.5

Tabella 4: Trattamento con *Yarrowia* e senza microcovering sui formaggi

	Giorno campionamento	Conteggi (Log UFC/g)	
		<i>Y. lipolytica</i>	Altri lieviti
Controllo	giorno 1	nd	3.6
	giorno 7	nd	3.8
	giorno 14	nd	5.0
Trattamento veloce	giorno 1	4.9	3.6
	giorno 7	5.2	nd
	giorno 14	5.5	nd
Trattamento prolungato	giorno 1	4.8	3.6
	giorno 7	5.3	nd
	giorno 14	5.7	nd

In tabella 3 sono riportati i conteggi di lieviti su formaggi trattati con microcovering. Al giorno 1, *Yarrowia* era presente solo nei campioni trattati e non nel controllo, dove invece erano presenti lieviti indigeni (4.5 Log UFC/g) probabilmente derivanti da contaminazioni ambientali del caseificio. Diversamente dalle prove precedenti, *Yarrowia* era presente sui formaggi ad una concentrazione inferiore (4.2-4.5 Log UFC/g) molto probabilmente dovuto al fatto che l'inoculo si era fermato a 7.4 Log UFC/mL. Guardando i conteggi nei tempi successivi, si evince che la presenza di microcovering aveva avuto un effetto negativo su *Yarrowia*. Infatti, il co-starter si era ridotto fino al giorno 14, quando non era più possibile quantificarlo. Al contempo, i lieviti indigeni, pur subendo un rallentamento nella crescita rimanevano presenti sia nel controllo che nei trattati.

La prova era stata fatta anche con formaggi non trattati con microcovering ma solo con *Y. lipolytica* (Tab. 4). In questo caso, dopo trattamento, la carica del lievito si aggirava intorno ai 4.8-4.9 Log UFC/g, supportando il fatto che la bassa carica iniziale dipendesse più dallo scarso inoculo che dall'effetto del microcovering, il quale tuttavia aveva avuto un effetto blando. La differenza più grande si notava però nei campionamenti effettuati al giorno 7 e 14. Infatti, *Y. lipolytica* era rimasta vitale ed era cresciuta fino a raggiungere valori uguali o superiori a 5.5 Log UFC/g nel tempo finale.

Inoltre, la crescita del co-starter aveva inibito i lieviti indigeni, che invece erano cresciuti in presenza di microcovering o nei controlli.

5.4. Effetti del microcovering su diversi ceppi di *Yarrowia*

Gli effetti inibenti del microcovering (natamicina e potassio sorbato) e del solo potassio sorbato sono stati poi valutati su diversi ceppi di *Y. lipolytica*. Il test era stato fatto mediante diffusione in piastre YPD di diverse concentrazioni del prodotto. Come è possibile notare dalla figura 12, il microcovering ha un effetto inibente nei confronti di tutti i ceppi testati. Tale effetto si va a ridurre diluendo il prodotto. Andando poi a testare l'effetto del solo potassio sorbato non c'è stata alcuna inibizione (dati non disponibili). Pertanto, come era prevedibile, l'elemento limitante risultava la natamicina, un agente antifungino. Se però, come visto nella prova precedente, la crescita di *Yarrowia* potesse inibire la crescita dei lieviti indigeni, la natamicina potrebbe essere sostituita dall'aggiunta del solo lievito addizionato di potassio sorbato.

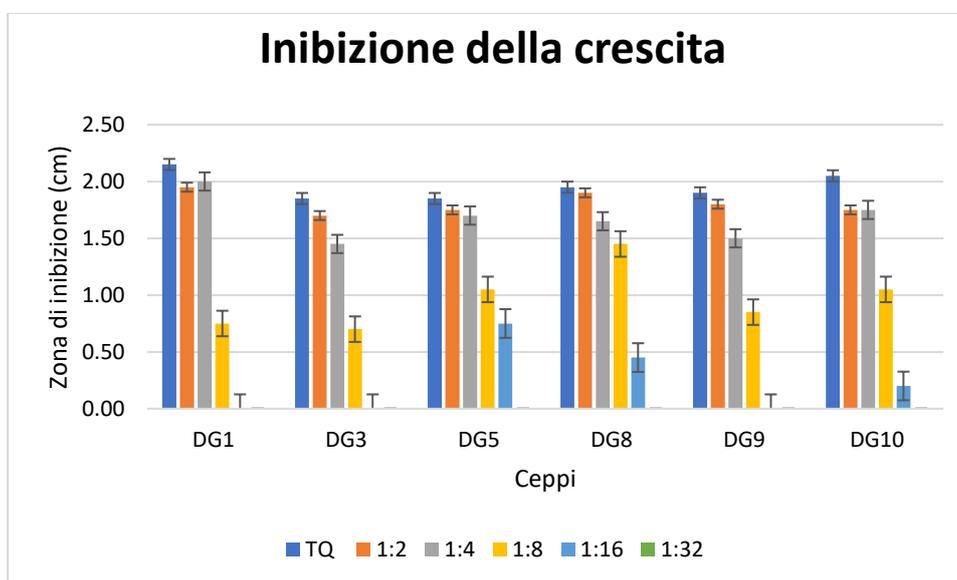


Fig. 12: Valutazione dell'inibizione delle crescite di *Yarrowia* in presenza del microcovering (natamicina+potassio sorbato) a diverse diluizioni. I risultati sono la media di un esperimento effettuato in duplicato.

5.5. Prova su scala semi-industriale

Dai dati ottenuti precedentemente è stato deciso di effettuare un test preliminare di caseificazione a livello semi industriale in cui i formaggi venivano trattati a d1 mediante una veloce immersione nella soluzione contenente *Yarrowia lipolytica* e potassio sorbato. Come controllo si andava ad utilizzare un formaggio prodotto tradizionalmente. I formaggi sono stati conservati per 30 giorni a 8 °C, al termine dei quali si era proceduto con una caratterizzazione microbiologica e chimica.

Le principali specie di microrganismi di interesse quali batteri lattici, lieviti e possibili patogeni come *L. monocytogenes* sono state quantificate mediante piastramento. Per quanto riguarda i lieviti (Tab. 5), il controllo aveva una carica di 5.5 Log UFC/g mentre il campione trattato con *Yarrowia* aveva una carica totale di 5.0 Log UFC/g, di cui 4.5 Log UFC/g corrispondevano al co-starter. La bassa concentrazione di *Yarrowia* a 30 giorni poteva dipendere sia dal basso inoculo che era stato usato per trattare i formaggi (7.5 Log UFC/mL), sia dal fatto che il campionamento era stato fatto solo a fine

maturazione. Tuttavia, la presenza di *Yarrowia* aveva limitato lo sviluppo dei lieviti totali senza l'utilizzo di natamicina. Per quanto riguarda i batteri lattici e mesofili totali (Fig. 15), non si è osservata una differenza significativa tra controllo e trattato. La ricerca di listeria è stata negativa.

Tabella 5: Conteggi (espressi come Log UFC/g) dei microrganismi sui formaggi al giorno 30. LAB: Batteri lattici. I risultati sono la media di un campionamento fatto su 3 formaggi per condizione.

	Lieviti		Batteri	
	Totali	<i>Y. lipolytica</i>	Mesofili totali	LAB
Controllo	5.5	Nd	9.5	6.4
Formaggio con <i>Yarrowia</i>	5	4.5	9.2	6.7

Uno degli elementi importante nel processo di maturazione è dato dalla produzione di composti volatili caratteristici. Pertanto, tali composti sono stati identificati e quantificati mediante la tecnica SPME abbinata a GC-MS. Più di 60 molecole, appartenenti al gruppo di alcoli, aldeidi, chetoni e acidi, sono state quantificate nei due tipi di formaggio (Tab. 6).

Tabella 6: Concentrazione (ppm) delle principali classi volatili identificate mediante SPME-GC/MS sullo spazio di testa.

	Controllo	Formaggio con <i>Y. lipolytica</i>
Esteri	1.53	1.90
Alcoli	32.98	43.22
Aldeidi e chetoni	102.32	108.22
Acidi	104.01	107.09
Composti solforati	4.10	5.95

Le concentrazioni delle varie classi di molecole, seppur tendenzialmente più alte nel prodotto con *Y. lipolytica*, non erano significativamente diverse tra i due formaggi, ad eccezione degli alcoli. Infatti, l'alcol 2-feniletilico e 1-esanolo erano significativamente maggiori nel prodotto addizionato con *Y. lipolytica* ($p < 0.05$). Un altro aspetto che può essere modificato a seguito dell'aggiunta di *Yarrowia* è la composizione della sostanza grassa del formaggio. In particolare, l'attività lipolitica di *Yarrowia* favorisce il rilascio di acidi grassi liberi che vanno ad apportare caratteristiche sensoriali come sapidità e piccantezza. Inoltre, sono precursori di altre sostanze aromatiche volatili come gli idrossiacidi, i lattoni e gli alcoli secondari. A partire dagli acidi grassi insaturi si possono formare aldeidi e da esse acidi ed alcoli che reagendo ulteriormente fra loro possono formare gli esteri, molecole particolarmente aromatiche e desiderate in un formaggio. La modulazione della lipolisi e del catabolismo degli acidi grassi liberi è un potente strumento per innovare nel settore caseario. I formaggi trattati con *Yarrowia* erano caratterizzati da quantità maggiori di C10:0, C18:1 e C18:2 (Fig. 15 e 16). Questo, inoltre, comportava un aumento del pool di acidi grassi insaturi, rispetto al controllo. Tali differenze si erano osservate solo a livello della superficie del formaggio e non della parte centrale.

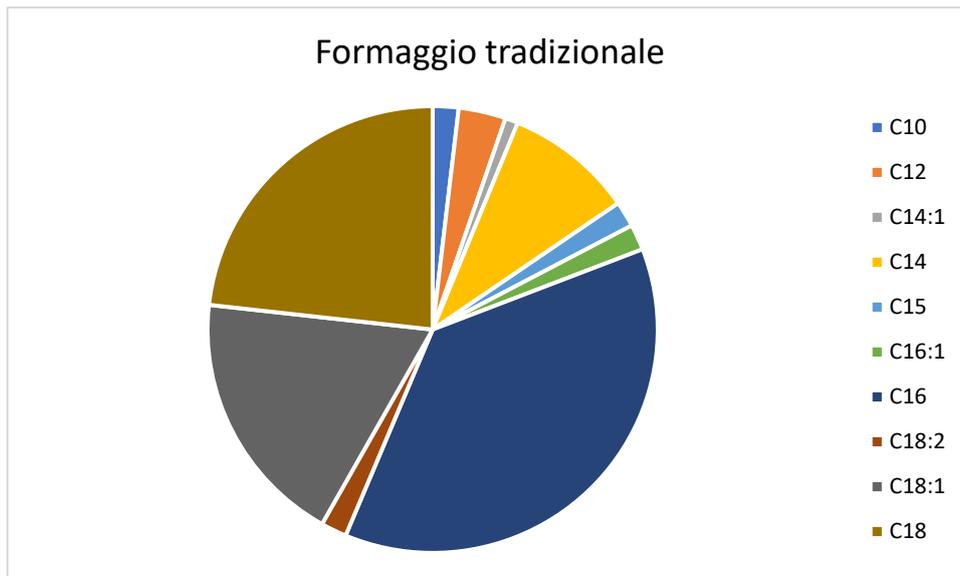


Fig. 15: *Quantità relativa (%) di acidi grassi liberi presenti sulla superficie del formaggio tradizionale (controllo).*

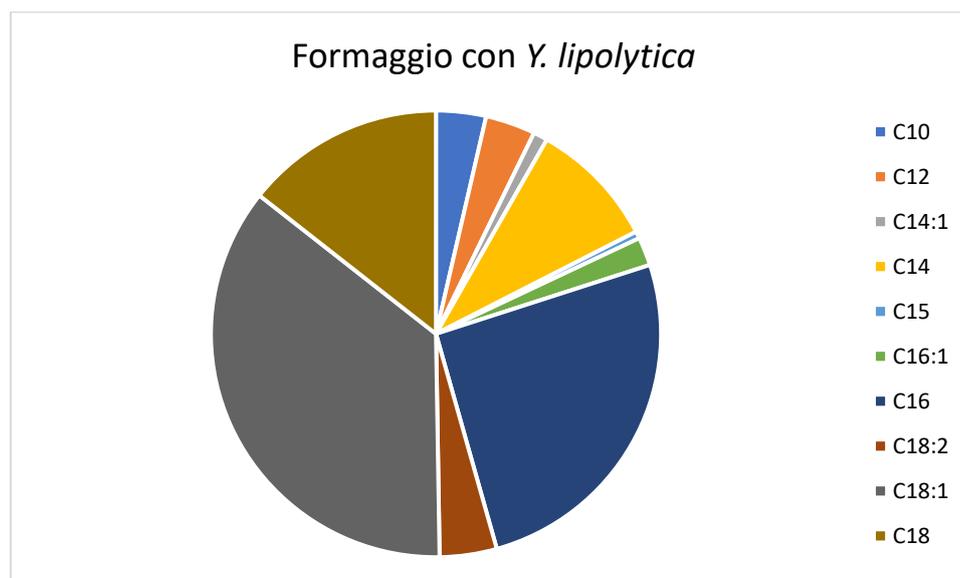


Fig. 16: *Quantità relativa (%) di acidi grassi liberi presenti sulla superficie del formaggio trattato con *Y. lipolytica* e potassio sorbato.*

6. CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi sperimentale è stato quello di definire i parametri per l'applicazione di *Y. lipolytica* sui formaggi al fine di produrre nuovi prodotti innovativi ad accelerata maturazione.

La prima parte del lavoro si è focalizzata sul tipo di trattamento superficiale da applicare. Seppure lo spargimento a mano dei formaggi con biomassa di *Yarrowia* permettesse di ottenere quantità maggiori di lievito sul prodotto, il trattamento per immersione, con un'adesione leggermente inferiore, rappresentava comunque un processo più pratico e facilmente spendibile in azienda. Successivamente si è valutato il momento migliore per effettuare il trattamento, su formaggi appena formati o nel giorno successivo. Come descritto nei risultati, l'applicazione di *Y. lipolytica* il giorno dopo la produzione permetteva una maggiore adesione del lievito. Tale adesione era indipendente rispetto alla durata del trattamento, pertanto tempi più brevi sarebbero sicuramente più vantaggiosi nel processo ricercato. Infine, il trattamento di *Y. lipolytica* è stato testato contemporaneamente all'impiego di antibiotico e potassio sorbato, che viene usato generalmente nei prodotti tradizionali. Dato che il lievito era sensibile alla natamicina ma non al potassio sorbato, si è deciso di testare un covering contenente *Yarrowia* e sorbato ma non l'antimicotico.

In base a queste ottimizzazioni, è stata effettuata una prima prova preliminare in scala industriale per comparare gli effetti del trattamento con *Yarrowia* rispetto ad un prodotto tradizionale. Seppur la quantità di *Yarrowia* misurata non fosse elevata, la sua presenza aveva comunque permesso una differenziazione dal controllo. Le differenze erano principalmente legate al rilascio di composti volatili capaci di modulare l'aroma del prodotto e di acidi grassi liberi insaturi. Questa prima prova, tuttavia, è stata valutata solo alla fine del processo di maturazione, pertanto non è stato possibile valutare se il campione contenente *Y. lipolytica* avesse raggiunto una maturità prima del controllo. Inoltre, l'inoculo di partenza, utilizzato per trattare i formaggi, non è stato ottimale, infatti, la concentrazione iniziale era di 7 Log UFC/mL. Tale valore può essere migliorato fino ad 8 Log UFC/mL, andando così ad incrementare anche le cellule del lievito trasferite sul prodotto ad inizio maturazione. Infine, questa prima prova sperimentale è stata eseguita solo con un ceppo di *Y. lipolytica*. Altri ceppi potrebbero dare risultati superiori o più marcati.

In conclusione, è stato messo a punto un processo per la produzione di caciotte innovative basate sull'utilizzo di *Y. lipolytica*. Il prossimo passaggio sarà quello di testare altri ceppi dalle diverse proprietà lipolitiche e proteolitiche ed andare a valutare nel tempo le modificazioni dei formaggi non solo dal punto di vista microbiologico e aromatico ma anche sensoriale (texture, colore, gusto, aroma).

7. BIBLIOGRAFIA

- Dalla Riva A, Burek j., Kim D, Thoma G., Cassandro M. e De Marchi M., (2017). The environmental analysis of asiago PDO cheese: a case study from farm gate-to-plant gate. *Animal derived food quality and safety*, pages 250-262.
- Almena-Aliste M., Mietton B., (2014). The microbiology of traditional hard and semihard cooked mountain cheeses. *Microbiology Spectrum* 2(1):CM-0003-2012.
- Almena-Aliste M., and Mietton B. (2014). Cheese Classification, Characterization, and Categorization: A Global Perspective. *Microbiology Spectrum*, 2(1).
- Prazeres A.R., Carvalho F., Rivas J., (2012). Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, volume 110, Pages 48-68.
- André A., Chatzifragkou A., Diamantopoulou P., Sarris D., Philippoussis A., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S., (2009). Biotechnological conversions of bio-dieselderived crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* strains. *Engineering in Life Sciences*, 9(6), 468–478.
- Bellou S., Triantaphyllidou I. E., Mizerakis P. Aggelis, G., (2016). High lipid accumulation in *Yarrowia lipolytica* cultivated under double limitation of nitrogen and magnesium. *Journal of Biotechnology*, 234, 116–126.
- Beopoulos T., Desfougeres J., Sabirova S., Zinjarde C., Nicaud N.J.M., (2010). The hydrocarbon-degrading oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. K.N. Timmis (Ed.), *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 2111-2121.
- Brik, H. (1981). Natamycin. In *Analytical Profiles of Drug Substances*, Vol. 10 (ed. K. Florey), Academic Press, New York, pp. 513–561.
- Clark W.L., Shirk R.J., e Kline E.F., (1964). Pimaricin, a new food fungistat. In *Microbial Inhibitors in Food* (ed. N. Molin), Almquist and Wiksell, Uppsala, pp. 167–184.
- De Ruig W.G. e Van den Berg G., (1985). Influence of the fungicide's sorbate and natamycin in cheese coatings on the quality of the cheese. *Netherlands Milk and Dairy Journal*, 39, 165–172.
- EFSA (European Food Safety Authority), 2019. Outcome of public consultations on the Scientific Opinions of the EFSA Panel on Nutrition, Novel Foods and Food Allergens (NDA) on Dietary Reference Values for sodium and chloride. EFSA supporting publication 2019: 16(9): EN-1679. 39 pp.
- Egermeier M., Russmayer H., Sauer M., e Marx H., (2017). Metabolic flexibility of *Yarrowia lipolytica* growing on glycerol. *Frontiers in Microbiology*, 8(JAN), 1–9.
- Barbieri E., Schiavano G.F., De Santi M., Vallorani L., Casadei L., Guescini M., Gioacchini A.M., Rinaldi L., Stocchi V, Brandi G., (2012). Bacterial diversity of traditional Fossa (pit) cheese and its ripening environment. *International Dairy Journal*, Volume 23, Issue 1, Pages 62-67.
- Caplice E. e Fitzgerald G.F., (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 50, Issues 1–2, Pages 131-149.

- Carvalho F., Prazeres A.R. e Rivas J., (2013). Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. *Science of The Total Environment*, volumes 445–446, Pages 385-396.
- Ferreira A. D. e Viljoen B. C., (2003). Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology* 86, 131– 140.
- Filippousi R., Antoniou D., Tryfinopoulou P., Nisiotou A., Nychas G.-J., Koutinas A. e Papanikolaou S., (2019). Isolation, identification and screening of yeasts towards their ability to assimilate biodiesel-derived crude glycerol: microbial production of polyols, endopolysaccharides and lipid. *Journal of Applied Microbiology*, 127: 1080-1100.
- Patrignani F., Parrotta L., Del Duca S., Vannini L., Camprini L., Dalla Rosa M., Schlüter O. e Lanciotti R., (2020). Potential of *Yarrowia lipolytica* and *Debaryomyces hansenii* strains to produce high quality food ingredients based on cricket powder. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, Volume 119, 108866.
- Barth G. e Gaillardin C., (1996). *Yarrowia lipolytica*. K. Wolf (Ed.), *Nonconventional Yeasts in Biotechnology*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 313-388.
- Suzzi G., Lanorte M.T., Galgano F., Andrighetto C., Lombardi A., Lanciotti R. e Guerzoni M.E., (2001). Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 69, Issues 1–2, Pages 69-77.
- Gatti M., Lazzi C., Rossetti L., Mucchetti G. e Neviani E., (2003). Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 463-470.
- Grembecka M., (2015). Sugar alcohols—their role in the modern world of sweeteners: a review. *Eur Food Research and Technology*, 241, 1–14.
- Gripon J.C., (1993). Mould-Ripened Cheeses. In: Fox P.F. (eds) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. Springer, Boston, MA.
- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F. e Suzzi G., (2001). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 69 79– 89.
- Hoekstra E.S., Van der Horst M.I. e Samson R.A., (1998). Survey of the fungal flora in Dutch cheese factories and warehouses. *Journal of Food Mycology*, 1, 13–22.
- Liu H.H., Ji Xiao-Jun, Huang H., (2015). Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, Volume 33, Issue 8, Pages 1522-1546.
- Remón J., Ruiz J., Oliva M., García L., Arauzo J., (2016) Cheese whey valorisation: Production of valuable gaseous and liquid chemicals from lactose by aqueous phase reforming. *Energy Conversion and Management*, volume 124, Pages 453-469.
- Kandasamy S., Kavitha D. e Shetty P. H., (2018). Lactic Acid Bacteria and Yeasts as Starter Cultures for Fermented Foods and Their Role in Commercialization of Fermented Foods. *Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries*, 25–52.
- Gkatzionis K., Hewson L., Hollowood T., Hort J., Dodd C.E.R. e Linfoth R.S.T., (2013). Effect of *Yarrowia lipolytica* on blue cheese odour development: Flash profile sensory evaluation of microbiological models and cheeses. *International Dairy Journal* 30, 8 e 13.

- Kuttiraja M., Dhouha A., e Tyagi R. D., (2018). Harnessing the Effect of pH on Lipid Production in Batch Cultures of *Yarrowia lipolytica* SKY7. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 184(4), 1332–1346.
- Choi Kyoung-Hee, Lee H., Lee S. e Kim S. e Yoon Y., (2016). Cheese Microbial Risk Assessments - A Review. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, Vol. 29, No. 3:307-314
- Lanciotti R., Vannini L. Lopez C.C., Gobbetti M. e Guerzoni M.E., (2005). Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *International Journal of Dairy Technology*, 58: 89-99.
- Groenewald M., Boekhout T., Neuvéglise C., Gaillardin C., van Dijck P.W., Wyss M., (2014). *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical Reviews Microbiology*, 40, pp. 187-206.
- Makri A., Fakas S. e Aggelis G., (2010). Metabolic activities of biotechnological interest in *Yarrowia lipolytica* grown on glycerol in repeated batch cultures. *Bioresource Technology*, 101(7), 2351–2358.
- Addis M., Fiori M., Riu G., Pes M., Salvatore E., Pirisi A., (2015). Physico-chemical characteristics and acidic profile of PDO Pecorino Romano cheese: Seasonal variation. *Small Ruminant Research*, Volume 126, Pages 73-79.
- Giannino M.L., Marzotto M., Dellaglio F., Feligini M., (2009). Study of microbial diversity in raw milk and fresh curd used for Fontina cheese production by culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 130, Issue 3, Pages 188-195.
- Marino M., Maifreni M., Rondinini G., (2003). Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, Volume 229, Issue 1, Pages 133–140.
- McSweeney P. L. H. e Sousa M. J., (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* 80:293–324.
- Mirończuk A. M., Dobrowolski A., Rakicka M., Rywińska A. e Rymowicz W., (2015). Newly isolated mutant of *Yarrowia lipolytica* MK1 as a proper host for efficient erythritol biosynthesis from glycerol. *Process Biochemistry*, 50(1), 61–68.
- Mirończuk A. M., Furgała J., Rakicka M., e Rymowicz W., (2014). Enhanced production of erythritol by *Yarrowia lipolytica* on glycerol in repeated batch cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(1), 57–64.
- Coton M., Delbés-Paus C., Irlinger F., Desmasures N., Le Fleche A., Stahl V., Montel M.C., Coton E., (2012). Diversity and assessment of potential risk factors of Gram-negative isolates associated with French cheeses. *Food Microbiology*, Volume 29, Issue 1, Pages 88-98.
- Morgunov I.G., Kamzolova S.V. e Samoilenko V.A., (2013). Enhanced α -ketoglutaric acid production and recovery in *Yarrowia lipolytica* yeast by effective pH controlling. *Applied Microbiology Biotechnology* 97, 8711–8718 (2013).
- Papanikolaou S. e Aggelis G., (2010). *Yarrowia lipolytica*: A model microorganism used for the production of tailor-made lipids. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(6), 639–654.

- Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Chevalot I., Komaitis M., Marc I. e Aggelis G., (2006). Influence of glucose and saturated free-fatty acid mixtures on citric acid and lipid production by *Yarrowia lipolytica*. *Current Microbiology*, 52(2), 134–142.
- Papanikolaou S., Kampsopoulou E., Blanchard F., Rondags E., Gardel C., Koutinas A. A., Aggelis G., (2017). Production of secondary metabolites through glycerol fermentation under carbon-excess conditions by the yeasts *Yarrowia lipolytica* and *Rhodospiridium toruloides*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(9), 1600507.
- Franceschi P., Malacarne M., Formaggioni P., Cipolat-Gotet C., Stocco G. e Summer A., (2019). Effect of Season and Factory on Cheese-Making Efficiency in Parmigiano Reggiano Manufacture. *Foods*, 8(8), 315.
- Lanciotti R., Gianotti A., Baldi D., Angrisani R., Suzzi G., Mastrocola D., Guerzoni M.E., (2005). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, Volume 96, Issue 3, Pages 317-322.
- Di Cagno R., De Pasquale I., De Angelis M., Buchin S., Calasso M., Fox F. P. e Gobbetti M., (2011). Manufacture of Italian Caciotta-type cheeses with adjuncts and attenuated adjuncts of selected non-starter lactobacilli. *International Dairy Journal*. Volume 21, Issue 4, Pages 254-260.
- Ruiz-Herrera J. e Sentandreu R., (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology*, 178(6), 477–483.
- Ruiz-Herrera J. e Sentandreu R., (2002). Different effectors of dimorphism in *Yarrowia lipolytica*. *Archives of Microbiology* 178, 477–483.
- Rywińska A., Tomaszewska-Hetman L. Rakicka-Pustułka M., Juszczak P. e Rymowicz W., (2020). Alpha-Ketoglutaric Acid Production from a Mixture of Glycerol and Rapeseed Oil by *Yarrowia lipolytica* Using Different Substrate Feeding Strategies. *Sustainability*, 12, 6109.
- Mansour S., Beckerich J. M. and Bonnarme P., (2008). Lactate and Amino Acid Catabolism in the Cheese-Ripening Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Applied and environmental microbiology*, p. 6505–6512.
- Rani S., Jagtap S., (2019). Acceleration of Swiss cheese ripening by microbial lipase without affecting its quality characteristics. *Food Science & Technology*, 56(1):497–506.
- Peng S., Tasara T., Hummrich J. e Stephan, R., (2011). An Overview of Molecular Stress Response Mechanisms in *Escherichia coli* Contributing to Survival of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* during Raw Milk Cheese Production. *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 5, Pages 849–864
- Zinjarde S., (2014). Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*, *Food Chemistry*, Volume 152, Pages 1-10.
- Bellou S., Makri A., Triantaphyllidou I.E., Papanikolaou S. e Aggelis G., (2014). Morphological and metabolic shifts of *Yarrowia lipolytica* induced by alteration of the dissolved oxygen concentration in the growth environment. *Microbiology* Volume 160, Issue 4.
- Stark J., Tan H.S., (2003). Natamycin. In: Russell N.J., Gould G.W. (eds) *Food Preservatives*. Springer, Boston, MA.

Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L. e Cogan T. M., (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11, 259–274.

Tomaszewska L., Rywińska A. e Gladkowski W., (2012). Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 39(9).

Van den Tempel T. e Jakobsen M., (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International Dairy Journal*, 10, 263 e 270.

Janczukowicz W., Zieliński M., Dębowski M., (2008). Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. *Bioresource Technology*, 99 (10), pp. 4199-4205.

Asahina Y., Hagi T., Kobayashi M., Narita T., Sasaki K., Tajima A., Nomura M., (2020). Expression profiles of milk proteolysis-related genes in *Lactobacillus paracasei* EG9, a non-starter lactic acid bacterial strain, during Goudatype cheese ripening. *International Dairy Journal* 110, 104812.

Yvon M. e Rijnen L., (2001). Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *International Dairy Journal* 11:185–201.

7.1. Sitografia

<http://www.assolatte.it/it/home/prodotti/formaggi>

http://www.assolatte.it/it/home/salute_benessere_detail/1433415726016/1505377574527

http://www.fontina-dop.it/pdf/disciplinare-fontina_49.pdf

http://www.senato.it/documenti/repository/commissioni/comm10/documenti_acquisiti/IC%20competitivita/2009_12_15%20-%20Assolatte.pdf

<https://ec.europa.eu/eurostat/web/products-eurostat-news/-/EDN-20190119-1>