

## **Lyofast CNB AP la soluzione naturale contro l'insorgenza della pigmentazione blu in Mozzarella**

### **Riassunto**

*Pseudomonas* spp. è il contaminante maggiormente riscontrato in mozzarella. La frequenza di ritrovamento di questa specie è la principale causa di riduzione della shelf-life del prodotto, della possibile insorgenza di pigmentazione nonché di perdite economiche per le aziende casearie. Una possibile strategia per il contenimento di *Pseudomonas* spp. in mozzarella è l'utilizzo di colture con effetto di protezione in grado di contrastare lo sviluppo di questa flora indesiderata. Durante questa sperimentazione è stata validata la capacità di inibire un cocktail di *Pseudomonas* spp. (costituito da ceppi per lo più isolati dalla mozzarella) da parte di una miscela commerciale di *Carnobacterium* spp. addizionata direttamente al liquido di governo della mozzarella. Questa miscela è risultata in grado di ridurre la carica finale di *Pseudomonas* spp. senza compromettere l'aspetto organolettico del prodotto finito.

### **Introduzione**

Il deterioramento microbico dei formaggi freschi è fonte di grande preoccupazione per l'industria lattiero-casearia: infatti, le alterazioni delle caratteristiche sensoriali e organolettiche riducono la qualità dei prodotti e compromettono la reputazione dei produttori di formaggio, con conseguenti gravi perdite economiche per le aziende stesse (del Olmo, et al., 2018). La mozzarella è il rappresentante più popolare della famiglia dei formaggi a pasta filata: questo gruppo eterogeneo subisce un processo di filatura che avviene in acqua calda a 65-85 °C. Successivamente alla filatura avviene la formatura: le mozzarelline appena formate vengono lasciate raffreddare in un secondo bagno d'acqua a 14-15 °C prima di essere confezionate in presenza di liquido di governo contenente lo 0,45% di sale. L'elevato contenuto di umidità (50-60%), il valore di pH intorno a 5,5 (lieve acidità) e il basso contenuto di sale rendono la mozzarella un substrato favorevole alla crescita di microrganismi patogeni alterativi (De Candia et al., 2007).

Tra i contaminanti maggiormente ritrovati in mozzarella c'è *Pseudomonas* spp. che rappresenta anche il principale ostacolo all'estensione della shelf-life di questo prodotto.

*Pseudomonas* spp. è un batterio Gram-negativo ubiquitario e psicrotrofo, spesso isolato dal latte crudo refrigerato. Sebbene sia inattivato dalla pasteurizzazione del latte, *Pseudomonas* spp. può contaminare i prodotti successivamente durante il processo di caseificazione, infatti, questo microrganismo è frequentemente riscontrato negli impianti di lavorazione del latte, nelle materie prime, nel suolo e nell'acqua. *Pseudomonas* spp. può sopravvivere e crescere in ambienti diversi: può colonizzare le superfici degli utensili e delle attrezzature utilizzate nelle linee di produzione, è in grado di formare biofilm sulle superfici degli impianti e pertanto questi microrganismi possono persistere a lungo nell'ambiente.

I difetti causati dalla crescita di *Pseudomonas* spp. in mozzarella sono subordinati al rilascio di enzimi e pigmenti, con un impatto negativo sulla struttura, consistenza e sulle proprietà organolettiche del prodotto.

Per ridurre la carica microbica iniziale, è essenziale l'applicazione rigorosa di buone pratiche igieniche di produzione, ma spesso è necessario ricorrere a strategie aggiuntive per controllare la crescita di *Pseudomonas* spp.

L'uso di colture con effetto protettivo rappresenta un potenziale intervento per migliorare la sicurezza dei prodotti lattiero-caseari e per contenere la diffusione di flora indesiderata. La maggior parte dei ceppi che compongono le colture con effetto protettivo appartengono al gruppo dei batteri lattici (LAB), maggiormente impiegati come colture starter nelle fermentazioni alimentari (Holzapfel *et al.*, 1995). Pertanto, l'aggiunta di colture con effetto protettivo a prodotti fermentati come il formaggio non richiede un'etichettatura aggiuntiva, allineandosi così alla domanda dei consumatori di avere a disposizione alimenti "clean label". Inoltre, le colture commerciali con effetto protettivo sono selezionate per non impattare negativamente sull'aroma e sulla struttura degli alimenti (Spanu *et al.*, 2018). Tra i LAB, il genere *Carnobacterium* spp. è stato studiato a fondo per la sua capacità di produrre batteriocine (Bhugaloo-Vial *et al.*, 1996, 1999).

I carnobatteri sono batteri lattici Gram positivi a forma bastoncellare isolati da diverse nicchie ecologiche. Grazie alla sua capacità di produrre batteriocine, il genere *Carnobacterium*, è stato utilizzato come coltura con effetto di protezione per conferire durabilità e sicurezza a vari tipi di alimenti (formaggi, pesce e prodotti a base di carne). Tra le specie incluse nel genere *Carnobacterium*, due, *C. divergens* e *C. maltaromaticum*, sono frequentemente isolate dall'ambiente naturale e dai prodotti caseari.

L'obiettivo di questo lavoro era di indagare la capacità di Lyofast CNB AP (Sacco, Cadorago Italia), una miscela commerciale liofilizzata di *C. divergens* e *C. maltaromaticum* di controllare la diffusione di *Pseudomonas* spp. nella mozzarella, contaminata artificialmente da questo microrganismo deteriorante.

## Materiali e metodi

### Ceppi di *Pseudomonas* e condizioni di crescita

I ceppi di *Pseudomonas* utilizzati nel lavoro sono elencati in Tabella 1.

Tabella 1: Lista dei ceppi di *Pseudomonas* spp. componenti il "Pseudomonas cocktail"

Specie	Origine
<i>Pseudomonas putida</i>	Mozzarella
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Mozzarella
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ceppo di collezione (LGC standard)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Mozzarella
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Mozzarella
<i>Pseudomonas jessenii</i>	Mozzarella
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Mozzarella
<i>Pseudomonas luteola</i>	Acqua

La maggior parte dei ceppi è stata isolata direttamente da mozzarella, un ceppo da acqua mentre uno ceppo è stato acquistato da LGC standard. La specie di appartenenza è stata confermata mediante sequenziamento del 16S rRNA.

I ceppi sono stati trapiantati due volte in BHI brodo (Thermo Scientific, Oxoid, UK) e incubati a 30°C overnight. Con i ceppi cresciuti e inoculati in parti uguali è stata fatto un pool denominato “*Pseudomonas cocktail*”, che è stato utilizzato per contaminare il liquido di governo della mozzarella.

### **Disegno sperimentale**

Lo studio è stato condotto su campioni di mozzarella forniti da un caseificio locale.

Il liquido di governo è stato inoculato con  $1 \times 10^3$  UFC/ml del pool di *Pseudomonas* spp. precedentemente descritto (cocktail di *Pseudomonas*).

Dopo l'inoculo di *Pseudomonas*, il liquido di governo delle mozzarellle è stato inoculato anche con la coltura con effetto protettivo Lyofast CNB AP (Sacco, Cadorago, Italia). CNB AP è stato diluito in tampone fosfato in modo da inoculare  $1 \times 10^6$  UFC/ml nel prodotto. È stato anche allestito un controllo negativo (contaminato solo con *Pseudomonas* spp.). Dopo l'inoculo, tutti i campioni sono stati incubati a 4°C per 20 giorni. La prova è stata condotta in triplo e la determinazione della conta di *Pseudomonas* spp è stata eseguita il giorno dell'inoculo (T0), e dopo 11 e 20 giorni (T11 e T20) di conservazione a 4°C.

Sono stati pesati 5 grammi di mozzarella, diluiti in tampone fosfato e successivamente omogeneizzati per 2 minuti in omogenizzatore stomaker. I campioni così preparati sono stati ulteriormente diluiti serialmente in tampone fosfato e 100 µl sono stati inoculati su terreno *Pseudomonas Cetrimide Agar* (Thermo Scientific, Oxoid, UK) e incubati a 30 °C per 48 h in aerobiosi.

### **Valutazione sensoriale**

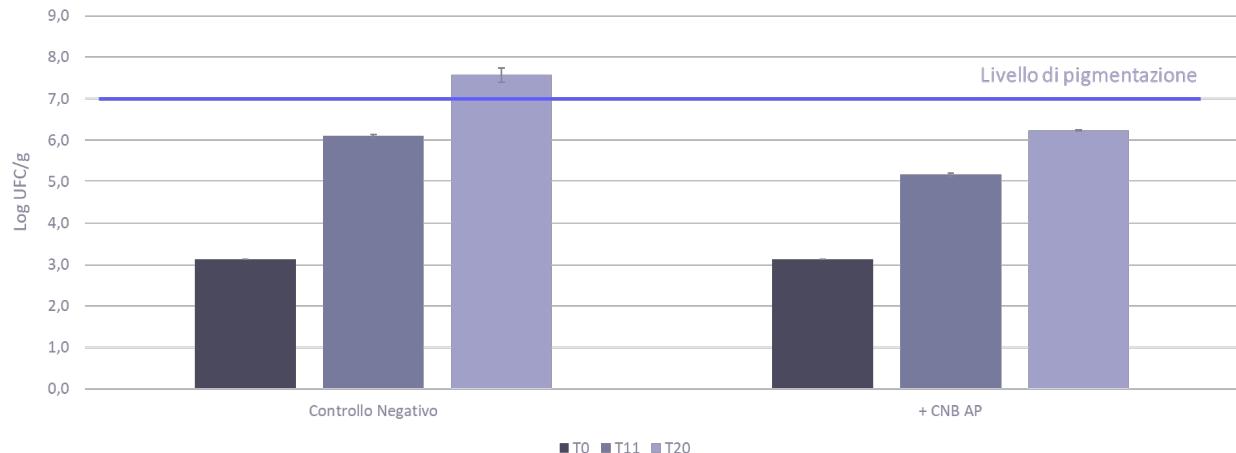
Al fine di escludere impatti organolettici negativi legati all'aggiunta di CNB AP in mozzarella è stato valutato l'impatto sensoriale da un panel di assaggiatori addestrato.

### **Risultati e discussione**

Lo sviluppo di *Pseudomonas* è stato seguito durante l'intera shelf-life delle mozzarellle: nell'arco della shelf life, il livello di *Pseudomonas* ha raggiunto i 7 log UFC/g dopo 20 giorni di conservazione in frigorifero (Figura 1).

L'uso della coltura con effetto protettivo Lyofast CNB AP è stato efficace nel ridurre la concentrazione di *Pseudomonas* spp, rispettivamente di 0,93 log UFC/g e 1,3 log UFC/g dopo 11 e 20 giorni di conservazione (Figura 1), mantenendo così il livello di contaminazione al di sotto del valore riportato come necessario per avere alterazioni di pigmentazione ("livello di pigmentazione", 7 Log CFU/g (Carminati et al 2019).

Figura 1: Andamento della crescita del cocktail di *Pseudomonas* ( $\log_{10}$  UFC/g;  $x \pm SD$ ) in mozzarella conservata alla temperatura di refrigerazione.

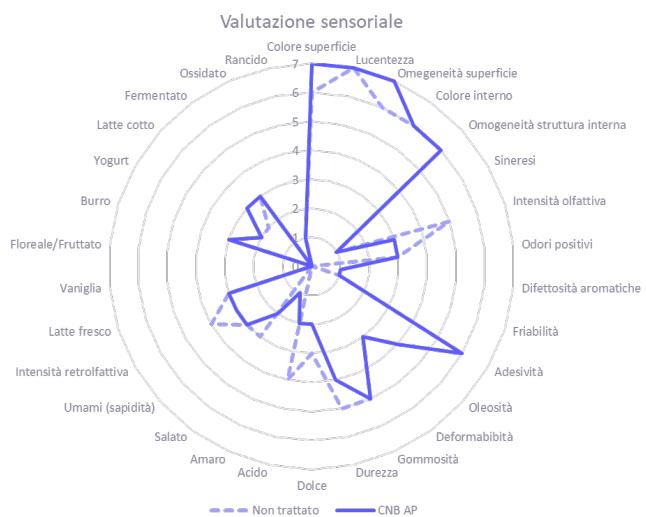


La mozzarella è particolarmente suscettibile alle contaminazioni secondarie provenienti dall'ambiente di lavorazione e rappresenta un ottimo substrato per la crescita di microrganismi indesiderati poiché il suo pH non è troppo acido e il liquido di governo ha una esigua concentrazione di NaCl. Per questi motivi è necessario trovare un metodo per proteggere e migliorare la conservazione di questo prodotto.

Una possibile strategia è l'utilizzo di colture microbiologiche volte a controllare la moltiplicazione dei microrganismi contaminanti. Lo studio, condotto su mozzarella "artificialmente" contaminata, ha indicato *Carnobacterium* spp come possibile coltura con effetto protettivo da utilizzare per contenere la crescita di *Pseudomonas* spp. CNB AP ha contenuto lo sviluppo di *Pseudomonas* del 90%, rispetto al corrispondente campione contaminato con il cocktail di *Pseudomonas* spp. ma senza coltura con effetto di protezione.

La valutazione sensoriale della Mozzarella non contaminata e di quella trattata con Lyofast CNB AP (+ CNB AP) ha confermato che la coltura con effetto protettivo non ha modificato il profilo aromatico e la consistenza dei campioni trattati (Figura 2).

Figura2: Valutazione sensoriale dei campioni di mozzarella.



## Conclusioni:

Lyofast CNB AP è in grado di sopravvivere e crescere in condizioni di pH, concentrazione di NaCl e temperatura simili a quelle dei microrganismi psicotrofici responsabili del deterioramento in mozzarella: pertanto, l'aggiunta di CNB AP al liquido di governo della mozzarella ha consentito il controllo della crescita di *Pseudomonas* spp. durante la shelf-life, proponendosi quindi come uno strumento efficace per estendere la durata degli alimenti refrigerati.

## Bibliografia

1. del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2018). The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 86, 359-366.
2. De Candia, S., De Angelis, M., Dunlea, E., Minervini, F., McSweeney, P. L. H., Faccia, M., & Gobbetti, M. (2007). Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 182-191.
3. Holzapfel, W. H., Geisen, R., & Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International journal of food microbiology*, 24(3), 343-362.
4. Spanu, C., Piras, F., Mocci, A. M., Nieddu, G., De Santis, E. P. L., & Scarano, C. (2018). Use of *Carnobacterium* spp protective culture in MAP packed Ricotta fresca cheese to control *Pseudomonas* spp. *Food microbiology*, 74, 50-56.
5. Carminati, D., Bonvini, B., Rossetti, L., Zago, M., Tidona, F., & Giraffa, G. (2019). Investigation on the presence of blue pigment-producing *Pseudomonas* strains along a production line of fresh mozzarella cheese. *Food Control*, 100, 321-328.

6. Bhugaloo-Vial, P., Douliez, J. P., Mollé, D., Dousset, X., Boyaval, P., & Marion, D. (1999). Delineation of key amino acid side chains and peptide domains for antimicrobial properties of divercin V41, a pediocin-like bacteriocin secreted by *Carnobacterium divergens* V41. *Applied and environmental microbiology*, 65(7), 2895-2900.
7. Bhugaloo-Vial, P., Dousset, X., Metivier, A., Sorokine, O., Anglade, P., Boyaval, P., & Marion, D. (1996). Purification and amino acid sequences of piscicocins V1a and V1b, two class IIa bacteriocins secreted by *Carnobacterium piscicola* V1 that display significantly different levels of specific inhibitory activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(12), 4410-4416.