

INDUSTRIE ALIMENTARI



AZIENDA CERTIFICATA ISO9001

CHOCOLATE PROCESSING EQUIPMENT



GRANDI LINEE DI RICOPERTURA

ME.TRA S.P.A. Via Lasta, 11 - 37050 Vago di Lavagno VERONA - ITALIA
Tel. +39-0458980199 Fax +39-0458980233
Web <http://www.me-tra.it> Email: me-tra@me-tra.it

Poste Italiane spa - Sped. in A.P. - D.L. 353/2003 (Conv. in L. 27/02/2004 n° 46) art. 1 comma 1 DCB TO - n. 6/2007 - I.P.



CHIRIOTTI EDITORI

SUMMARY

In this study, we took into consideration the definition of the spoilage agent of Robiola di Roccaverano cheese, responsible for the presence of a tick pellicle on the surface of the cheese. After microbiological analysis, a high number of yeasts were determined, and at least 4 different types were observed on the plates. After molecular identification, two of them were defined to belong to *Yarrowia lipolytica* and *Kluyveromyces lactis*, frequently isolated from cheeses, while the third type was *Pichia fermentans*, less common in these products. The last yeast-type was *Geotrichum* sp. In bacteriology tubes, it was able to produce thick and hard biofilms and considering its high presence, after DGGE analysis of the DNA extracted directly from the pellicle, we can suppose that this yeast is the spoilage agent responsible for the alteration considered in this study.

SOMMARIO

In questo lavoro si è voluto identificare l'agente responsabile dell'alterazione di Robiola di Roccaverano DOP, dovuta alla presenza sulla superficie del formaggio di una pellicola coriacea. Dopo analisi microbiologica si è potuta evidenziare una presenza molto elevata di lieviti, presenti sottoforma di almeno 4 diverse tipologie di colonie. Essi sono stati isolati ed identificati con metodi molecolari. Due specie, *Yarrowia lipolytica* e *Kluyveromyces lactis*, sono frequentemente isolate da prodotti lattiero-caseari, mentre una terza, *Pichia fermentans*, non è comune in queste tipologie di prodotti. L'ultima specie isolata è stata identificata come *Geotrichum* sp. Questo lievito era in grado di produrre, in provetta da batteriologia, dei film molto resistenti e vista la sua massiccia presenza, in seguito ad analisi DGGE sul DNA estratto dalla pellicola, si può asserire che rappresenta il principale agente dell'alterazione considerata in questo studio.

LUCA COCOLIN* - KALLIOPI RANTSIOU - PAOLA DOLCI - GIUSEPPE ZEPPA

Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali - Facoltà di Agraria - Università di Torino - Via Leonardo da Vinci 44 - 10095 Grugliasco - TO - Italia

*e-mail: lucasimone.cocolin@unito.it

Alterazione di Robiola di Roccaverano DOP da parte di lieviti filmogeni

Spoilage of Robiola di Roccaverano DOP cheese by film-forming yeasts

Parole chiave: Robiola di Roccaverano, lieviti filmogeni, *Geotrichum*, DGGE
Key words: Robiola di Roccaverano, film-forming yeasts, *Geotrichum*, DGGE

INTRODUZIONE

Di particolare interesse fra i prodotti a DOP della regione Piemonte, è certamente la Robiola di Roccaverano, un formaggio grasso (minimo 40% sul secco) a pasta fresca ed a Denominazione di Origine Protetta (Reg. CE 1263/96 e succ. modif.) prodotto in dieci Comuni della Provincia di Asti ed in nove di quella di Alessandria. Per la sua produzione deve essere utilizzato infatti latte crudo intero di capra in purezza od in rapporto variabile (minimo 50%) con latte crudo intero di vacca e/o pecora (massimo 50%). È quindi per ora l'unico formaggio italiano a DOP prodotto con latte di capra o, in alcuni casi, con una miscela di latti di capra e vacca. La Robiola di Roccaverano DOP ha una forma cilindrica con facce piane, un diametro di 10-13 cm, un'altezza di 2,5-4 cm ed un peso di 250-400 g. Questo formaggio si pro-

duce durante tutto l'anno e può essere commercializzato a partire dal quarto giorno dalla messa negli stampi. Ne esistono in particolare tre tipologie: quella "fresca" con meno di 10 giorni di stagionatura, quella "stagionata" con al massimo 30 giorni di stagionatura e quella "secca" con oltre 30 giorni di stagionatura. Per la produzione della Robiola di Roccaverano DOP si utilizza latte crudo intero di capra delle razze Roccaverano e Camosciata Alpina e loro incroci, di pecora di razza Pecora delle Langhe e di vacca delle razze Piemontese e Bruna Alpina e loro incroci, proveniente esclusivamente dall'area di produzione e trasformato entro 48 ore dalla mungitura. Secondo quanto prevede il Disciplinare di Produzione, il latte, eventualmente inoculato con culture di fermenti lattici naturali ed autoctoni dell'area di produzione (lattoinnesti e/o sieroinnesti), è addizionato con caglio di origine animale

non prima che sia iniziato il processo di acidificazione e ad una temperatura compresa tra i 18° e i 24°C. La coagulazione si protrae per un tempo variabile fra le 8 e le 36 ore in funzione delle condizioni climatiche ed ambientali di lavorazione. Si procede quindi delicatamente al trasferimento della cagliata acida in appositi stampi forati muniti di fondo. Prima della formatura può essere effettuato uno spurgo del siero per sgocciolamento in tele a trama fine. La sosta negli stampi si protrae fino a 48 ore con rivoltamenti periodici al fine di favorire lo spurgo del siero. La salatura deve essere effettuata a secco sulle due facce del prodotto durante i rivoltamenti oppure al termine del processo di formatura.

La stagionatura è effettuata conservando il prodotto fresco in appositi locali per almeno tre giorni dal momento della messa negli stampi. Dal quarto giorno dalla messa negli stampi è consentita la vendita o la prosecuzione della maturazione in azienda e/o a carico degli affinatori (stagionatori). A partire dal quarto giorno dalla messa negli stampi è consentito l'uso di vegetali aromatizzanti.

In questo studio è stata analizzata, con metodi di microbiologia classica

e di biologia molecolare, una pellicola ritrovata su delle forme di Robiola di Roccaverano DOP. Da un'analisi microbiologica è stato possibile isolare 4 diverse tipologie di lieviti, appartenenti a specie differenti. Ceppi di *Geotrichum* sp., la cui presenza è stata definita in maniera massiccia sulla pellicola, in seguito ad analisi DGGE, e caratterizzati da capacità filmogena, sono stati identificati come i principali responsabili dell'alterazione considerata in questo studio.

MATERIALI E METODI

Campionamento microbiologico e isolamento dei lieviti

Circa 10 cm² di pellicola (fig. 1), ricavata dalla superficie della Robiola di Roccaverano DOP, sono stati aggiunti di 90 mL di soluzione Ringer (Oxoid, Italia) ed omogeneizzati in Stomacher (PBI International, Italia) per circa 1,5 min. Si è provveduto a preparare delle diluizioni decimali le quali sono state poi seminate su terreno Agar Malto (Oxoid) aggiunto di tetraciclina (1 µg/mL, Sigma, Italia) per evitare la crescita

dei batteri. Le piastre sono state incubate a 25°C per 3-5 giorni. Si è quindi proceduto all'isolamento delle colonie di lievito con colore e morfologia differente, i quali sono stati conservati a -80°C in Yeast Peptone Dextrose (YPD) brodo contenente 30% (vol/vol) di glicerolo. Dopo rivitalizzazione in YPD a 30°C per 24 ore, essi sono stati sottoposti a prove di identificazione basate su metodiche di tipo molecolare.

Estrazione del DNA

I lieviti rivitalizzati in YPD brodo sono stati sottoposti ad estrazione del DNA. Dopo centrifugazione a 12.000 rpm a 4°C per 5 minuti, il pellet, risospeso in 300 µL di Breaking Buffer (2% Triton X100, 2% SDS, 100 mM NaCl, 100 mM TRIS HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) è stato omogeneizzato in una macchina "spaccacellule" (Fast Prep, BIO 101, Resnova, Italia) con 0,3 g di biglie di vetro dal diametro di 0,5 mm, in presenza di 300 µL di fenolo-cloroformio-alcool isoamilico in rapporto 25:24:1. Dopo l'aggiunta di 300 µL di TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA pH 7,6) è seguita una centrifugazione per 10 minuti a 12.000 a 4°C, il surnatante è stato prelevato ed il DNA è stato precipitato con 1 mL di etanolo assoluto. Il pellet essiccato è stato risospeso con 50 µL di acqua distillata sterile contenente 1 µL di DNase-free RNase (Roche Diagnostics, Germania).

Analisi PCR-DGGE e sequenziamento

La regione D1 del gene 26S rRNA è stata amplificata tramite PCR usando il primer senso NLI con coda GC (sottolineata) (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G -3') ed il primer antisenso LS2 (5'-ATTCCC AAA CAA CTC GAC TC -3') (1). Nella miscela di reazione sono stati usati 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM di ciascun



Fig. 1 - Aspetto della pellicola rinvenuta su Robiola di Roccaverano DOP.

deossinucleotide trifosfato (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,2 mM di ciascun primer, 1,25 unità di *Taq* polimerasi (Applied Biosystem, Milano). Il volume finale della miscela di reazione di ogni campione, compreso 1 μ L di DNA estratto (approssimativamente 10 ng), è stato di 25 μ L. Il ciclo di amplificazione è stato ripetuto per 30 volte ed ha previsto una fase di denaturazione a 95°C per 60 s, una fase di annealing a 52°C per 45 s, una fase di estensione a 72°C per 60 s. Il ciclo è stato inoltre caratterizzato da una denaturazione iniziale a 95°C per 5 min ed una estensione finale a 72°C per 7 min. Al fine di verificare la presenza dell'amplificato da sottoporre ad analisi DGGE, i prodotti sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di agarosio al 2% contenente 0,5 μ g/mL di bromuro di etidio, visualizzati con transilluminatore UV e i risultati ottenuti sono stati osservati con l'ausilio di una cabina Biolmaging System GeneGenius (SynGene, Cambridge, UK).

Nell'analisi DGGE è stato utilizzato un gel di acrilamide (8% [p/v] acrilamide-bisacrilamide 37,5:1) a gradiente denaturante dal 30 al 60% creato con concentrazioni crescenti di urea e formamide. L'elettroforesi è stata condotta in un tampone di corsa contenente 40 mM di Tris-acetato, 2 mM di $\text{Na}_2\text{-EDTA H}_2\text{O}$, pH 8,5 (TAE), per 4 ore a 120 V con una temperatura costante di 60°C. A fine corsa, i gel sono stati colorati mediante immersione in una soluzione di 1.25X TAE contenente 1X SYBR Green (Sigma) e fotografati dopo illuminazione UV.

Dopo aver confrontato tutte le immagini dei gel DGGE con il programma Gel Compare versione 4.1 (Applied Maths, Kortrijk, Belgio), è stato possibile raggruppare i ceppi con lo stesso profilo, quindi almeno due rappresentanti per ogni gruppo sono stati amplificati con i primers NL1 ed NL4 e successivamente sequenziati (2). Le sequenze ottenute sono state allineate in GeneBank con l'ausilio del programma Blast (3), dal

quale è stata ottenuta una identificazione del ceppo.

Analisi molecolare diretta della pellicola

Un mL dell'omogeneizzato preparato per l'analisi microbiologica è stato prelevato e sottoposto a centrifugazione a 12.000 rpm per 10 min a 4°C. Dopo essere stato risospeso in 150 μ L di tampone per proteinasi K (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA [pH 7,5], 0,5% [p/vol] sodio dodecil solfato) si sono aggiunti 25 μ L di proteinasi K (25 mg/mL; Sigma) e si è proceduto con un trattamento a 50°C 1,5 h. Dopo questo trattamento si sono aggiunti 150 μ L di breaking buffer 2x (4% [vol/vol] Triton X-100, 2% [p/vol] sodio dodecil solfato, 200 mM NaCl, 20 mM Tris [pH 8], 2 mM EDTA [pH 8]) e la soluzione ottenuta è stata prelevata e posta in tubi con tappo a vite contenenti 0,3 g di biglie di vetro. A questo punto si è aggiunto il fenolo-cloroformio-alcool isoamilico e l'estrazione è continuata come descritto sopra. L'amplificazione del DNA e l'analisi DGGE sono state condotte nelle stesse condizioni descritte per i lieviti.

Capacità filmogena dei lieviti isolati

In un tubo da batteriologia contenente 5 mL di YPD brodo si sono inoculati dei rappresentanti di ogni tipologia di lievito isolato dalla pellicola e si è proceduto all'incubazione a 30°C per 72 ore con tubo piegato di 45°.

RISULTATI

Conte ed isolamento di lieviti

Dopo tre giorni di incubazione delle piastre di Agar Malto con tetraciclina a 25°-30°C la conta di lieviti totali era di 1×10^8 unità formanti colonia (ufc)

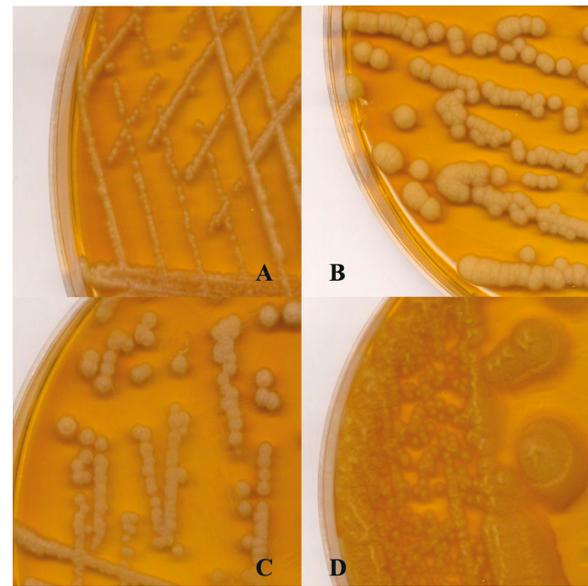


Fig. 2 - Aspetto delle colonie su Agar Malto con tetraciclina delle 4 tipologie di lievito isolate dalla pellicola.

per cm^2 di pellicola campionata. Dall'osservazione delle piastre è stato possibile distinguere 4 diverse tipologie di colonie diversificate in funzione delle caratteristiche morfologiche e di colore. Come mostrato in fig. 2, la tipologia A era l'unica caratterizzata da una consistenza cremosa e da una superficie della colonia lucida. Le tipologie B e C, anche se molto simili sotto l'aspetto morfologico, in quanto entrambe con consistenza farinosa, avevano un colore diverso. Mentre le colonie del lievito B apparivano come bianche, quelle del lievito C erano debolmente gialle. L'ultima tipologia osservata appariva con colonie molto estese ed ampie con una consistenza coriacea e filamentosa. Le conte microbiologiche per ogni tipologia di lievito erano le seguenti: 1×10^6 ufc/ cm^2 per la A, 7×10^7 ufc/ cm^2 per le colonie B + C (non si sono differenziate queste tipologie nella conta) e 3×10^7 ufc/ cm^2 per le D.

Analisi DGGE ed identificazione molecolare dei ceppi isolati

Si sono isolate 5 colonie per ogni tipologia di lievito, le quali sono state analizzate con PCR-DGGE per valu-

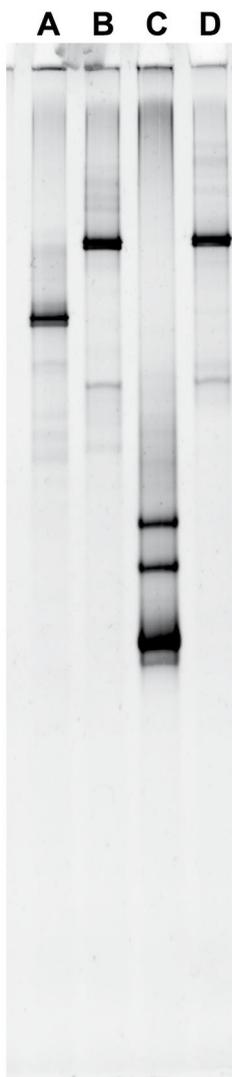


Fig. 3 - Profili DGGE di lieviti appartenenti alle 4 tipologie (A, B, C e D) isolati dalle pellicole.

tare la loro migrazione elettroforetica e raggrupparle per poi identificarle tramite sequenziamento del gene 26S rRNA. I risultati ottenuti dalle analisi DGGE sono mostrati in fig. 3. Come mostrato, mentre le tipologie A e C hanno dato dei profili unici e diversi, le colonie B e D erano caratterizzate da migrazione elettroforetica del tutto identica. Tutte le colonie isolate della stessa tipologia hanno mostrato un andamento omogeneo. Anche se le colonie B e D hanno mostrato un profilo DGGE identico, si è comunque proceduto ad una identificazione molecolare di entrambi in quanto l'aspetto della colonia era completamente diverso e questo suggeriva una loro appartenenza a specie diverse. La

Tabella I - Risultati delle identificazioni molecolari delle tipologie di lievito isolate dalle pellicole.

Tipologia di colonia	Identificazione	Omologia	Sequenza di riferimento in GeneBank
A	<i>Kluyveromyces lactis</i>	99%	AF374614
B	<i>Yarrowia lipolytica</i>	99%	EF362750
C	<i>Pichia fermentans</i>	100%	AY497672
D	Lievito non coltivabile	99%	AY464883
	<i>Geotrichum sp.</i>	98%	DQ912852

regione D1-D2 del gene 26S rRNA è stata amplificata con i primers NLI ed NL4 e successivamente sequenziata. I risultati ottenuti sono mostrati in tab. I. La colonia A è stata identificata come *Kluyveromyces lactis*, mentre le colonie B e C appartenevano alle specie *Yarrowia lipolytica* e *Pichia fermentans*, rispettivamente. Mentre per le colonie A, B e C è stata possibile l'attribuzione della specie con certezza, per la colonia D non si è ottenuta una identificazione definitiva. Come riportato in tab. I, infatti, il lievito D è stato identificato al 99% come "lievito non identificato", mentre la prima specie risultante dall'allineamento della sequenza era *Geotrichum sp.*

Analisi diretta della pellicola tramite DGGE

I risultati ottenuti dall'analisi diretta tramite DGGE della pellicola ricavata dalla superficie della robiola sono mostrati in fig. 4. Il profilo ottenuto era caratterizzato da 3 bande di cui una molto intensa (banda 1). Comparando i profili ottenuti dall'analisi diretta con le migrazioni DGGE ottenute dalle quattro tipologie di lieviti isolati con metodi microbiologici tradizionali, è stato possibile attribuire le bande 1 e 2 ai lieviti B e D, mentre la banda 3 al lievito C. Nel gel DGGE non si è osservata alcuna banda che poteva riferire al lievito A.

Capacità filmogena dei lieviti isolati

Al fine di identificare i potenziali lieviti alteranti della robiola esaminata in questo studio, si è proceduto a de-



Fig. 4 - Analisi diretta DGGE della pellicola rinvenuta su Robiola di Roccaverano DOP. Le tre bande indicate si riferiscono alle specie di lievito più abbondanti in seguito all'analisi del DNA.

terminare la capacità filmogena delle 4 tipologie di lieviti. Come mostrato in fig. 5, si è potuto osservare un film dai lieviti B, C e D, ma mentre le pellicole formate da B e C avevano una consistenza molto farinosa e si disgregavano se sottoposte ad agitazione su vortex, quella del lievito D aveva una consistenza molto più coriacea, la cui struttura non veniva intaccata dopo agitazione.

DISCUSSIONE

I lieviti sono stati ritrovati ed isolati in molte varietà di formaggi, tuttavia, nella maggior parte dei casi, il loro ruolo non è del tutto chiaro (4). Essi possono assumere una valenza importante durante la maturazione dei formaggi, in cui le condizioni di basso pH, bassa umidità, basse temperature e alte concentrazioni saline li favoriscono. Non è ancora stato definito se durante la stagionatura dei formaggi si ha una progressione di diverse specie di lievito, in quanto, nella maggior parte dei casi, non è stato definito lo stadio di maturazione nel quale essi sono stati isolati (5). Le principali alterazioni di cui i lieviti sono responsabili nei prodotti lattiero-caseari sono da attribuire a sapori ed odori di frutta e lievito, produzione di gas e cambiamento della struttura (4). Oggigiorno, con il controllo delle operazioni durante la lavorazione dei formaggi, la frequenza con la quale queste alterazioni sono osservate è diminuita notevolmente rispetto al passato. Tuttavia, esse sono ancora presenti. La definizione dell'alterazione dei formaggi da parte di lieviti è piuttosto difficile e del tutto soggettiva, in quanto l'attività di questi organismi durante la maturazione è in qualche caso desiderata, in altri del tutto negativa. In generale, però, l'attività fermentativa a carico del lattosio da parte dei lieviti porta ad un incremento di acidità, produzione di gas e sapori di frutta, inoltre il processo proteolitico e lipolitico dovuto

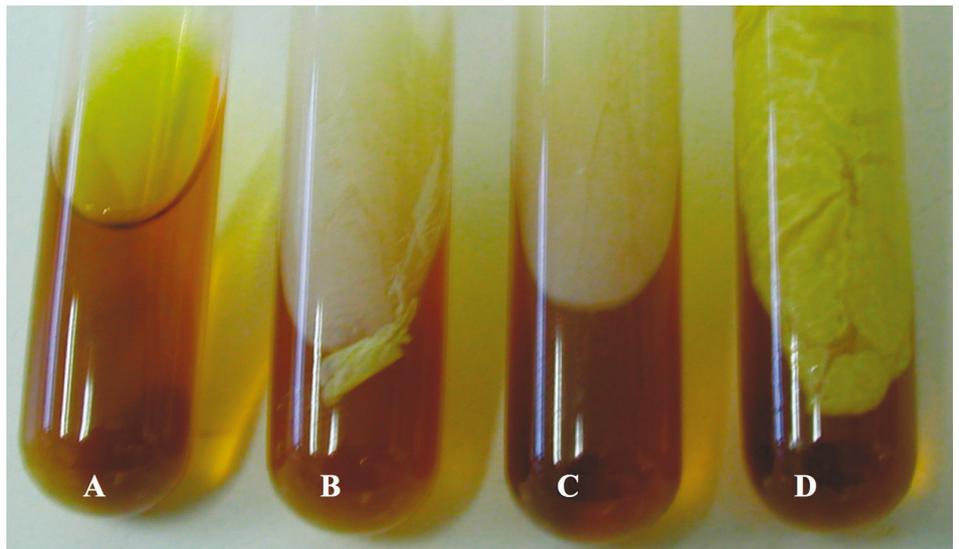


Fig. 5 - Capacità di formare pellicole da parte delle 4 tipologie di lieviti isolati in questo studio (A, B, C e D) in tubo da batteriologia contenente terreno YPD, dopo incubazione a 30°C per 72 ore.

alla loro attività enzimatica può determinare un sapore amaro e rancido, oltre che produrre dei rammollimenti. Per quanto riguarda i formaggi freschi o non stagionati, i lieviti sono molto spesso i responsabili principali delle alterazioni caratterizzate da difetti di sapore ed odore, gas e presenza di colonie sulla superficie. Le popolazioni di lievito, in questo caso, sono in grado di crescere anche a temperature di refrigerazione e possono raggiungere cariche microbiche di 10^6 - 10^7 ufc/g. Il controllo delle alterazioni da parte di lieviti in prodotti lattiero-caseari si basa sui principi delle buone prassi igieniche. I principali punti critici da monitorare sono: opportuni trattamenti termici prima della fermentazione, assenza di lieviti nelle colture di avvio di batteri lattici, quando essi non sono desiderati, sanificazione regolare degli impianti di produzione e controllo delle contaminazioni crociate e post-produzione da parte degli operatori e dell'ambiente (4).

In questo lavoro si è proceduto alla caratterizzazione microbiologica di una pellicola rinvenuta su Robiola di Roccaverano DOP. Questa presenza deve essere ritenuta come una vera e propria alterazione, il cui controllo è fondamentale per evitare uno scadimento di tipo

organolettico e sensoriale. Da un campionamento microbiologico si sono definite delle cariche di lieviti molto elevate (10^8 ufc/cm² di pellicola), che supportano l'ipotesi che gli agenti biologici di alterazione siano proprio i lieviti. Si sono isolate 4 differenti tipologie di colonie, due delle quali, appartenenti alle specie *Y. lipolytica* e *K. lactis*, sono frequentemente isolate da prodotti lattiero-caseari (5). Più rara è invece la presenza di *P. fermentans*. L'ultima tipologia di lievito isolata non è stata identificata in maniera definitiva, infatti dopo allineamento in banca dati, l'omologia più elevata è stata ottenuta per un "lievito non identificato". Considerando comunque, che il risultato immediatamente successivo riferiva ad una specie di *Geotrichum*, si può ipotizzare l'appartenenza di tale lievito a questo genere. Dai risultati ottenuti dalle analisi dirette tramite DGGE, in cui, analizzando il DNA estratto direttamente dalla pellicola, è stata definita una massiccia presenza di questo lievito e di *Y. lipolytica*, ma specialmente considerando la sua capacità di formare pellicole molto coriacee in brodo YPD, si può asserire che il lievito D è il responsabile principale dell'alterazione osservata in Robiola di Roccaverano DOP. Il genere *Geotrichum* ha proprietà

sia di lievito che di muffa, ma oggigiorno è considerato come lievito. È generalmente ritrovato solo su formaggi a crosta fiorita o ammuffita, anche se la letteratura recente non supporta completamente questa ipotesi (6). La ragione per la quale, molto probabilmente, è stato ottenuto questo risultato è l'assomiglianza delle colonie di *Geotrichum* alla muffe, per cui non è stato isolato e caratterizzato da altri formaggi in cui si sono ritrovate altre specie di lieviti. *Geotrichum candidum*, una delle specie d'interesse lattiero-caseario, è uno dei principali lieviti ritrovati in formaggio Reblochon, dove cresce molto velocemente durante i primi giorni di maturazione e rimane costante durante tutto

il periodo di stagionatura (7). I risultati ottenuti in questo studio evidenziano chiaramente che all'interno del genere *Geotrichum* esistono delle specie con capacità alteranti e necessitano di un controllo microbiologico per evitare l'insorgenza di pellicole sulle superfici di formaggi freschi, come nel caso della Robiola di Roccaverano DOP.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Cocolin L., Bisson L.F., Mills D.A. (2000) Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol. Lett.* 189, 81-87.
2. Kurtzman C.P., Robnett C.J. (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequence. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73, 331-371.
3. Altschul S.F., Madden T.L., Shaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Ac. Res.* 25, 3389-3402.
4. Fleet G.H. (1990) Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 199-211.
5. Baresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M. (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259-274.
6. Fox P.F., Guinee T.P., Cogan T.M., McSweeney P.L.H. (2000) *Fundamentals of cheese science.* Gaithersburg, Aspen Publishers, Inc.
7. Bärtschi C., Berthier J., Valla G. (1994) Inventaire et evolution des flores fongiques de surface du reblochon de Savoie. *Lait* 74, 105-114.