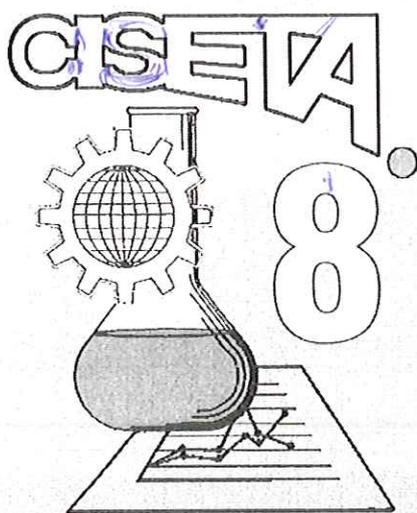


Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare

volume VIII



a cura di
Sebastiano Porretta



Consiglio Nazionale delle Ricerche

CHIROTTE EDITORI



RICERCHE E INNOVAZIONI NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

Volume VIII

A CURA DI
SEBASTIANO PORRETTA

ATTI DELL'8° CONGRESSO ITALIANO DI SCIENZA
E TECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI (8° CISETA)

FIERA MILANO, RHO (MI), 7-8 MAGGIO 2007

CHIRIOTTI EDITORI
Pinerolo - Italia

© Copyright 2008

Chiriotti Editori S.a.s. - Pinerolo - Italy

I diritti di riproduzione, anche parziale, del testo sono strettamente riservati
per tutti i Paesi

ISBN-13: 978-88-96027-00-4

PAOLA DOLCI, VALENTINA ALESSANDRIA, KALLIOPI RANTSIOU, GIUSEPPE
ZEPPA, LUCA COCOLIN

STUDIO DELLA MICROFLORA LATTICA DEL FORMAGGIO CASTELMAGNO DOP MEDIANTE METODI COLTURA-DIPENDENTI E COLTURA-INDIPENDENTI

Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse agroforestali, Settore di Microbiologia e Industrie agrarie, Università di Torino, Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO)

INTRODUZIONE

Il Castelmagno DOP è un formaggio pressato, semigrasso e semiduro, ottenuto da latte vaccino eventualmente addizionato di piccole quantità di latte ovino e/o caprino. La zona di produzione è limitata a tre comuni della Valle Grana: Castelmagno, Pradleves e Monterosso Grana (Cuneo). Il latte crudo viene parzialmente scremato per affioramento e fatto coagulare con aggiunta di caglio liquido di vitello. La tecnologia tradizionale non prevede l'utilizzo di colture starter ed il processo di acidificazione è ad opera della microflora lattica indigena. Dopo la rottura del coagulo e l'allontanamento del siero, la cagliata è raccolta in tele che vengono sospese per circa 24h al fine di permettere il drenaggio del siero residuo. La cagliata è poi tagliata a pezzi e trasferita in recipienti chiusi dove sosta sotto siero, a temperatura ambiente, per 3-6 giorni. Viene quindi tritata meccanicamente, salata e messa in fascere cilindriche dove è sottoposta a pressatura per 1-3 giorni al fine di completare lo spurgo del siero. A questo punto il formaggio è pronto per la stagionatura in grotte naturali a 10-12°C, per 2-6 mesi.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'evoluzione della microflora lattica nelle varie fasi del processo produttivo del Castelmagno DOP mediante metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti. Lo studio delle popolazioni microbiche naturalmente presenti nei prodotti lattiero-caseari rappresenta un primo passo per prevenire la perdita della biodiversità microbica e, di conseguenza, la perdita di un'ampia varietà di formaggi le cui caratteristiche dipendono dalla tecnologia tradizionale e dalla popolazione microbica naturalmente presente nel latte crudo.

MATERIALI e METODI

Campionamento

Sono stati raccolti campioni di latte, cagliata e formaggio (L: latte; C: cagliata del giorno di produzione; C1: cagliata dopo 24h di drenaggio; C3: cagliata dopo 3 giorni di riposo in siero;

F3: formaggio dopo 3 giorni di salatura; F30: formaggio a 30 giorni di stagionatura; F60: formaggio a 60 giorni di stagionatura; F90: formaggio a 90 giorni di stagionatura) da tre produzioni estive di Castelmagno DOP provenienti da un'unico alpeggio.

Analisi microbiologiche

I campioni sono stati sottoposti alle seguenti analisi microbiologiche: Plate Count Agar a 30°C per 48h per l'isolamento della carica batterica mesofila aerobia; M17 agar a 30°C e 37°C per 48h per l'isolamento di lattococchi; MRS agar a 30°C e 37°C per 48h in anaerobiosi per l'isolamento di lattobacilli; Kanamycin Aesculin Azide Agar a 37°C per 24-48h per l'isolamento degli enterococchi; Mannitol Salt Agar a 30°C per 48h per l'isolamento di cocchi coagulasi-negativi, Violet Red Bile Agar a 37°C per 24h per l'isolamento di coliformi, Malt Agar a 25°C per 96h per l'isolamento di lieviti e muffe.

Isolamento e identificazione molecolare dei batteri lattici

Per ognuno dei campioni analizzati sono state isolate, dalle piastre di M17 agar, MRS agar e KAA, 15 colonie. Gli isolati sono quindi stati sottoposti ad estrazione di DNA (Mora *et al.*, 2000) e identificazione molecolare mediante RSA (PCR 16S-23S rRNA gene spacer analysis), PCR specie-specifica e sequenziamento del gene 16S rRNA (Fortina *et al.*, 2003).

PCR-DGGE

I campioni analizzati sono stati sottoposti ad estrazione di DNA totale (Cocolin *et al.*, 2004) e PCR con i primers P₁V₁GC (5'-GCG GGC CGC GCG ACC GCC GGG ACG CGC GAG CCG GCG GCG GGC GGC GTG CCT AAT ACA TGC-3') (la sequenza sottolineata rappresenta la coda GC) e P₂V₁ (5'-TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC-3') che amplificano la regione variabile V1 del gene che codifica la subunità 16S dell'rRNA (Cocolin *et al.*, 2001). I prodotti di amplificazione sono stati fatti correre in elettroforesi su gel di acrilamide (8% [p/v] acrilamide-bisacrilamide, 37.5:1) a gradiente chimico denaturante dal 40 al 60% creato con concentrazioni crescenti di urea e formamide, a 120 V per 4h con una temperatura costante di 60°C.

Clonaggio e sequenziamento delle bande DGGE

Le bande visibili su gel DGGE sono state selezionate e tagliate; le stesse sono state nuovamente amplificate e sottoposte a DGGE per verificarne l'effettiva comigrazione con le bande del campione di controllo. Quelle che presentavano comigrazione sono state clonate nel vettore plasmidico pGEM^T (Promega) e sequenziate al fine di stabilirne, mediante ricerca in GenBank (Altschul *et al.*, 1997), la specie maggiormente correlata.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I batteri lattici starter e non starter rappresentano la microflora dominante nell'ambito dell'intero processo produttivo del formaggio Castelmagno DOP (Tabella 1). Sono stati isolati complessivamente 274 ceppi di batteri lattici. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* è stata la

specie più frequentemente isolata durante il processo di caseificazione mentre le specie *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* sono state isolate con alte percentuali di frequenza nei campioni di Castelmagno stagionati (Figura 1). I risultati ottenuti dal sequenziamento delle bande selezionate dai profili DGGE (Figura 2) sono riportati in Tabella 2. In generale i risultati ottenuti con l'analisi DGGE hanno confermato quanto ottenuto con i metodi microbiologici tradizionali.

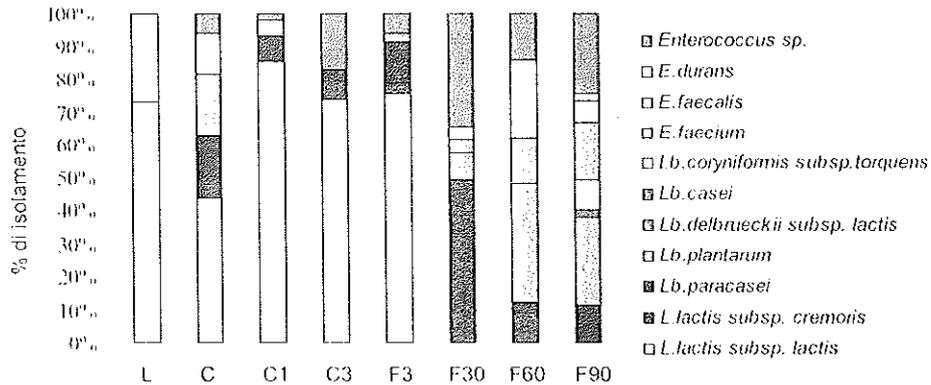


Figura 1 - Frequenza di isolamento delle specie lattiche nelle tre produzioni di Castelmagno DOP analizzate.

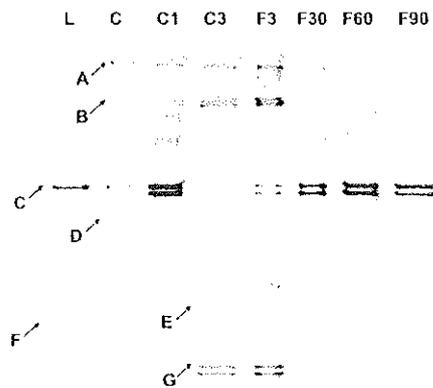


Figura 2 - Profili DGGE dei campioni raccolti durante la caseificazione e la stagionatura del Castelmagno DOP. I prodotti PCR derivano dall'amplificazione della regione VI del gene che codifica la subunità 16S dell'rRNA.

Le bande indicate con una lettera sono state tagliate, amplificate, clonate e sequenziate e le identificazioni sono riportate in Tabella 2.

Tabella 1 - Media dei valori logaritmici delle cariche della microflora isolata durante la caseificazione e la stagionatura del Castelmagno DOP^a.

Logaritmo delle cariche microbiche espresse come ufc ml⁻¹ di latte e ufc g⁻¹ di cagliata e di formaggio e deviazione standard (DS)

CAMPIONI	pH		PCA		M17 30 C		M17 37 C		MRS 30 C		MRS 37 C		KAA		MSA		MALI AGAR		VRBA	
	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
I	6.70	0.01	5.3	1.2	5.6	1.0	5.4	1.1	5.3	1.1	5.4	1.1	4.7	0.7	4.4	0.4	4.7	0.4	4.3	0.5
C	6.66	0.03	6.6	0.6	6.1	1.1	5.9	1.0	6.6	0.4	6.6	0.6	5.8	1.0	5.4	0.5	6.1	0.5	5.6	0.3
C1	5.16	0.18	8.8	0.6	8.9	0.8	8.6	0.9	8.2	1.0	7.5	0.4	7.2	0.7	6.9	0.5	8.5	0.8	6.6	0.6
C3S	4.78	0.15	9.9	0.2	9.8	0.4	9.4	0.5	9.6	0.7	9.6	0.6	7.7	0.5	6.9	0.3	8.6	0.5	5.5	0.4
F3S	4.73	0.06	9.3	0.3	9.1	0.3	9.0	0.4	9.1	0.5	8.4	1.3	7.3	0.2	5.9	0.3	8.2	0.9	4.6	1.2
F30	5.30	0.09	8.2	0.5	9.4	1.1	8.5	0.7	7.7	0.8	8.2	0.2	7.0	1.2	7.7	1.4	6.3	0.5	2.4	0.4
F60	5.10	0.11	6.8	0.2	6.8	0.4	6.9	0.2	6.4	0.1	6.8	0.1	6.1	0.2	4.8	0.4	4.5	0.7	1.4	0.4
F90	5.00	0.08	6.7	0.1	6.6	0.1	6.6	0.1	6.7	0.1	6.6	0.1	5.9	0.1	3.6	0.3	3.5	0.1	10	

^aValore medio dei campioni provenienti dalle tre produzioni successive

Tabella 2 - Risultati del sequenziamento delle bande selezionate dai profili DGGE ottenuti dai campioni di Castelmagno DOP analizzati.

Banda	Specie	% d'identità	N. di accesso a GenBank
A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100% ^a	EF185922
B	<i>Streptococcus agalactiae</i>	100% ^a	DQ232516
C	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	100% ^a	EF114309
D	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	100% ^a	CP000428
E	<i>Lactobacillus</i> sp.	97% ^a	AB262680
F	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	98% ^a	EF032686
G	<i>Lactobacillus kefiranoferiens</i>	98% ^a	AJ575262

BIBLIOGRAFIA

- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman D.J., 1997. "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C. and G. Comi, 2001. "Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene VI region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages". *Applied and Environmental Microbiology* 67 (11), 5113-5121.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R., Cantoni, C. and Comi, G., 2004. "Study of the ecology of fresh sausages and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods". *Applied and Environmental Microbiology* 70 (4), 1883-1894.
- Fortina, M.G., Ricci, G., Acquati, A., Zeppa, G., Gandini, A. and Manachini, P.L., 2003. "Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (POD) Italian cheese, the Toma piemontese". *Food Microbiology* 20, 397-404.

Mora, D., Parini, C., Fortina, M.G. and Manachini, P.L., 2000. "Development of molecular RAPD marker for the identification of *Pediococcus acidilactici* strains". Systematic and Applied Microbiology 23, 400-408.

RIASSUNTO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare l'evoluzione della microflora lattica nel formaggio Castelmagno DOP. Da campioni di latte, cagliata e formaggio sono stati isolati 274 ceppi lattici successivamente sottoposti ad identificazione molecolare mediante le tecniche RSA (16S-23S rRNA gene spacer analysis), PCR specie-specifica e sequenziamento del 16S. In parallelo è stata eseguita l'analisi DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis).

Lactococcus lactis subsp. *lactis* è risultata la specie più frequentemente isolata durante la caseificazione del Castelmagno DOP, mentre nel processo di stagionatura sono risultate prevalere le specie *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*. In generale i risultati ottenuti dall'isolamento tradizionale su piastra hanno trovato corrispondenza con quelli ottenuti dall'analisi PCR-DGGE.

SUMMARY

STUDY OF LACTIC ACID BACTERIA IN CASTELMAGNO PDO CHEESE WITH CULTURE-DEPENDENT AND -INDEPENDENT METHODS

The aim of this work was to study the dynamics of lactic acid bacteria in traditional Castelmagno PDO cheese. Milk, curd and cheese samples were collected and subjected to culture-dependent and -independent analysis. Traditional plating and genetic identification of lactic acid bacteria (LAB) isolates, using a combination of PCR 16S-23S rRNA gene spacer analysis (RSA), species-specific primers and 16S rRNA gene sequencing, and PCR-DGGE analysis of VI region of 16S rRNA gene were carried out. Lactococcus lactis subsp. lactis was the species most frequently isolated during Castelmagno PDO manufacture, while Lactobacillus plantarum and Lactobacillus paracasei were isolated with the highest frequencies from ripened Castelmagno PDO cheese samples. In general DGGE analysis correlated well with the results obtained by traditional plating.