

EVOLUZIONE DELLA MICROFLORA SUPERFICIALE NEL FORMAGGIO FONTINA DOP E SUA INFLUENZA SULLA MATURAZIONE: PRIME ACQUISIZIONI

Andrea BARMAZ^{1*}, Simona ZENATO¹, Rita PRAMOTTON¹,
Roberto AMBROSOLI², Paola DOLCI², Giuseppe ZEPPA², Jean Luis MINATTI²

INTRODUZIONE

La Fontina DOP è un formaggio a crosta lavata che si produce naturalmente durante il processo di stagionatura in grotte naturali (umidità 90%, temperatura media 8-10°C), in seguito allo sviluppo di una microflora superficiale composta [1], che viene progressivamente selezionata dai continui interventi di *frottage* e salatura a secco. Tale microflora esercita verosimilmente notevole influenza sulla maturazione della pasta e quindi sulle caratteristiche di tipicità organolettica del formaggio [2, 3]. Il miglioramento delle conoscenze in merito è di rilevante importanza per la gestione e il mantenimento di tali caratteristiche.

La ricerca si prefigge di identificare i diversi componenti della microflora superficiale del formaggio Fontina, accertandone l'origine e seguendone l'evoluzione qualitativa e quantitativa durante la stagionatura, per valutare in particolare la loro influenza sulla formazione della crosta e più in generale l'effetto di questa sulla maturazione della pasta, con studi microbiologici, tecnologici e sensoriali.

MATERIALI E METODI

Sono state prese in considerazione forme prodotte in tre diversi caseifici valdostani (Montfleury, Villeneuve, Pollein), salate in salamoia o a secco, e fatte stagionare in tre magazzini diversi (Pré-Saint-Didier, Saint-Christophe, Ollomont). Su di esse sono stati effettuati campionamenti della microflora superficiale all'atto della caseificazione e successivamente a 7, 14, 28, 56 e 84 giorni di stagionatura. Sulla base di quanto riportato in letteratura [4], relativamente alla microflora superficiale dei formaggi, i gruppi microbici e i relativi metodi di determinazione presi in considerazione sono stati i seguenti:

- Carica batterica mesofila aerobia: Plate Count Agar; 30° C; 3 giorni.
- Corineformi: Plate Count Agar + 5% NaCl + 0,002% pimaricina; 30° C; 3 giorni + 4 giorni daylight.
- Cocchi coagulasi-negativi: Baird Park Agar; 30° C; 48 h.
- Batteri lattici: M17 agar; 37° C; 48 h e MRS agar (anaerobiosi); 37° C; 48 h.

* *Corrispondenza ed estratti:* a.barmaz@iaraosta.it

¹ Institut Agricole Régional, Rég. La Rochère 1/A, 11100 Aosta.

² Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse agroforestali, Settore Microbiologia e Industrie agrarie, Università di Torino. Via L. Da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

- Enterococchi: KAA; 37° C; 48 h.
- Lieviti e muffe: YGC; 25° C; 5 giorni.
- Coliformi ed *Enterobacteriaceae*: Petrifilm EC e Petrifilm EB.
- *Listeria* spp.: Fraser broth 30° C; 24 h, Rapid'Lmono 30° C; 24-48 h.

I dati relativi alle cariche dei gruppi microbici analizzati sono stati sottoposti alla Cluster Analysis e all'Analisi delle Componenti Principali. Allo scopo di indagare quali fossero le specie microbiche più ricorrenti e rappresentative, dalle piastre sono stati effettuati degli isolamenti di ceppi appartenenti a lieviti, enterococchi, cocchi coagulasi-negativi e corineformi [5, 6].

I ceppi di lievito sono stati identificati con le tecniche API 20 C AUX e DGGE [7, 8]. Gli enterococchi sono stati identificati con l'analisi della regione spaziatrice 16S-23S rDNA e PCR specie-specifiche. I cocchi coagulasi-negativi e i corineformi sono stati identificati mediante DGGE [8].

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati hanno evidenziato una microflora costituita da batteri corineformi (cariche massime intorno a 10^{10} UFC/g) e in minore misura da cocchi coagulasi-negativi, batteri lattici e lieviti (cariche massime mediamente intorno a 10^9 UFC/g). Gli enterococchi che, come noto, giocano un ruolo fondamentale nella maturazione della pasta della Fontina, hanno presentato cariche superficiali non superiori a 10^6 UFC/g. Sia pur con differenze legate al luogo di produzione e di stagionatura, questi gruppi microbici hanno manifestato un aumento progressivo nel corso della stagionatura, ad eccezione dei batteri corineformi, che dopo un incremento iniziale sono andati incontro ad un calo verso la fine del periodo di stagionatura considerato.

I dati relativi alle cariche microbiche sono stati sottoposti ad analisi statistica per valutare l'eventuale influenza del luogo di produzione e di stagionatura. L'Analisi delle Componenti Principali ha messo in evidenza un'influenza del fattore magazzino; infatti, le cariche relative alle diverse produzioni raggruppano tra loro a seconda del magazzino in cui le forme sono messe a stagionare (Fig. 1).

Dalla Cluster Analysis è emerso, inoltre, che le cariche ottenute dai formaggi provenienti dal caseificio Montfleury formano un gruppo che si distingue nettamente da quello dei formaggi prodotti negli altri due caseifici (Fig. 2). Ciò potrebbe essere in relazione con la qualità del latte, proveniente da un'unica stalla e particolarmente paucimicrobico. Viceversa, non è stato osservato alcun effetto dovuto alla diversa modalità di salatura. I profili DGGE relativi alla microflora batterica e fungina sono stati sottoposti a Cluster Analysis. Il dendrogramma che ne è risultato (Fig. 3) mostra come le matrici di crosta provenienti dai due magazzini di Pré-Saint-Didier e di Ollomont clusterizzano separatamente, in accordo con quanto già rilevato dall'analisi statistica relativa alle cariche microbiche.

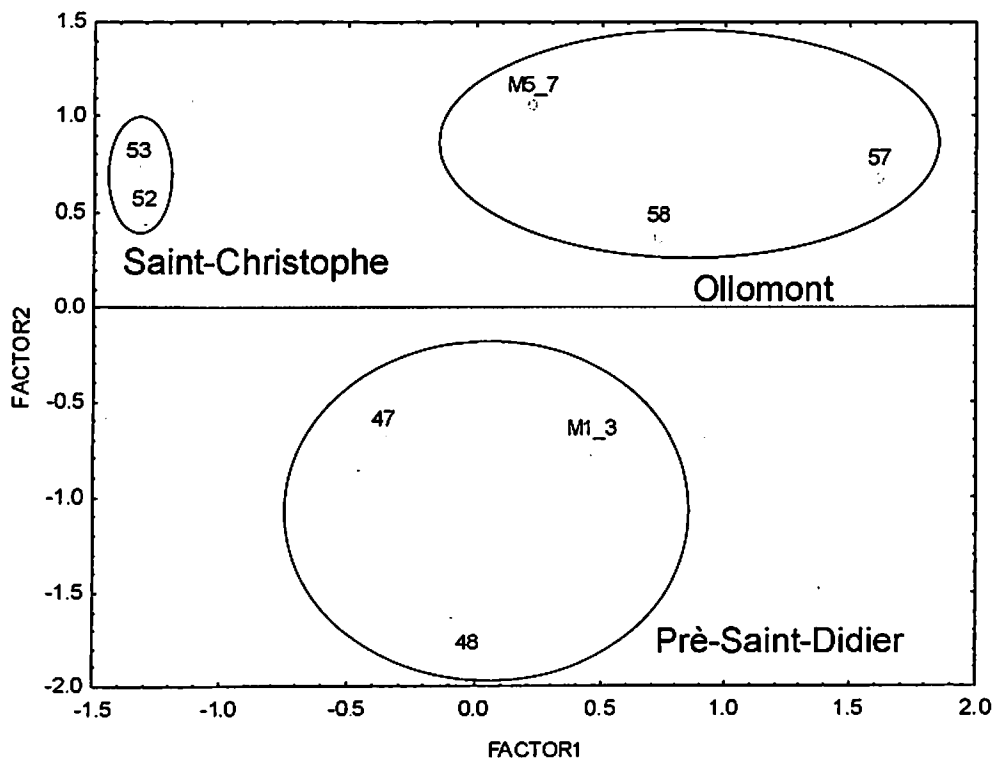


Figura 1 – Analisi delle Componenti Principali delle cariche microbiche che evidenzia l'influenza del fattore magazzino.
 Figure 1 – Principal components analysis of microbial counts which highlights the influence of maturing cellar factor.

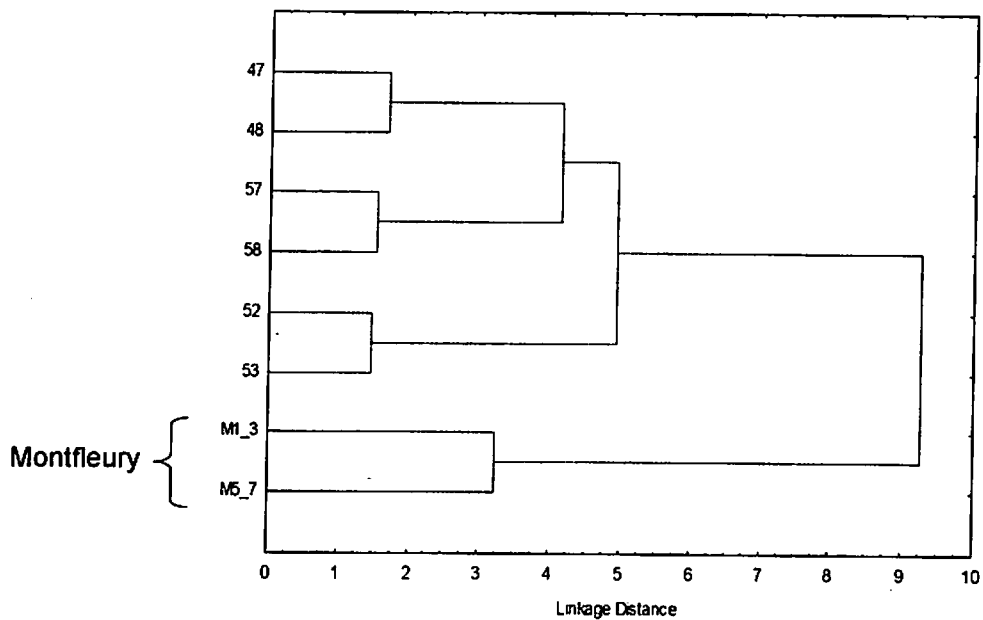


Figura 2 – Cluster Analysis delle cariche microbiche dei caseifici.
 Figure 2 – Microbial count Cluster Analysis of dairy farms.

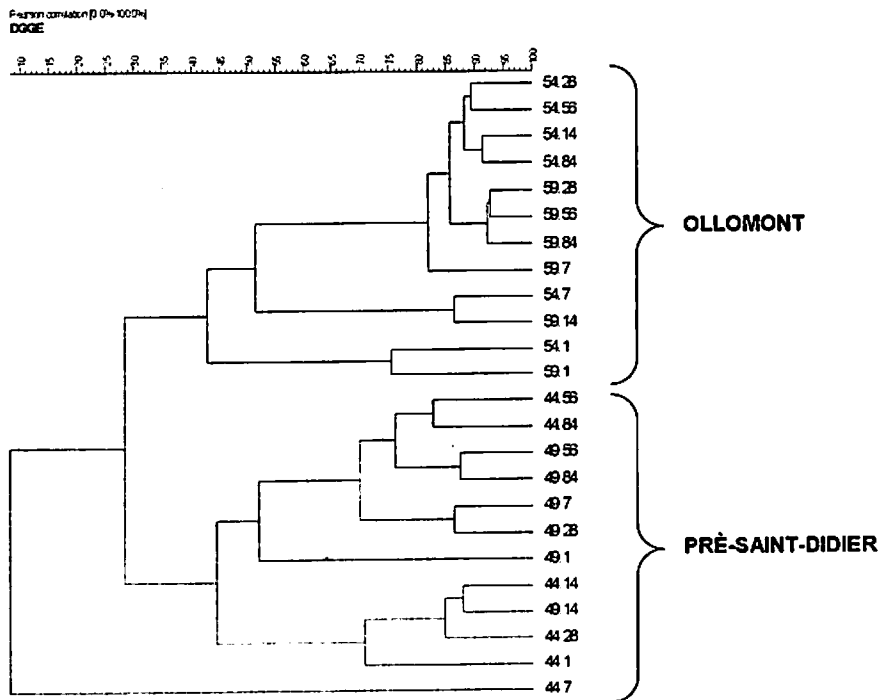


Figura 3 – Cluster Analysis dei profili DGGE delle cariche microbiche dei magazzini di Ollomont e Pré-Saint - Didier.
 Figure 3 – Microbial count Cluster Analysis of DGGE profiles of Ollomont and Pré-Saint - Didier maturing cellars.

L'identificazione genetica mediante RSA e PCR degli isolati appartenenti al gruppo degli enterococchi ha evidenziato la predominanza delle specie *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*. Tra i lieviti, identificati mediante il sistema API, è prevalsa la specie *Candida famata*.

RIASSUNTO – La Fontina DOP è un formaggio prodotto tradizionalmente in Valle d'Aosta. L'obiettivo di questa ricerca è stato quello di studiare e determinare l'evoluzione della microflora superficiale di questo formaggio attraverso l'utilizzo di piastre microbiologiche e con tecniche di analisi coltura-indipendenti (PCR-DGGE). I risultati ottenuti hanno evidenziato una microflora costituita principalmente da batteri corineformi con cariche massime intorno a 10^{10} UFC/g, CNC e LAB che hanno raggiunto cariche di 10^9 UFC/g a fine stagionatura e da enterococchi che sono stati individuati con cariche superficiali non superiori a 10^6 . Secondo l'analisi cluster dei profili DGGE, il magazzino di stagionatura sembra aver influenzato le dinamiche di sviluppo dei gruppi microbici presenti sulla superficie della Fontina DOP.

Parole chiave Fontina DOP, stagionatura, crosta, microflora

SUMMARY – *Development of surface microflora of Fontina PDO cheese and its influence on the maturing: first acquisitions.* – Fontina PDO is a cheese which is produced in Aosta Valley by tradition. The aim of this research was to study and to define the succession of microbial communities on the surface of this cheese by using traditional plating and culture-independent analysis (PCR-DGGE). The results obtained highlighted a microflora mainly made up of corineform bacteria whose highest concentration was 10^{10} CFU/g, CNC and LAB reached counts of 10^9 CFU/g at the end of ripening and enterococci were not detected with counts higher than 10^6 CFU/g. According to the cluster analysis of DGGE profiles, the maturing cellar environment seemed to have influenced the dynamics of microbial groups developing on Fontina PDO cheese surface.

Keywords: Fontina PDO cheese, ripening, rind, microflora

Ringraziamenti: Poster presentato al I Congresso Lattiero-Caseario AITeL. Bologna, 12 giugno 2008 "Acquisizioni scientifiche e valorizzazione del latte e dei derivati: aspetti genetici, ambientali e tecnologici".

BIBLIOGRAFIA

- 1) Chapman HR, Sharpe ME (1990). *Microbiology of cheese*. In R.K. Robinson (Ed.) *Dairy microbiology; the microbiology of milk products* (2 ed.), 203-289. London: Elsevier Applied Science.
- 2) Bockelmann W, Hoppe-Seyler T (2001). *The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk*. *Int. Dairy Journal*, 11, 307-314.

- 3) Rademaker JLW, Peinhopf M, RiJnen L, Bockelmann W, Noordman WH (2005). *The surface microflora dynamics of bacterial smear-ripened Tilsit cheese determined by T-RFLP DNA population fingerprint analysis*. *Int. Dairy Journal*, 15, 785-794.
- 4) Brennan NM, Alan CW, Beresford TP, Fox PF, Goodfellow M, Cogan TM (2001). *Biodiversity of the Bacterial Flora on the Surface of a Smear Cheese*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68 (2), 820-830.
- 5) Robinson RK, Batt CA, Patel DP (2000). *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol. 1, Academic Press, San Diego, California.
- 6) Rossi J, Gobetti M, Rossi A, Clementi F, Battistotti B (1989). *Relationship between microorganisms in defective Grana cheese*. *Sci. Tecn. Latt.-Cas.*, 40, 85-97.
- 7) Prillinger H, Molnár O, Eliskases-Lechner F, Lopandic K (1999). *Phenotypic and genotypic identification of yeasts from cheese*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 75 (4), 267.
- 8) Ercolini D (2004). *PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food*. *J. Microbiol Meth.*, 56 (3), 297-314.