Qualità del latte e dei formaggi
REGIONE PIEMONTE

Coordinamento editoriale
Andrea Marelli

Coordinamento tecnico
Paolo Aceto, Alba Cotroneo, Luisa Ricci, Alberto Turletti

Per informazioni
REGIONE PIEMONTE
Assessorato Agricoltura, Foreste, Caccia e Pesca
Direzione Agricoltura

Settore Servizi di Sviluppo Agricolo
C.so Stati Uniti, 21 – 10128 Torino
Tel: 011.4321466 – Fax: 011.537726

Settore Fitosanitario Regionale
Via Livorno, 60 – 10144 Torino
Tel: 011.4321473 – Fax: 011.4323710

www.regione.piemonte.it/agri/

È vietata la riproduzione dei testi e dei materiali iconografici senza autorizzazione e citazione della fonte.

Impaginazione e grafica: Verba Volant, Torino
Stampa: Centro stampa Regione Piemonte
Tiratura: 1000 copie – giugno 2012
Pubblicazione in distribuzione gratuita

Supplemento al n. 77 dei Quaderni della Regione Piemonte – Agricoltura
Registrazione al Tribunale di Torino n. 4184 del 5 maggio 1990
Direttore responsabile: Luciano Contorno
Presentazione

La ricerca in agricoltura costituisce un fattore essenziale per la competitività e la sempre maggiore sostenibilità ambientale e sanitaria del settore e delle diverse filiere agricole, all'interno di un contesto di attenzione alla qualità e alla tutela del consumatore e al benessere degli animali, come quello piemontese.

L'innovazione prodotta con l'attività di ricerca risulta strategica per le scelte imprenditoriali degli operatori delle filiere stesse e alimenta l'informazione che sta alla base della pianificazione della politica agricola regionale.

La presente collana dal titolo *Innovazione e sperimentazione in agricoltura* intende divulgare in modo sintetico i risultati ottenuti dall'attività di ricerca finanziata negli ultimi anni dalla Regione Piemonte ed è composta da quattro fascicoli monografici:

- *Rifiuti zootecnici e fertilizzazione organica*
- *Coltivazioni e allevamento estensivi e biologici*
- *Qualità del latte e dei formaggi*
- *Difesa fitosanitaria*

Tale produzione editoriale integra e completa la divulgazione dei risultati della ricerca effettuata attraverso la pubblicazione degli stessi sulla rivista regionale “Quaderni della Regione Piemonte – Agricoltura”.

Ogni volume contiene numerosi articoli divulgativi riferiti all'area tematica propria di ciascun fascicolo e si rivolge agli agricoltori, ai tecnici che operano in stretto contatto con gli operatori agricoli e alla comunità scientifica, tutti soggetti sempre più chiamati a fare sistema in un periodo difficile e di necessarie ristrutturazioni del settore quale quello attuale.

I quattro volumi della collana sono scaricabili in pdf dalla sezione “Pubblicazioni” del portale web della Direzione Agricoltura: www.regione.piemonte.it/agri/
Isolamento e caratterizzazione delle popolazioni microbiche autoctone da formaggio Castelmagno DOP e Raschera DOP ai fini della predisposizione di starter per la caseificazione

Introduzione

L’industria lattiero-casearia piemontese ha ormai raggiunto, grazie agli interventi mirati degli Enti di controllo ed ai numerosi interventi strutturali, la sicurezza igienico-sanitaria per tutte le sue produzioni, anche per quelle con maggiori problematiche quali quelle di alpeggio. Attualmente si sta così aprendo un nuovo fronte, complesso ed ampio almeno quanto quello della sicurezza: quello della qualità totale, intesa come l’insieme delle caratteristiche positive sia a livello organolettico-reologico-compositivo che nutrizionale. Le aziende agricole auspicano infatti di poter ottenere prodotti meno difettosi e più omogenei così da poter interessare la GDO, mentre i caseifici auspicano prodotti più ‘tipici’ e meno ‘standardizzati’.

È evidente che per entrambe le problematiche l’unica soluzione possibile sia quella dell’utilizzo di colture starter autoctone, le sole in grado di garantire prodotti standardizzati pur nella variabilità di areale e prodotti maggiormente caratterizzati e differenziati pur con l’utilizzo di latti pastorizzati. Si tratta di una soluzione già ampiamente utilizzata e con ottimi risultati in alcune produzioni italiane e da più parti richiesta anche per le produzioni piemontesi (ad es. Toma Piemontese).

Si tratta peraltro dell’unica soluzione possibile in quanto le particolari tecnologie di alcune produzioni impediscono di fatto un intervento tecnologico correttivo. Non potendo quindi modificare in modo significativo la tecnologia produttiva l’unica via possibile per il miglioramento qualitativo del prodotto resta la sostituzione della microflora presente con colture microbiche selezionate che garantiscono la standardizzazione produttiva pur mantenendo la tipicità del prodotto.

Tra i microrganismi di interesse tecnologico utilizzabili nella formulazione di starter un ruolo di primo piano è assunto, nel settore lattiero-caseario, dai batteri lattici che risultano essere determinanti nell’acidificazione del
Il prodotto, contribuendo alla selezione della microflora spontanea, ma anche nella formazione di composti aromatici e nella proteolisi. Nello specifico la caratterizzazione della microflora lattica autoctona permette di acquisire una conoscenza più approfondita relativa ai fenomeni di proteolisi che si verificano durante la stagionatura dei formaggi, in particolare la produzione di sapori sgradevoli dati dalla formazione di peptidi “amari”, il tutto con conseguente miglioramento dei caratteri organolettici del prodotto finale.

Gli obiettivi che il progetto si è prefissato di raggiungere sono stati quindi i seguenti:

- Isolare e caratterizzare genotipicamente e fenotipicamente i batteri lattici presenti nell’areale produttivo di due importanti formaggi tipici piemontesi, con la finalità di creare una apposita ceppoteca regionale della biodiversità salvaguardando quindi dall’estinzione le microflore autoctone presenti.
- Predisporre delle colture starter da fornire ai produttori e da utilizzare nelle produzioni da latte crudo e da latte pasteurizzato.
- Caratterizzare i batteri lattici isolati sia dal punto di vista genotipico, al fine di poter attuare il successivo controllo di qualità di produzione e l’attività ispettiva degli organismi preposti - consorzi - nel caso dovessero essere modificati i disciplinari di produzione, sia dal punto di vista chimico-nutrizionale, in relazione alle loro proprietà decarbossilanti ed alla loro azione nei fenomeni proteolitici come pure nella maturazione dei formaggi.

I formaggi oggetto della ricerca sono stati il Castelmagno DOP e il Raschera DOP. Per quel che riguarda il primo dei due, a ricerca in via di conclusione è stata pubblicata una domanda di modifica del disciplinare in cui, tra le altre cose, si veda l’utilizzazione di fermenti (Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea C320/14 del 24.12.2009). Tale modifica, quando sarà registrata, renderà impossibile l’utilizzazione dei microrganismi individuati nel corso dello studio. Riteniamo, tuttavia che tale aspetto non inflichi minimamente l’interesse e l’utilità dei risultati che vengono presentati in questo articolo in termini sia di aumento delle conoscenze, sia di salvaguardia della diversità del mondo microbio anche in vista di futuri e, per ora non immaginabili, utilizz.

### Castelmagno

Il progetto si è articolato in tre fasi di lavoro. Nella prima è stata esaminata la microflora caratterizzante di latti, cagliate e formaggi a dopo salatura ed a 30 e 60 giorni di stagionatura.
Per lo studio di questi batteri sono stati utilizzati anche metodi molecolari con le tecniche RSA 16S-23S (rRNA gene spacer analysis), PCR specie-specifiche e DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) al fine di identificare geneticamente le specie presenti.
È stato possibile osservare un aumento di carica della microflora lattica fino al momento della salatura. Nel latte infatti erano presenti $10^5-10^6$ cfu/mL che hanno raggiunto valori di $10^6$ cfu/g nella cagliata dopo tre giorni di sosta sotto siero per poi iniziare un lento ma inesorabile decremento, ascrivibile a fenomeni di aurolisi e competizione, fino a valori di $10^6$ cfu/g nel formaggio dopo 90 giorni di stagionatura.
L'andamento della carica della microflora lattica è risultata essere inversamente proporzionale a quello del pH che nelle prime fasi del processo produttivo presenta valori intorno alla neutralità per poi scendere a circa 4.7 nella cagliata dopo tre giorni di sosta sotto siero. Nelle ultime fasi del processo produttivo, quando la carica batterica decresce, i valori di pH subiscono nuovamente un lieve aumento fino a 5-5.1 dopo 90 giorni di stagionatura.
Nei campioni di latte, di cagliata e di formaggio dopo tre giorni dalla salatura, è stata evidenziata la netta prevalenza di Lactococcus lactis subsp. lactis (48,8-85,4%), responsabile della formazione di acido lattico e della conseguente diminuzione di pH.
Dagli stessi campioni sono stati isolati anche ceppi appartenenti alla sub. specie Lactococcus lactis subsp. cremoris, anche se con percentuali mai superiori al 18,8%.
Con il progredire della stagionatura è stata osservata la scomparsa dei lattococchi e la presenza dei lattobacilli, in particolare di Lactobacillus plantarum e Lactobacillus paracasei, due specie non starter che contribuiscono all'aromatizzazione del prodotto stagionato. Nei campioni di Castelmagno DOP analizzati sono risultate presenti, rispettivamente, in un range tra il 3% e il 36% e tra l'11% e il 49%.
Lactobacillus delbrueckii subs. lactis, Lactobacillus coryneformis subs. torquens e Lactobacillus casei sono stati invece isolati occasionalmente e in basse percentuali.
Per quanto riguarda invece gli enterococchi, presenti nel latte con una carica media di circa $10^4$ cfu/mL, Enterococcus faecium e Enterococcus faecalis sono risultate le specie più frequentemente isolate sia nel latte che nella cagliata. Benché la loro presenza nelle fasi di produzione possa essere associata a scarse condizioni igieniche del latte, durante le fasi di stagionatura possono svolgere un'intensa attività lipolitica ed essere quindi considerati una componente importante della microflora lattica dal punto di vista dell'aromatizzazione grazie anche all'elevata tolleranza per le condizioni acide, all'alta salinità ed alle basse temperature caratteristiche dei processi di stagionatura in luoghi freddi. La loro carica risulta aumentare sino a $10^7$ cfu/g nella cagliata dopo passaggio in siero per poi decrescere via via che procede la stagionatura sino a circa $10^6$ cfu/g nel formaggio a 90 giorni di maturazione.
La ricerca ha messo in evidenza che la microflora aerobica mesofila è presente nel latte crudo con valori di carica di $10^5$ cfu/mL e raggiunge i massimi livelli nella cagliata dopo i tre giorni di sosta sotto siero con $10^6$ cfu/g. Successivamente l'impastatura con sale che viene effettuata alla cagliata dopo essere stata tritata rallenta e inibisce parzialmente lo sviluppo della carica microbica aerobica mesofila che progressivamente decresce durante la stagionatura sino a valori di $10^4$ cfu/g nel formaggio a 90 giorni.

Andamento analogo si osserva anche per i lieviti e le maffe presenti nel latte con una carica di circa $10^6$ cfu/mL nel latte che diviene circa $10^5$ cfu/g nella cagliata dopo salatura per poi decrescere sino a circa $10^3$ cfu/g nel formaggio a 90 giorni di stagionatura.

Nella seconda parte dello studio, per ciascun campione di cagliata e formaggio sono stati quindi isolati 10-20 ceppi di batteri lattici e 3-5 cepi di enterococchi sottoposti successivamente a purificazione ed identificazione genetica mediante l'analisi PCR della regione spaziatrice 16S-23S e mediate PCR specie-specifiche.

Nell'ambito dei circa 200 cepi identificati sono stati scelti, per le analisi successive, alcuni rappresentanti delle specie più frequentemente isolate ed precisamente 5 cepi di L. plantarum, 5 di L. paracasei, 8 di Lactococcus lactis subsp. lactis e 1 Lactococcus lactis subsp. cremoris.

Questi cepi sono stati quindi utilizzati come starter in microcaseificazioni effettuate con circa 200 mL di latte secondo un protocollo internazionale che consentivano di ottenere mini-formaggi di circa 20 g di peso che dopo 60 giorni di stagionatura sotto vuoto a 10 °C sono stati sottoposti ad analisi HPLC al fine di valutare l'eventuale produzione da parte di questi ceppi di amine biogene. I risultati ottenuti hanno evidenziato che tutti i ceppi erano in grado di produrre amine biogene benché quattro di essi non producessero Isotamina ed altrettanti ne producessero quantità insignificanti e potevano essere quindi successivamente utilizzati nelle prove di messa a punto degli starter.

Parallelamente è stata intrapresa la ricerca di possibili fattori di virulenza nei ceppi appartenenti alle specie E. faecium ed E. faecalis, utilizzando primers disponibili in letteratura.

Nella terza ed ultima fase del progetto sono state effettuate presso il caseificio sperimentale dell'Istituto Lattiero-Caseario di Moretta cinque caseificazioni pilota, utilizzando alcuni dei ceppi di L. lactis subsp. lactis precedentemente isolati e caratterizzati.

Il processo di caseificazione seguito è stato analogo a quello utilizzato per la produzione di Castelmagno DOP con un riposo sotto siero di 3 giorni. Dopo oltre 100 giorni di stagionatura i formaggi sono stati esaminati da
un gruppo formato da tecnici e produttori evidenziando come quattro dei ceppi utilizzati abbiano dato origine a prodotti gradevoli e comunque con caratteristiche sensoriali e strutturali assimilabili a quelle del Castelmagno DOP.

Benché la richiesta di modifica impedisca al momento l’utilizzo di questi starter lo studio ha permesso di definire per la prima volta in modo esaustivo la microflora del Castelmagno e la sua evoluzione nel corso della produzione e stagionatura il che consentirà un migliore controllo del processo produttivo.

Parallelamente a questa sperimentazione è stata intrapresa, come da progetto, anche la ricerca di possibili fattori di virulenza in ceppi appartenenti alle specie Enterococcus faecium ed Enterococcus faecalis.

In particolare lo studio è stato condotto su 67 ceppi di E. faecalis e E. faecium, isolati da formaggio Castelmagno sui quali sono stati ricercati mediante metodiche biomolecolari i seguenti fattori di virulenza:

- _Agr_: proteina di aggregazione, coinvolta nell’aderenza alle cellule eucariote;
- _GelE_: tossina idrolizzante gelatina, collagene, emoglobina ed altri composti;
- _GylM, GylB, GylA_: geni coinvolti nella produzione, attivazione e trasporto di una citolisina ad attività emolitica;
- _Esp_: proteina associata alla parete cellulare coinvolta nell’evasione immunitaria;
- _EfaAsf_, _EfaAFm_: adesine favorenti l’aderenza alle cellule eucariote;
- _Cob, Cpd, Ccf_: feromoni, chemiotattici per i leucociti;
- _Van A_: fattore di resistenza alla vancomicina ed alla teicoplanina;
- _Van B_: fattore di resistenza alla vancomicina;
- _THDC_: gene della tirosina decarbossilasi responsabile della produzione di tiramina.

I risultati ottenuti dalla sperimentazione hanno evidenziato la capacità per i ceppi esaminati di produrre fattori responsabili di patogenicità nell’uomo quali _Ccf_, gene codificante feromoni e chemiotattici per i leucociti (80,6%), _EfaAsf_ un gene codificante per adesine favorenti l’aderenza alle cellule eucariote (59,7%) e _Esp_ proteina associata alla parete cellulare coinvolta nell’evasione immunitaria (41,8%).

Molto elevata è anche la percentuale di enterococchi isolati che possiede il gene codificante per la produzione di tiramina (56,7%). Nessun gene è risultato positivo per i principali geni codificanti la resistenza alla vancomicina A e B, indicando un impiego limitato pertanto di questi antibiotici sul territorio.

Un unico ceppo di _E. faecalis_ è risultato positivo per tutti i geni testati, ad esclusione della resistenza alle vancomicine mentre 3 ceppi sono risultati negativi per tutti i fattori di virulenza e 3 positivi per il solo gene TDH.
Raschera

Come già per il Castelmagno, anche per il Raschera il progetto si è sviluppato in tre fasi successive. Nella prima si è proceduto all’isolamento della microflora lattica e degli enterococchi presenti in una ventina di campioni di cagliata e di formaggi a varia stagionatura provenienti da caseifici ed alpeggi dall’area di produzione del Raschera e presso i quali non erano mai stati utilizzati starter.

Per ciascun campione sono stati isolati circa 10-15 ceppi di batteri lattici e 3-5 ceppi di enterococchi per un totale di 283 ceppi che sono stati sottoposti a purificazione mediante due passaggi in piastra secondo il metodo degli strisci successivi.

Tutti i ceppi così isolati sono stati quindi sottoposti ad identificazione genetica mediante l’uso di tecniche molecolari quali l’analisi della regione spaziatriche 16S-23S dei geni dell’rRNA, PCR specie-specifiche e Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).

In particolare i ceppi lattici isolati sono stati raggruppati sulla base dei profili RSA che hanno presentato e sono stati identificati mediante PCR specie specifiche. I ceppi che non hanno mostrato dei profili RSA chiari sono stati identificati mediante PCR-DGGE e sequenziamento del gene dell’rRNA 16S.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la predominanza della specie L. lactis subsp. lactis nei campioni sia di cagliata che di formaggio stagionato con percentuali che variano dal 55% al 70% sul totale degli isolati. È chiaro quindi il ruolo predominante di questo lattococco sia come starter nel processo di fermentazione lattica sia nella fase di stagionatura del prodotto.

Nei campioni di formaggio con 30 e 75 giorni di stagionatura sono stati isolati inoltre lattobacilli appartenenti alle specie L. paracasei e L. plantarum. Queste specie, presenti con frequenze di isolamento inferiori rispetto ai lattococchi, fanno parte di quella “microflora secondaria” non starter che interviene nel processo di stagionatura dei formaggi conferendo aromi e sapori tipici ai prodotti.

Gli enterococchi, in particolare le specie E. faecalis, E. faecium ed occasionalmente E. casseliflavus, sono risultati presenti durante tutto il processo di produzione e stagionatura del Raschera DOP. Nonostante la loro presenza nel settore lattiero-caseario sia spesso associata a scarse condizioni igieniche, il loro isolamento è stato correlato da diversi autori ad una intensa azione lipolitica e quindi alla formazione di composti aromatici che contribuiscono a caratterizzare il prodotto.

In minime percentuali infine sono stati isolati ceppi appartenenti alle seguenti specie: Streptococcus infantarius subsp. infantarius, Vagococcus carniphilus, Leuconostoc pseudomesenteroides, Lactococcus garvieae.
Nell’ambito dei 283 ceppi identificati sono stati scelti, per le fasi successive del progetto, alcuni rappresentanti delle specie più frequentemente isolate e precisamente 4 ceppi di *L. paracasei* e 16 di *L. lactis* subsp. *lactis*.

Nella seconda fase del progetto questi ceppi sono stati quindi utilizzati quali starter in microcaseificazioni al fine di definirne sia le attività acidificanti sia la produzione di amine biogene. I risultati ottenuti hanno evidenziato per 12 di questi ceppi una ridotta produzione di amine biogene unita ad una altrettanto contenuta attività acidificante e quindi la possibilità di un loro utilizzo quali starter nella produzione del Raschera.

Al fine di verificare dette potenzialità, nella terza fase del progetto, detti ceppi sono stati utilizzati sotto forma di lattocultura in una serie di caseificazioni sia su scala pilota presso il caseificio sperimentale dell’Istituto Lattiero-Caseario di Moretta sia industriale presso il caseificio Cooperativo di Frabosa Sopra (CN). I risultati ottenuti dalle valutazioni composite e soprattutto sensoriali effettuate a 30 e 60 giorni di stagionatura hanno evidenziato che due ceppi, il BF2 in purezza ed il FaF32 in miscela con il BF2 (20:80) possono fornire formaggi di ottime qualità, molto gradevoli con caratteristiche sensoriali e strutturali assimilabili a quelle del Raschera DOP. Similmente a quanto fatto per il Castelmagno, anche nel caso del Raschera, parallelamente all’isolamento ed alla caratterizzazione di ceppi di batteri lattici da utilizzarsi quali starter, è stata intrapresa la ricerca di possibili fattori di virulenza in ceppi appartenenti alle specie *E. faecium* ed *E. faecalis*.

È interessante notare che tutti i ceppi isolati da Raschera ed identificati come *E. faecalis* presentano almeno 3 o più fattori di virulenza.

In particolare il gene maggiormente riscontrato è stato il *Ccf*, coinvolto nella produzione di feromononi e chemiotattici per i leucociti. Al contrario, i geni codificanti per la citolosina (*CylM, CylB, CylA*) ed il fattore di aggregazione (*Agg*) risultano assenti in tutti i ceppi testati indipendentemente dalla specie. Molto elevata è risultata anche la percentuale di enterococchi isolati che possiede il gene codificante per la produzione di tiramina. Nessun ceppo è risultato invece positivo per i principali geni codificanti la resistenza alla vancomicina A e B il che indica un impiego limitato di questo antibiotico sul territorio. Relativamente alla ricerca dei geni coinvolti nelle resistenza alla tetracicline, è stato possibile valutare la corretta correlazione tra il fenotipo e il genotipo. Ceppi fenotypicamente resistenti a tale antibiotico possiedono infatti almeno uno dei quattro geni responsabili della resistenza. Al contrario, ceppi fenotypicamente sensibili non presentano nessuno di questi geni. I ceppi testati hanno confermato i dati presenti in bibliografia, dimostrando un’elevata resistenza intrinseca agli aminoglucosidi [kanamicina, streptomicina, neomicina], ai macrolidi [eritromicina] ed ai chinoloni come l’acido nalidixico.
Bibliografia