

# CARATTERIZZAZIONE DI BATTERI LATTICI DI UN FORMAGGIO TRADIZIONALE A PASTA FILATA

## CHARACTERIZATION OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM A TRADITIONAL PASTA FILATA CHEESE

Scarano C.<sup>1</sup>, Comunian R.<sup>2</sup>, Assaretti A.<sup>1</sup>, Paba A.<sup>2</sup>, Daga E.S.<sup>2</sup>, Cossu F., Viridis S.<sup>1</sup>, Spano V.<sup>1</sup>, Campus G.<sup>3</sup>, De Santis E.P.L.<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Biologia Animale-Sassari

<sup>(2)</sup> Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali, Agris Sardegna-Sassari

<sup>(3)</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna-Sassari

### SUMMARY

In this paper are reported the results of the characterization of the lactic acid microflora isolated from Sardinian "provoletta", a traditional pasta filata cheese obtained from cow's milk. Cheese samples from two batches were taken in triplicate from three dairy plants after 7 and 21 days of ripening. Each sample was analyzed for mesophilic and thermophilic lactic acid bacteria (LAB). From plates, 118 isolates were identified by Rep-PCR GTG<sub>5</sub>, species-specific PCR and DNA sequencing. The identified LAB belonged to 7 different species: *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. fermentum*, *E. faecalis*, *E. faecium* e *Lc. Lactis. Enterococci* were the most common isolates, they were recovered from all the dairy plants and from all the products analysed at 7 and at 20 days of ripening. Although with some differences within the various producers, the technology used aids mesophilic LAB growth, guaranteeing a large biodiversity protection.

### Key words

Lactic acid bacteria, traditional cheesemaking process, food safety

### INTRODUZIONE

La provoletta di latte vaccino sardo (peretta, provola) è un formaggio a pasta filata tradizionale della regione Sardegna (1), ottenuto con l'impiego di caglio di vitello. La peretta può essere realizzata con tecniche di lavorazione tradizionali in caseifici artigianali o industriali. Presenta caratteristiche estremamente variabili in relazione alla provenienza del latte da allevamenti intensivi o estensivi, trasformato crudo o a seguito di termizzazione o di pastorizzazione. La provoletta ha peso compreso fra i 400 g e 1-2 Kg. La durata della stagionatura, in relazione all'uso, è compresa fra due giorni e tre mesi (grattugia). Sul mercato è frequente la commercializzazione di prodotti analoghi ottenuti dalla filatura di cagliate di provenienza comunitaria. La tecnologia di produzione presenta variabili rappresentate dall'utilizzo di colture di avviamento naturali o

selezionate, dai tempi e dalle temperature di acidificazione e di filatura. Nei prodotti lattiero-caseari la microflora che interviene nell'acidificazione e nei processi di maturazione, costituita da specie apportate dalle colture di avviamento o da batteri lattici non-starter, esercita notevole influenza sulle caratteristiche sensoriali, di tipicità e di sicurezza (2;3). Il presente lavoro si propone di studiare e di caratterizzare la microflora lattica delle provolette di latte vaccino sardo prodotte in tre caseifici della Comunità Montana del Monte Acuto, con l'utilizzazione di differenti tecnologie di trasformazione.

### MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto in un caseificio industriale di medie dimensioni (A), in un minicaseificio artigianale, annesso ad una azienda zootecnica (B)

e in un caseificio semi artigianale (C). Presso ciascun caseificio, nel corso della lavorazione, si è proceduto alla rilevazione dei dati tecnologici e di produzione e relativi alla temperatura e al pH, mediante data-logger muniti di sonda (pH340i/SET, WTW, Germany). In ciascun caseificio, da due distinti lotti, si è proceduto al prelievo di tre perette, dopo 7 e 21 giorni di maturazione. I campioni venivano trasferiti presso il laboratorio refrigerati e sottoposti ad analisi. Da ciascun campione, previa asportazione della crosta, veniva effettuato il prelievo sterile della pasta. Dopo frammentazione in mixer, 25g del prodotto venivano addizionati con Buffered Peptone Water (BPW) e omogeneizzati in stomaker. Successivamente all'allestimento delle diluizioni decimali in BPW, è stata effettuata la determinazione dei seguenti parametri microbiologici: a) lattobacilli termofili in MRS agar (4) con incubazione a +45°C per 48h in anaerobiosi; b) lattobacilli mesofili in FH agar medium (5), con incubazione a +37°C per 72h in anaerobiosi; c) cocchi lattici termofili in M17 agar (6), con incubazione a +45°C (M17/45°C) per 48h in aerobiosi; d) cocchi lattici mesofili in M17 agar (6), con incubazione a +30°C (M17/30°C) per 48h in aerobiosi. Successivamente si è proceduto all'isolamento in purezza dei microrganismi che, dopo test preliminari (caratteri morfologici, della colorazione di Gram e produzione di catalasi), sono stati conservati a -80°C in MRS broth/glicerolo (1:1). La maggior parte degli isolati LAB, sono stati identificati attraverso la comparazione del loro profilo Rep-PCR GTG<sub>5</sub> (7;8) con quello del database del Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali di Agris Sardegna, contenente oltre 2000 profili appartenenti a differenti generi di LAB e CNS. Il DNA è stato estratto tramite FTA® Technology (Whatman International Ltd.). I prodotti di PCR sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio allo 0,8 % in buffer Tris-acetato a 90 V, successivamente colorato in una soluzione di bromuro d'etidio (0.5 g/ml). Le foto digitali dei profili Rep-PCR GTG<sub>5</sub> sono state analizzate col software BioNumerics® V 4.5 (Applied Maths) e la similarità tra i profili è stata calcolata usando il coefficiente di correlazione di Pearson. I dendrogrammi sono stati ottenuti utilizzando l'algoritmo UPGMA (9). Per confermare l'attribuzione della specie e per identificare gli isolati con profili che differiscono da quelli contenuti nel database, alcuni isolati sono stati amplificati con primers specie-specifici per le specie *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus* (10), *Lactobacillus plantarum* (11), *Lactobacillus delbrueckii* (12), *Lactococcus lactis* (13), *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* (14) o sottopo-

sti a sequenziamento del 16S rDNA (BMR Genomics, Spin-off dell'Università di Padova). Il DNA per le PCR specie-specifiche e per il sequenziamento è stato estratto da ciascuna colonia diluita in acqua distillata sterile, lisando la sospensione cellulare in microonde a 700 W per 15 min. I prodotti di amplificazione sono stati separati su gel di agarosio in buffer Tris-acetato a 100 V, successivamente colorati in una soluzione di bromuro d'etidio (0.5 g/ml). Su tutti gli isolati appartenenti al genere *Lactobacillus* è stato eseguito lo studio di popolazione applicando la tecnica Rep-PCR GTG<sub>5</sub>, attraverso l'elaborazione delle immagini digitali dei profili ottenuti mediante il software BioNumerics® V 4.5 come precedentemente descritto. Gli isolati con profili percentuali di similarità dei profili GTG<sub>5</sub> inferiori al 93% venivano considerati ceppi diversi tra loro (8).

## RISULTATI

Le tecnologie ed i parametri di processo rilevati nei tre caseifici mostravano sensibili differenze (Tabella 01). I risultati della ricerca dei LAB di provette per i diversi produttori sono riportate in Tabella 02. Dai campioni sono stati purificati e caratterizzati 118 isolati, dei quali: 64 dal prodotto dopo 7 giorni di maturazione (16 da MRS, 20 da FH, 10 da M17/30°C e 18 da M17/45°C) e 54 dal prodotto dopo 20 giorni di maturazione (7 da MRS, 14 da FH, 15 da M17/30°C e 18 da M17/45°C). I microrganismi identificati appartenevano a 7 differenti specie, diversamente distribuite all'interno dei caseifici, come mostrato in Tabella 03. *Enterococcus* spp è il genere più rappresentato (48% degli isolati totali) con isolamenti in tutti i caseifici e nei prodotti a 7 gg e a 20 gg. In relazione al caseificio si osserva una diversa distribuzione delle specie. Nei campioni del caseificio A, infatti, prevale *E. faecium* (n.14 isolati) rispetto a *E. faecalis* (n. 1 isolato), mentre in quelli dei caseifici B e C il rapporto tra le due specie è intorno al 50%. *Lb. paracasei* rappresenta il 28% degli isolati nei campioni provenienti nei tre caseifici, indipendentemente dal periodo di maturazione. *Lb. delbrueckii*, che costituisce l'11% degli isolati totali, è stato rilevato nei campioni prelevati da due dei tre caseifici (A e C). Tre delle specie isolate sono risultate esclusive, ciascuna, per uno dei caseifici. *Lb. fermentum* (8% degli isolati) è stato isolato nei campioni prelevati nel caseificio B, esclusivamente in quelli con 7 gg di maturazione. *Lc. lactis* (3% degli isolati) e *Lb. rhamnosus* (2% degli isolati) sono stati isolati solo dai campioni provenienti dal caseificio A.

Tabella 01- tecnologie di produzione della provoletta da latte vaccino sardo (3 caseifici)

		caseificio A	caseificio B	caseificio C
provenienza latte		diversi conferenti	allevamento annesso	diversi conferenti
raccolta (n. mungiture)		2	2	3
latte		termizzato (65°C)	crudo	crudo
coltura starter		selezionata	siero innesto	siero innesto
caglio		vitello	vitello	vitello
rottura cagliata		nocciola	chicco di riso	chicco di riso
acidificazione cagliata				
T= 0 h	temperatura	40°C	43°C	41°C
	pH	6.6	6.4	6.6
T= 20 h	temperatura	19°C	7°C	14°C
	pH	5.2	5.3	5.1
acqua filatura	temperatura	+78 °C	+64°C	+81°C
pasta termine filatura	temperatura	+47°C	+47°C	+57°C
	pH	5.2	5.2	4.95
acqua raffreddamento	temperatura	+18°C	+22,5°C	+11,3°C
immersione in salamoia		6 ore/kg	12 ore/kg	8-9 ore/kg

Tabella 02 Lattobacilli e cocchi lattici in provolette da latte vaccino sardo (3 caseifici)

Caseificio	stagionatura <sup>a</sup>	lotto	MRS 45°C	FH 38°C	M17 45°C	M17 30°C
A	7	1	7,2±0,7 <sup>b</sup>	7,4±0,5	nd	nd
	20		6,5±0,9	7,6±0,3	6,8±1,2	7,4±0,5
	7	2	7,4±0,8	7,6±0,3	6,6±0,1	8,6±0,1
	20		8,2±0,3	7,0±1,2	8,8±0,6	8,2±0,5
B	7	1	4,0±3,5	8,4±0,1	nd	nd
	20		5,9±1,5	8,4±0,1	8,1±0,5	8,9±1,1
	7	2	5,7±1,8	8,2±0,0	9,3±0,1	9,2±0,2
	20		4,6±1,1	8,6±0,3	7,2±1,5	7,6±1,9
C	7	1	5,5±1,0	8,2±0,1	6,9±0,2	7,4±0,2
	20		4,6±0,2	8,5±0,0	7,1±0,4	6,7±1,2
	7	2	4,1±1,1	5,5±0,6	6,3±0,1	6,7±0,1
	20		4,8±0,1	8,5±0,3	6,8±1,2	6,9±1,4

<sup>a</sup>:giorni; <sup>b</sup>:log ufc/g (media±ds); nd: non determinato

Tabella 03 Lattobacilli e cocchi lattici isolati per produttore e in relazione alla maturazione

	Caseificio						Totale
	A		B		C		
Stagionatura (giorni)	7	20	7	20	7	20	
<i>Lb. paracasei</i>	6 <sup>b</sup>	3	9	5	5	4	32
<i>Lb. rhamnosus</i>	-	2	-	-	-	-	2
<i>Lb. delbrueckii</i>	3	3	-	-	3	4	13
<i>Lb. fermentum</i>	-	-	10	-	-	-	10
<i>E. faecalis</i>	-	1	3	5	5	6	20
<i>E. faecium</i>	5	9	4	7	8	4	37
<i>Lc. lactis</i>	3	1	-	-	-	-	4
Totale	11	19	26	17	21	18	118

<sup>a</sup>:giorni; <sup>b</sup>:n.isolati;

Gli isolati appartenenti al genere *Lactobacillus* (n.57) sono stati caratterizzati a livello di ceppo. La percentuale di diversità [(N. ceppi/N. isolati) x 100] è risultata compresa tra il 69 e il 100%. *Lb. paracasei* (n. 32 isolati) era rappresentato da 22 ceppi (diversità 69%), uno dei quali riscontrato nel prodotto a 7 gg di maturazione in due caseifici (A e C). *Lb. fermentum* (n. 10) era rappresentato da 9 ceppi (diversità 90%). *Lb. delbrueckii* (n. 6), è stato isolato in proviolette del caseificio A, era rappresentato da ceppi differenti fra loro (100%). *Lb. delbrueckii* (n. 7), isolato dal caseificio C, era rappresentato da 6 ceppi differenti (biodiversità del 86%). *Lb. rhamnosus*, isolato dal caseificio A, era rappresentato da due isolati differenti fra loro.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La tecnologia di produzione nei diversi caseifici mostra sensibili differenze, per il tipo di innesto utilizzato, per le modalità di preparazione dello stesso (incubazione a temperatura ambiente, per poche ore per il caseificio B e per circa una giornata per il caseificio C), per la temperatura dell'acqua di filatura, della pasta filata e per i tempi di permanenza in salamoia. La microflora lattica è costituita da specie termofile e mesofile. Le specie dominanti appartengono al gruppo degli enterococchi (*E. faecium* ed *E. faecalis*), particolarmente resistenti a condizioni di sviluppo difficili (sale, acidità ed alte temperature) e a *Lb. paracasei*, specie mesofila, ma piuttosto resistente al calore (15). Le proviolette del caseificio A risultano caratterizzate da maggiore biodiversità a livello di microrganismi. Nei prodotti del caseificio A sono state riscontrate sei diverse specie e, tra queste, *Lc lactis* e *Lb. Rhamnosus*, sono risultate esclusive di questo caseificio. *Lb. delbrueckii*, isolato solo nei caseifici A e C, presenta una elevata biodiversità a livello di ceppo. La specie *Lb. fermentum* è stata isolata esclusivamente nei prodotti nel caseificio B di un unico lotto. La sua presenza è probabilmente legata alla tecnologia di produzione artigianale, in cui il raffreddamento del formaggio dopo la formatura, contrariamente a quanto accade nei caseifici A e C, avviene lentamente, creando le condizioni per un importante sviluppo di LAB termofili. In conclusione, la tecnologia di produzione utilizzata dai diversi produttori, se pur con alcune differenze sul diagramma di processo, favorisce lo sviluppo preponderante di una microflora LAB mesofila, consentendo la salvaguardia di un'elevata biodiversità a livello di ceppo all'interno delle specie del genere *Lactobacillus* provenienti dall'ambiente di produzione.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) MIPAAF, (2008). Decreto Direttoriale 16 giugno 2008. Ottava revisione dell'elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali *Gazzetta Ufficiale* 30 giugno 2008, n. 151, (S.O.).
- 2) Irlinger F. and Mounier J. (2009), Microbial interaction in cheese: implication for cheese quality and safety, *Current Opinion in Biotechnology*, 20, 1-7
- 3) Jany J.L. and Georges B. (2008), Culture-independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Food Microbiology*, 25, 839-848
- 4) De Man J.C., Rogosa M., Sharpe M.E. (1960), A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 23, 130-135
- 5) Isolini D., Grand M., Glattli H. (1990), Selective media for the enumeration of obligately and facultatively heterofermentative lactobacilli. *Schweiz Milchwirtschaft Forschung*, 19, 57-59
- 6) Terzaghi B.E. and Sandine W.E. (1975), Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807-813
- 7) Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F.J., Lupski J.R. (1994), Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Molecular Cell Biology* 5, 25-40.
- 8) Gevers D., Huys G. and Swing J. (2001), Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 31-36.
- 9) Vauterin L. and Vauterin P. (1992), Computer-aided objective comparison of electrophoretic patterns for grouping and identification of microorganisms. *European Microbiology*, 1, 37 – 41.
- 10) Ward L.J.H and Timmins M.J. (1999), Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29, 90-92.
- 11) Torriani S., Felis G.E., Dellaglio F. (2001), Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by recA gene sequence analysis and multiplex PCR assay with recA gene-derived primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 3450-3454.
- 12) Lick S., Brockmann E., Heller K.J. (2000), Identification of *Lactobacillus delbrueckii* and subspecies by hybridization probes and PCR. *Systematic Applied Microbiology*, 23, 251-259.
- 13) Dedeo P., Floris R., Lombardi A. (1996), Identification of lactococci and enterococci from Sardinian and Veneto region cheeses. *Third Plenary Meeting COST '95 Action*, Thessaloniki (Greece), 10-12 October 1996. Official Journal of the European Union.
- 14) Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barrett J.B. (2004), Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 3558-3565.
- 15) Christiansen P., Waagner Nielsen E., Vogensen F.K., Brogren C.H., Ard Y. (2006), Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurised milk. *International Dairy Journal*, 16, 1196-1204.

*Ricerca eseguita con finanziamento della Comunità Montana del Monte Acuto*