

CARATTERIZZAZIONE DELLA FLORA LATTICA AUTOCTONA DI UN FORMAGGIO CAMPANO AL PEPERONCINO PRODOTTO DA LATTE CRUDO DI PECORA

CHARACTERIZATION OF AUTOCHTHONOUS LACTIC FLORA OF A CAMPANIAN CHILLI CHEESE PRODUCED FROM RAW SHEEP MILK

Mormile A.¹, Barile M.¹, Murru N.¹, K. Johanna Björkroth²

¹Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti di O.A. Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli "Federico II"; ²Dipartimento di igiene degli alimenti e dell'ambiente, Università di Helsinki, Finlandia

SUMMARY

The natural lactic flora of the artisanal chilli "Tramonti" cheese, a typical product manufactured in the "Lattari mountains", area of Salerno province (Italy), was investigated. Particular attention was paid to the growth dynamics assessment and to the molecular identification of the indigenous lactic acid bacteria involved in the ripening of this cheese made with raw sheep milk without starter cultures. One batch was monitored taking 4 sample on 0, 30, 50 and 105 ripening days. *Lactobacillus* and *Lactococcus* were enumerated and randomly isolated on MRS and LM17 agar (32°C x 48h -mesophilic flora- and 42°C x 48h -thermophilic flora), respectively. N. 66 presumptive lactic acid bacteria isolates, gram positive and catalase negative, were genotypically identified by Ribotyping. Mesophilic *Lactobacillus* remained at levels of 10⁷ cfu/g during whole maturation time and thermophilic *Lactobacillus*, from initial values of 10⁵ cfu/g, reached concentrations of 10⁶ cfu/g at the end of maturation. Mesophilic and thermophilic *Lactococcus* showed, on average, levels of 10⁶ since the beginning of the ripening. Ribotyping allowed to detect 4 lactic acid bacteria species: *Enterococcus faecium* (65,15%), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (24,24%), *Enterococcus faecalis* (6,06%) and *Enterococcus durans* (4,54%), showing the diversity of indigenous lactic acid bacteria of chilli "Tramonti" cheese.

KEYWORDS

Raw milk cheese, Lactic acid bacteria, Bacterial identification, Ribotyping.

INTRODUZIONE

L'Italia è fra i paesi che contano il maggior numero di prodotti caseari "tipici" di risonanza sia nazionale ed internazionale sia limitata alle regioni di produzione ed alle zone circostanti ma non per questo meno importanti sotto l'aspetto culturale, economico e sociale. L'ecologia microbica di tali alimenti fermentati ne condiziona ampiamente il processo di produzione e la qualità. Il casaro, secondo metodiche di produzione tradizionali, confida esclusivamente sulla flora lattica naturalmente presente nel latte che, per l'assenza di standardizzazione quantitativa e qualitativa, garantisce certamente la tipicità e

l'unicità del formaggio ma non sempre una sufficiente sicurezza igienico-sanitaria. Nelle produzioni casearie artigianali, quindi, l'esatta conoscenza della popolazione lattica naturale ha assunto un ruolo d'importanza crescente per fornire gli elementi fondamentali per l'isolamento e la selezione di caratteristici biotipi lattici *starter*, co-*starter* e protettivi. Il loro utilizzo, infatti, risulta tecnologicamente molto utile non solo nella fase di acidificazione, ma anche nelle successive fasi di maturazione e rifinitura e ne assicura la sicurezza igienico-sanitaria senza alterarne le proprietà organolettiche. In tale contesto si colloca il presente studio il cui scopo è stato quello di conoscere e

monitorare la flora lattica indigena di un formaggio al peperoncino prodotto da latte crudo di pecora secondo metodica tradizionale, senza l'aggiunta di colture starter, nel comune di "Tramonti", così detto per la sua ubicazione tra 2 cime dei Monti Lattari, in provincia di Salerno. In particolare, si è analizzata la diversità della comunità lattica a livello di specie e la sua dinamica di sviluppo lungo le varie fasi di maturazione del formaggio.

MATERIALI E METODI

In un piccolo caseificio a conduzione familiare, sito nel comune di Tramonti, da marzo a settembre 2010, sono stati effettuati campionamenti rappresentativi di 1 lotto di formaggio semiduro al peperoncino, tradizionalmente prodotto con latte crudo di pecora senza l'aggiunta di colture starter. N. 4 campioni di pecorino, prelevati ai giorni 0, 30, 50 e 105 di stagionatura, sono stati trasportati in contenitore isoterico a +4°C presso il laboratorio di microbiologia della Sezione di Ispezione del Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti della Facoltà di Veterinaria di Napoli, dove sono stati ricercati i Lattobacilli mesofili (Lbm) e termofili (Lbt) su piastre di MRS agar (CM0361, OXOID) incubate in anaerobiosi mediante overlay a 32°C e 42°C per 48h ed i Lattococchi mesofili (Lcm) e termofili (Lct), su piastre di M17 agar (CM0785, OXOID) contenente 1% lattosio (LM17), incubate in aerobiosi a 32°C e 42°C per 48h. N. 67 presunti stipiti di batteri lattici, gram positivi e catalasi negativi, isolati in coltura, sono stati stoccati su slant di TSA e spediti in contenitore isoterico a +4°C al Dipartimento di Igiene degli alimenti e dell'ambiente dell'Università di Helsinki per essere tipizzati genotipicamente mediante Ribotyping. A tal fine, 8µg del DNA genomico di ciascun batterio, estratto con il metodo guanidiniotiocianato (1)(2) da 2 ml di una brodo coltura di arricchimento in LM17 incubata overnight a 25°C, sono stati digeriti mediante gli enzimi di restrizione *HindIII* ed *EcoRI*. I risultanti frammenti di DNA sono stati poi separati mediante corsa elettroforetica (25V/16h) in gel di agarosio all'0.8% (SeaKem IDNA agarose, FMC, Rockland, USA) in a GNA 200 apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden), trasferiti su membrana nylon (MSI, Westboro, USA) mediante Southern blotting in VacuGene XL blotting system (Pharmacia), fissati mediante irradiazione UV in un Spectrolinker XL 1000 (Spectronics Corporation, New York, NY, USA) ed ibridati a 53°C overnight (Techne Hybridizer; Techne, Cambridge, United Kingdom) con un rDNA DIG OligoMix5 probe (3). I risultanti rRNA gene *HindIII* ed *EcoRI* RFLP patterns (ribopatterns)

sono stati scannerizzati (Hewlett-Packard ScanJet 4c/T (Boise, Idaho scanner) ed inseriti nel BioNumerics software package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) per l'analisi numerica ed il clustering mediante sistema UPGMA (figura 1)(figura 2).

RISULTATI

I batteri lattici, da valori iniziali di 10^6 ufc/g (Lcm; Lct), 10^5 ufc/g (Lbt) e 10^7 ufc/g (Lbm), hanno raggiunto un picco massimo di crescita nel 1° mese di stagionatura attestandosi rispettivamente a 10^8 ufc/g (Lcm; Lbm) e 10^7 ufc/g (Lct; Lbt). Successivamente ciascuna classe di LAB ha mostrato una leggera decrescita, raggiungendo al 105° giorno di stagionatura valori rispettivamente di 10^6 ufc/g (Lcm; Lct; Lbt) e 10^7 ufc/g (Lbm) (grafico 1). L'analisi molecolare, eseguita su 66 ceppi lattici isolati, ha rilevato la presenza di 4 diverse specie di batteri lattici: *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* come gruppo di starter autoctono dominante, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* ed *Enterococcus faecium* come gruppo di batteri non-starter (NSLAB). *Enterococcus faecium*, tra le specie di NSLAB, è stata quella caratterizzata dalla maggiore frequenza d'isolamento (43=65,15%). L'identificazione delle specie di *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans*, è conseguita all'analisi comparativa tra rRNA *HindIII* patterns ed rRNA *EcoRI* patterns di due ceppi scelti come capostipiti dei suddetti cluster (grafico 2).

Grafico 1.

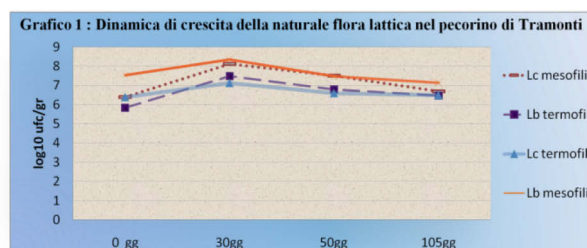


Grafico 2.

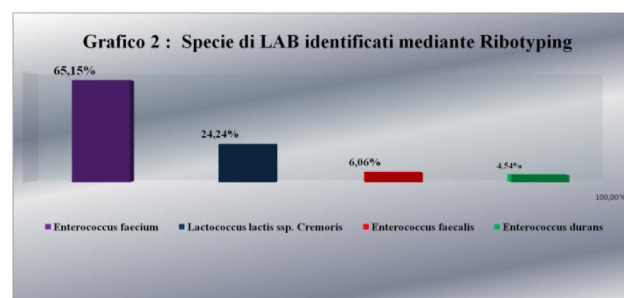


Figura 1. Dendrogramma ottenuto con rRNA *HindIII* restriction patterns raffigurante i

cluster di *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* e di *Enterococcus faecalis*.

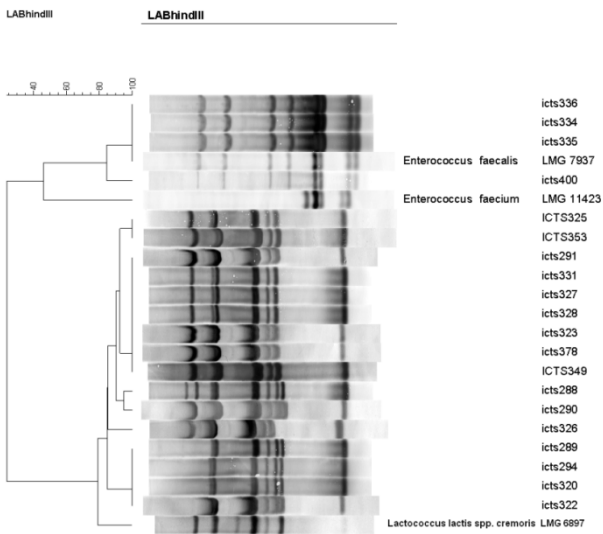
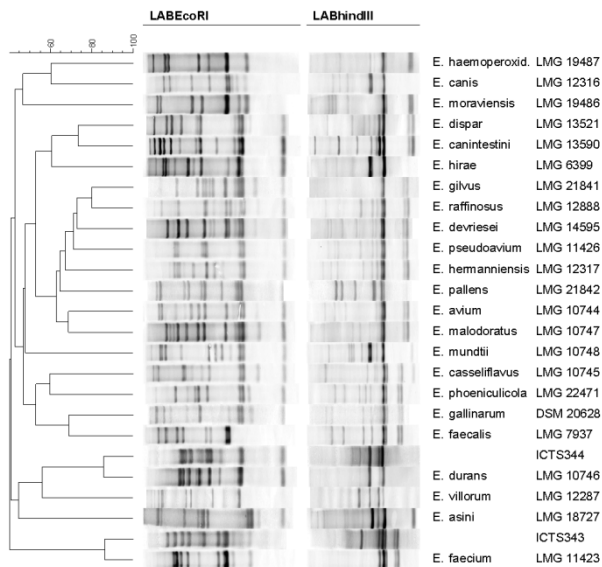


Figura 2. Dendrogramma ottenuto dalla comparazione dei rRNA *HindIII* e *EcoRI* restriction patterns del ceppo ICTS 343 ed ICTS 344 scelti a rappresentare i cluster di *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans*.



CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati hanno consentito di valutare l'andamento della flora lattica e l'identificazione genotipica delle specie di batteri lattici naturalmente coinvolte nel processo di stagionatura del pecorino al peperoncino di Tramonti. Le curve di crescita della microflora lattica, mai prima esaminate, hanno presentato un andamento sovrapponibile a quanto riscontrato da altri autori in formaggi tradizionali (4)(5)(6). Quale metodo di caratterizzazione molecolare dei ceppi lattici isolati è stato selezionato il Ri-

botyping per il suo ampio utilizzo nella tipizzazione genetica di diverse specie batteriche, inclusi i batteri lattici (7)(8)(9). A riprova di ciò, nel nostro studio, il totale dei 66 ceppi lattici isolati in coltura è stato tipizzato a livello di famiglia, specie e sub specie dall'analisi numerica e comparazione dei rispettivi ribopatterns con quelli degli oltre 3000 isolati e circa 170 ceppi tipo e di riferimento presenti nel database di identificazione dei LAB del Dipartimento di igiene degli alimenti e dell'ambiente dell'Università di Helsinki. Dallo studio molecolare della flora lattica è emersa una predominanza dei generi *Lactococcus* ed *Enterococcus*, come rilevato in precedenti studi su formaggi artigianali da latte crudo (10)(11). Nell'ambito del primo genere, la specie dominante è risultata il *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, che ha caratterizzato il prodotto fino al 30° giorno di stagionatura, esplicando un'essenziale attività starter di acidificazione e di iniziale proteolisi, di supporto a quella principale svolta dai batteri del genere *Enterococcus* (11). Questi ultimi sono risultati dominanti in tutte le fasi di processo, in accordo con studi precedenti (4). La presenza e la permanenza di tali germi, nel corso della stagionatura, potrebbe essere associata ad una contaminazione fecale durante il processo di lavorazione ed alla capacità di tali microrganismi di crescere ad elevate concentrazioni saline, ad alte temperature e bassi valori di pH (12) (4). Lo studio effettuato ha consentito di individuare, nel pecorino al peperoncino di "Tramonti", una flora lattica naturale e tipica, verosimilmente presente nel latte crudo e selezionata durante il processo di maturazione. La tecnologia dei formaggi a latte crudo senza innesto, come quello esaminato, riproduce processi di caseificazione antichi, basati esclusivamente sulla selezione indotta dai parametri di trasformazione sulla flora lattica naturale del latte nonché sull'attività competitiva ed antimicrobica di quest'ultima verso la popolazione microbica alterante e patogena, eventualmente presente (10). I ceppi lattici isolati e caratterizzati nel presente lavoro, dopo ulteriori indagini, potranno essere utilizzati come colture indigene non starter protettive e/o aromatizzanti da impiegare per la produzione di formaggi che mostrino carattere di unicità.

BIBIOGRAFIA

1. Björkroth, J., & Korkeala, H. (1996). rRNA gene restriction patterns as a characterization tool for *Lactobacillus sake* strains producing rosy slime. *Int J Food Microbiol*, 30(3), 293-302.

2. Pitcher, D., Saunders, N., & Owen, R. (1989). Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, 8(4), 151-156. Blackwell Publishing Ltd.
3. Regnault, B., Grimont, F., & Grimont, P. A. (1997). Universal ribotyping method using a chemically labelled oligonucleotide probe mixture. *Res Microbiol*, 148(8), 649-659.
4. Giraffa, G. (2003). Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215-222.
5. Murru N., Barile M., Mormile A., Ceres C., Cortesi M.L. Microbiological characterization during ripening of "Carmasciano" A sheep's raw milk cheese. Second SAFE Consortium International Congress on Food Safety: Novel Technologie and Food Quality, Safety and Health. 27-29 April 2009 Girona, Catalunya, Spain.
6. Scatassa, M.L., Costa, A., Ciaccio, P.S., Di Noto, A.M., (2005) "Formaggio pecorino siciliano: Processo produttivo ed indagine microbiologica". 13° Congresso Internazionale della Fe.Me.S.P.Rum, 113.
7. González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18(6), 716-722.
8. Köhler, G., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (1991). Differentiation of lactococci by rRNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 68(3), 307-312.
9. Rodtong, S., & Tannock, G. W. (1993). Differentiation of Lactobacillus strains by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(10), 3480-3484.
10. Barile M., Murru N., Mormile A., Ceres C., Cortesi M.L. Isolation of non starter Lactic Acid Bacteria (NS-LAB) bacteriocin producing in Italian traditional sheep's cheese active against *Listeria monocytogenes* . Second SAFE Consortium International Congress on Food Safety: Novel Technologie and Food Quality, Safety and Health. 27-29 April 2009 Girona, Catalunya, Spain.
11. Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, A. (1997) Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research*, 64, 409-42.
12. Gelsomino, R., Vancanneyt, M., Cogan, T.M., Condon, S., & Swings, J. (2002). Source of Enterococci in a Farmhouse Raw-Milk Cheese. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(7), 3560-3565.