

L'EVOLUZIONE DEL MICROBIOMA DURANTE LA CASEIFICAZIONE E LA STAGIONATURA: IL CASO DEL GRANA TRENINO

Elena Franciosi^{1*}, Luca Monfredini¹, Elisa Poznanski^{1,2}, Luca Settanni^{1,3}, Fausto Gardini⁴, Agostino Cavazza¹

¹Fondazione Edmund Mach - Centro Ricerca e Innovazione, via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige (TN), Italia

²Libera Università di Bolzano, piazza Università 1, 39100 Bolzano (BZ), Italia

³Università degli Studi di Palermo, viale delle Scienze 4, 90128 Palermo (PA), Italia

⁴Università di Bologna, piazza Goidanich 60, 47023 Cesena (FC), Italia

(*e-mail: elena.franciosi@iasma.it)

Riassunto La composizione microbica del Grana Trentino e del suo siero-innesto è stata studiata non solo in relazione alla differente tecnologia di raccolta e conservazione del latte ma anche in relazione al tempo di stagionatura e alla zona di campionamento. Per una serie di lavorazioni si è determinata la composizione microbica di latte, siero e di due forme gemelle, aperte dopo 9 e 18 mesi. Queste sono state tagliate lungo l'asse verticale e sono state campionate tre diverse zone lungo la diagonale: sotto la crosta, al centro e in posizione mediana. I campioni sono stati analizzati tramite metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti (DGGE e 454 pyrosequencing) e i risultati sono stati messi in relazione con le analisi chimiche degli acidi grassi a corta catena. Batteri termofili sono stati trovati, come atteso, in grandi quantità sia nel siero cotto che nel siero-innesto. Dopo 9 mesi le conte erano più alte che dopo 18, e nel centro erano più basse che nelle altre due zone campionate. Le principali specie isolate da formaggio, all'analisi fenotipica, erano diverse da quelle isolate da latte e siero. Il microbiota nel sotto crosta e nella zona intermedia era dominato da *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, mentre al centro vi era una maggiore presenza di *Lb. rhamnosus*. Dopo 18 mesi, i batteri lattici (LAB) erano assenti. L'analisi tramite pyrosequencing 454 ha permesso di individuare la dominanza di Streptococcaceae nella parte centrale delle forme di 18 mesi.

Parole chiave Grana Trentino, microbioma, pyrosequencing 454

INTRODUZIONE

Nonostante la microbiologia svolga un ruolo fondamentale durante le varie fasi di produzione di formaggi a pasta dura, ad oggi esistono ancora pochi lavori riguardanti l'evoluzione della microflora lattica durante la maturazione di formaggi tipo Grana.

Lo studio dei formaggi a pasta dura tipo Grana si è focalizzato per anni sull'analisi della composizione microbiologica del siero-innesto termofilo (Giraffa *et al.*, 1998; Lazzi *et al.*, 2004; Andrichetto *et al.*, 2004; Gatti *et al.*, 2006; Fornasari *et al.*, 2006; Santarelli *et al.*, 2008; Rossetti *et al.*, 2008), probabilmente perché si riteneva che la microflora dell'innesto, responsabile dell'acidificazione iniziale del latte, essendo termofila, fosse in grado di resistere alle fasi successive della lavorazione e fosse

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

quindi responsabile delle caratteristiche finali del formaggio. Inoltre, mentre risulta semplice reperire campioni di siero da analizzare, altrettanto non si può dire riguardo i campioni di formaggio: per ottenerli, infatti, è necessario aprire la forma. La parte della forma che rimane dopo il campionamento (cioè la quasi totalità del prodotto), non potendo più essere richiusa, è destinata ad essere eliminata o venduta in porzioni, con conseguente perdita di valore commerciale. Data la grande pezzatura delle forme per i formaggi a pasta dura questo si traduce in una perdita economica non indifferente per il caseificio.

Solo ultimamente sono apparsi alcuni lavori su Parmigiano-Reggiano in cui si è valutata la composizione microbiologica del formaggio. Gala *et al.* (2008) hanno fornito un quadro complessivo della composizione del microbiota presente nel formaggio dopo 12 mesi di stagionatura sia con approcci di microbiologia classica, sia con approcci molecolari, mirati all'identificazione delle specie presenti. Gatti *et al.* (2008), invece, hanno analizzato tutte le fasi del processo di produzione del Parmigiano, dal latte in caldaia al formaggio dopo 24 mesi di stagionatura, campionando le forme ogni mese, ed hanno identificato per ogni fase le specie presenti distinguendole tra specie che non hanno ancora lisato e specie che invece sono andate incontro ad autolisi. Entrambi questi lavori contribuiscono a delineare un quadro di maggiore chiarezza riguardo il susseguirsi delle specie durante la produzione del Parmigiano-Reggiano, ed attribuiscono agli NSLAB un ruolo importante durante la maturazione.

Ad ogni modo, ad oggi non esistono ancora lavori riguardanti l'evoluzione microbica in altri formaggi a pasta dura (Grana Padano e Trentino). Inoltre molti di questi lavori soffrono di problemi metodologici: con i metodi tradizionali (coltura-dipendenti) è noto che non si riesce a esplorare più del 5% di una popolazione microbica ma anche avvalendosi di tecniche molecolari coltura-indipendenti quali la DGGE, si riesce ad avere una fotografia esclusivamente delle popolazioni dominanti e non di quelle minoritarie.

Il Grana Trentino, al contrario dei suoi due "cugini" più noti, il Grana Padano ed il Parmigiano-Reggiano, precedentemente a questo progetto non è mai stato studiato dal punto di vista microbiologico, né da quello tecnologico.

Obiettivo del presente lavoro è stato lo studio dell'evoluzione della microflora lattica durante il processo produttivo del Grana Trentino. Il ruolo dei batteri lattici starter e non starter (SLAB e NSLAB) durante la maturazione del formaggio è stato studiato mediante l'analisi con tecniche di microbiologia classica (conte su piastra, isolamenti e osservazioni al microscopio) e tecniche molecolari (RAPD-PCR e PCR-DGGE) di campioni di latte della sera, latte in caldaia prima della lavorazione (vedi Poznanski *et al.*, nel presente volume, pag. 55), siero prima di essere aggiunto al latte e formaggio a 9 e 18 mesi di stagionatura.

Data la tecnologia di lavorazione, i lunghi tempi di stagionatura delle forme, il ridotto numero di forme ottenuto da grandi quantità di latte, nonché l'elevata

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

variabilità di materia prima e lavorazioni giornaliere, è difficile e costoso avere a disposizione repliche sufficienti per questo tipo di studi, pertanto il presente lavoro vuole portare un contributo alla conoscenza delle dinamiche di popolazione e delle strategie di adattamento microbiche in questo ecosistema. Grazie alla piattaforma di sequenziamento (tecnologia Roche 454) all'interno del Centro Ricerca e Innovazione FEM è stato possibile analizzare contemporaneamente il genoma di tutti i micro-organismi presenti e definire rigorosamente il profilo delle specie microbiche presenti nel formaggio di modo da avere un'idea completa del microbioma presente nel Grana Trentino.

MATERIALI E METODI

Per lo schema sperimentale e di campionamento si rimanda a Cavazza *et al.* nel presente volume, pag. 45.

Il formaggio di 42 giornate è stato analizzato a 18 mesi di stagionatura e a livello microbiologico per quattro giornate è stato analizzato anche il formaggio a 9 mesi. La forma è stata tagliata a metà parallelamente al piatto e, successivamente, da questa metà è stata ottenuta una fetta di circa 5 cm di spessore. La fetta è stata conservata sottovuoto fino al momento delle analisi. Per le analisi microbiologiche sono state prese in considerazione 3 zone della fetta di formaggio: sottocrosta (a 4 cm dal piatto e 4 cm dallo scalzo), centro (zona della fetta corrispondente al centro del formaggio), medio (zona nel mezzo fra sottocrosta e centro).

L'ammontare proteico dei campioni di formaggio è stato determinato presso i laboratori del Centro Lattiero Caseario di Parma tramite il metodo di Kjeldahl seguendo il protocollo di Butikofer *et al.* (1993). La frazione azotata totale e quella solubile a pH 4.6 sono state ottenute come descritto da Gripon *et al.* (1975). L'indice di maturazione è stato calcolato come rapporto tra la frazione solubile e quella totale di azoto. L'attività dell'acqua (a_w) nel sotto crosta e nel centro è stata misurata tramite AquaLab® Model Series 3. Per l'enumerazione ed isolamento dei microrganismi e l'estrazione del DNA si rimanda a Franciosi *et al.* (2009); per la caratterizzazione dei ceppi mediante RAPD-PCR e PCR specie specifiche a Monfredini *et al.* (2011), per PCR-DGGE a Andrighetto *et al.* (2004) ed Ercolini *et al.* (2001).

Pyrosequencing e analisi delle sequenze per identificazione

Gli ampliconi sono stati purificati usando Agencourt AMPure kit e in seguito la loro concentrazione è stata determinata tramite Quant-iT PicoGreen dsDNA kit. La qualità della libreria generata è stata valutata tramite Bioanalyzer 2100 usando High Sensitivity DNA Kit. Gli ampliconi purificati sono stati combinati equimolarmente in un singolo tubo. Pyrosequencing è stato fatto usando $\frac{1}{4}$ di una

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

PicoTiterPlate (4 su 16 linee) per ognuna delle due giornate analizzate. La tecnologia è 454 Life Sciences Genome Sequencer FLX instrument (Roche) seguendo la chimica Titanium che da una lunghezza massima della read di 400 basi. I dati da pyrosequencing sono stati processati usando la QIIME pipeline (Caporaso *et al.*, 2010). In breve le sequenze sono state assegnate prima ai campioni specifici in base al loro barcode ed in seguito sono state divise in filotipi al 97% di similarità. Sequenze più corte di 130 basi sono state escluse, come pure il primer che è stato escluso dalle sequenze prima dell'allineamento. Una sequenza rappresentativa per ogni filotipo è stata scelta come OTU (Operative Taxonomic Unit) e usata per la classificazione tramite la tassonomia del RDP II. Le abbondanze microbiche di ogni singolo filotipo nei relativi campioni di latte e formaggio sono state calcolate come percentuali del numero di sequenze assegnate al filotipo sul totale del numero di sequenze nel campione relativo. Prima di questa operazione dagli OTU del formaggio sono stati tolti gli OTU del siero in quanto si presuppone che quello sia DNA rimasto dal siero ma non più corrispondente ad una popolazione viva e vitale.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il trattamento del latte prima del processo di caseificazione ha influenzato le cariche totali e dei bacilli mesofili che risultavano più bassi nei formaggi a raccolta unica e tale differenza era significativa se confrontati con la raccolta doppia a 18°C (Tabella 1). La quantità di azoto solubile (AS) e di conseguenza anche l'indice di maturazione erano al contrario significativamente più alti in formaggi il cui latte proveniva da raccolta unica R.U. Questo fatto può essere dovuto a un' aumentata attività della plasmina, che è un enzima presente nel latte la cui attività migliora quando il latte viene raffreddato e conservato a 7°C (Fajardo-Lira *et al.*, 2000), piuttosto che a un'attività microbica durante la maturazione in quanto le cariche batteriche erano minori per la raccolta unica.

Nei campioni di formaggio a 18 mesi di stagionatura sono state trovate differenze significative per zona di campionamento e in particolare, i gruppi mesofili (conte su M17, MRS e PCA 30°C) erano sempre inferiori di due ordini di grandezza nel centro del formaggio rispetto al sottocrosta e alla zona mediana (Tabella 2), addirittura dopo 18 mesi nella parte centrale le cariche microbiche erano sotto al limite di rilevabilità. Questo è probabilmente spiegabile con il fatto che, immediatamente dopo l'estrazione della cagliata, la parte centrale della forma rimane più calda per un periodo più lungo, mentre nel sottocrosta la temperatura comincia subito ad equilibrarsi con quella esterna, e solo dopo 48 ore la temperatura della forma diventa omogenea. Quindi è probabile che l'alta temperatura protratta per un periodo più lungo determini una selezione della

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

flora batterica al centro della forma a favore di una riduzione della carica microbica mesofila rispetto al sottocrosta, e che questa differenza zonale si mantenga anche durante la stagionatura. Il confronto delle conte su formaggio a 18 mesi con lavori precedenti (Coppola *et al.*, 1997 e Gatti *et al.*, 2008) non risulta semplice a causa sia dei diversi terreni utilizzati per le conte, sia dei diversi punti di campionamento considerati. Infatti noi abbiamo confrontato la microflora lattica presente in tre diverse zone del formaggio, mentre sia Coppola *et al.* (1997) che Gatti *et al.* (2008) analizzano la flora microbica presente a 18 mesi di stagionatura non facendo distinzione tra sottocrosta e centro.

Tabella 1. Valori medi delle cariche (log ufc/g) dei principali gruppi microbici e composizione azotata del Grana Trentino a 18 mesi da latte sottoposto a differenti trattamenti prima della lavorazione (SCT = latte conferito in raccolta doppia con bidoni Senza Controllo della Temperatura; 9 repliche; 18 = latte conferito in raccolta doppia con cisterna e conservato a 18°C alla stalla dopo la munta; 10 repliche; R.U. = latte conferito in raccolta unica con cisterna e conservato alle temperature teoriche di 8 e 12°C alla stalla dopo la munta; 19 repliche). I risultati sono mostrati come valori medi $\pm$ deviazioni standard.

	SCT	18	R.U.	Significatività
Carica Batterica Totale	4.6 $\pm$ 0.9ab	5.2 $\pm$ 0.8b	4.4 $\pm$ 1.0a	*
Cocchi mesofili (M17)	3.0 $\pm$ 1.8	3.6 $\pm$ 2.1	2.8 $\pm$ 1.8	N.S.
Bacilli mesofili (MRS)	4.6 $\pm$ 1.0ab	5.1 $\pm$ 0.7b	3.9 $\pm$ 1.6a	*
Termofili (WAM)	1.2 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 1.6	1.6 $\pm$ 1.5	N.S.
AT	5.13 $\pm$ 0.19ab	5.09 $\pm$ 0.23a	5.24 $\pm$ 0.14b	N.S.
AS ¹	1.33 $\pm$ 0.08ab	1.30 $\pm$ 0.13a	1.45 $\pm$ 0.13b	***
AS/AT ² (Indice maturazione)	25.9 $\pm$ 1.4ab	25.4 $\pm$ 1.8a	27.6 $\pm$ 2.1b	***

Tabella 2. Conte batteriche, pH, attività dell'acqua, numero di isolati e biotipi in latte di caldaia e formaggio campionato nel sotto crosta, nella sezione mediana e nel centro. Le cariche batteriche sono mostrate come medie $\pm$ deviazione standard delle conte e sono mostrate le conte del latte e del formaggio a 9 e 18 mesi delle forme prodotte nelle 4 giornate di lavorazione in cui è stato possibile aprire una forma a 9 mesi (caseificio B). Le conte sono state espresse in Log ufc mL⁻¹ per i campioni di latte o log ufc g⁻¹ per quelli di formaggio. N.D. sta per concentrazione < 50 log ufc g⁻¹.

Terreno	Latte Caldaia	Sotto Crosta		Sezione mediana		Centro	
		9 m	18 m	9 m	18 m	9 m	18 m
M17	4.88 $\pm$ 0.36	6.47 $\pm$ 0.17	4.41 $\pm$ 0.51	6.05 $\pm$ 0.44	4.55 $\pm$ 0.29	3.15 $\pm$ 0.64	ND
MRS	4.46 $\pm$ 0.46	6.61 $\pm$ 0.16	4.04 $\pm$ 0.64	6.22 $\pm$ 0.15	4.99 $\pm$ 0.24	4.94 $\pm$ 0.80	ND
WAM	2.77 $\pm$ 0.82	5.40 $\pm$ 0.77	3.84 $\pm$ 0.70	4.98 $\pm$ 0.86	1.90 $\pm$ 1.87	ND	ND
PCA 30°C	4.82 $\pm$ 0.39	6.62 $\pm$ 0.13	4.24 $\pm$ 0.42	6.20 $\pm$ 0.32	5.01 $\pm$ 0.36	4.71 $\pm$ 0.73	ND
PCA 7°C	4.34 $\pm$ 0.34	ND	ND	ND	ND	ND	ND
VRBA	1.97 $\pm$ 0.39	ND	ND	ND	ND	ND	ND
pH	6.71 $\pm$ 0.04	5.40 $\pm$ 0.02	5.44 $\pm$ 0.03	5.40 $\pm$ 0.02	5.44 $\pm$ 0.03	5.41 $\pm$ 0.03	5.42 $\pm$ 0.03
aw		0,908 $\pm$ 0.004	0,904 $\pm$ 0.005	0,910 $\pm$ 0.004	0,906 $\pm$ 0.005	0,936 $\pm$ 0.003	0,921 $\pm$ 0.005
N° isolati	136	151		128		66	
N° biotipi	54	24		21		22	

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

La carica batterica del formaggio a 9 mesi è risultata maggiore rispetto a quella del latte in caldaia subito prima della lavorazione. Tale aumento della carica microbica nel formaggio rispetto al latte di caldaia è facilmente spiegabile se si considera che una forma di Grana del peso di 35 kg è il prodotto concentrato di circa 550 litri di latte, quindi nel formaggio anche la densità di batteri aumenta. Inoltre durante i primi mesi di stagionatura si verifica una crescita di flora microbica (Coppola *et al.*, 2000). Nei campioni di siero innesto è stata valutata solo la carica termofila poiché le specie dominanti nel siero, per la tecnologia con cui viene prodotto, sono tipicamente termofile. I termofili da siero si attestano su valori tra 7.2 e 7.8 Log ufc ml⁻¹.

Definizione dei biotipi ed individuazione della specie

Al fine di osservare una possibile ricorrenza dei ceppi nel tempo di maturazione, 63 isolati da siero-innesto e 345 ceppi isolati dai formaggi aperti a 9 e 18 mesi prodotti durante 4 giornate di lavorazione al caseificio B sono stati analizzati più nel dettaglio. È stata fatta un'estrazione veloce del DNA utile per una RAPD-PCR caratterizzante con primer PC1. Questo tipo di PCR amplifica in modo aspecifico diverse regioni del DNA genomico batterico, per cui dopo una corsa elettroforetica dei prodotti della reazione si ottiene un profilo di bande caratteristico dell'isolato. I profili elettroforetici sono stati analizzati mediante software GelCompar II-BioNumerics versione 4.1 (Applied Maths): questo software raggruppa i diversi profili in base alla loro similarità per numero e lunghezza delle bande, organizzandoli in dendrogrammi. Sono stati considerati come appartenenti allo stesso gruppo o cluster quei profili la cui omologia è risultata maggiore o uguale al 80%. In questo modo gli isolati sono stati organizzati in "biotipi" d'appartenenza, dove per biotipo si intende il profilo di similarità con cui i ceppi raggruppano al 80% di omologia.

Per facilitare l'individuazione dei biotipi sono stati dapprima considerati separatamente gli isolati da siero innesto e formaggio.

A differenza delle RAPD-PCR che sono state eseguite su tutti gli isolati, l'identificazione a livello di specie e la caratterizzazione fenotipica sono state fatte solo su alcuni isolati, scelti in base al gruppo di appartenenza. Quindi per ogni biotipo sono stati scelti, ove possibile, da un minimo di 2 a un massimo di 5 rappresentanti. Per ognuno di questi è stata identificata la specie mediante PCR-DGGE e PCR specie-specifiche.

I profili RAPD-PCR dei 63 isolati da siero sono risultati diversi sia da quelli degli isolati da latte che da formaggio. Tutti i 63 isolati sono stati identificati come *Lb. helveticus*.

I profili RAPD degli isolati da formaggio di tutte le quattro filiere prese in considerazione sono stati analizzati in un dendrogramma complessivo (figura non

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

riportata) da cui è emerso che alcuni isolati seppur provenienti da diverse giornate di lavorazione raggruppavano in uno stesso biotipo con omologia superiore al 80%. Per questo motivo i profili sono stati raggruppati per zona di campionamento piuttosto che per filiera di produzione. In questo modo sono stati ottenuti 3 dendrogrammi (esempio di dendrogramma degli isolati dal centro in Figura 1).

Per ogni biotipo sono stati selezionati da un minimo di 2 ad un massimo di 5 ceppi che sono stati sottoposti ad identificazione. La specie più rappresentata è *Lb. rhamnosus* seguito da *Lb. paracasei*. La specie *Lb. paracasei* è stata trovata prevalentemente nel sottocrosta e nella zona media mentre *Lb. rhamnosus* è ben rappresentato in tutte e tre le zone di campionamento. Al centro sono stati trovati biotipi di *Lb. casei* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* non trovati nel sottocrosta e nella zona media.

La presenza di *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus* in un ambiente come il Grana Trentino, caratterizzato da valori di attività dell'acqua (a_w) compresi fra 0,92-0,94 al centro e 0,90-0,91 nel sottocrosta (vedi Tabella 1), è possibile in quanto queste specie tollerano meglio bassi valori di a_w (Ottaviani, 1991), differentemente da altri batteri lattici che crescono intorno a valori di a_w di 0,98-1,00, ed è in accordo con quanto rilevato da altri autori su Parmigiano-Reggiano (Coppola *et al.*, 1997; Gala *et al.*, 2008). Tutti i biotipi di *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, sono in grado di sviluppare a 45°C; al contrario, alcuni biotipi di *Lb. paracasei* isolati dal sotto crosta non sono in grado di crescere nelle medesime condizioni. Questa maggiore termo-tolleranza del *Lb. rhamnosus* e in generale dei biotipi isolati dalla zona centrale del formaggio potrebbe essere causata dalla diversa velocità di raffreddamento del centro della forma: infatti nelle prime ore dopo l'estrazione della cagliata, la temperatura del formaggio è ancora elevata al centro (circa 53-55°C) mentre nel sottocrosta è circa otto gradi inferiore (45-47°C) e questo potrebbe favorire lo sviluppo e il sopravvento di specie e biotipi termofili su quelli di *Lb. paracasei*.

Il metagenoma del Grana Trentino

Un totale di 388,030 reads sono state generate da 18 campioni analizzati tramite la tecnologia del *pyrosequencing* 454. Dai 18 campioni sono state fatte due librerie sul 16S rDNA una per ognuna delle due giornate di lavorazione al caseificio B che sono state analizzate per: latte di caldaia, siero innesto, siero cotto (il siero cotto e la cagliata appena estratta hanno una flora microbica molto simile) formaggio a 9 mesi campionato nel sottocrosta, nella parte mediana e nel centro e formaggio a 18 mesi campionato nel sottocrosta, nella parte mediana e nel centro. Il numero di sequenze per campione variava da 28,997 a 1,422. per ogni campione le sequenze sono state contate e raggruppate con una similarità del 0.97%. Per ognuno di tali

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

gruppi è stata scelta una sequenza OTU di modo da ridurre i tempi di analisi. Tutte le sequenze OTU sono state identificate per specie sul RDB II 16S database. In tutti i campioni di siero innesto e siero cotto un'unica OTU era dominante in entrambe le giornate di lavorazione costituendo almeno il 97.9% del totale delle sequenze ed apparteneva a *Lb. helveticus*. Il rimanente 2.1% erano sequenze appartenenti al genere *Lb. helveticus* e *Lb. delbrueckii* con tracce di *Lb. fermentum*. La classificazione delle sequenze ottenute da librerie a 16S rDNA dalle due giornate di lavorazione è espressa in Figura 2 (Famiglie batteriche). In entrambi i campioni di latte in caldaia Gammaproteobacteria e Bacilli erano le due classi dominanti (70% delle sequenze). Streptococcaceae e Lactobacillaceae erano le due famiglie dominanti nella classe dei Bacilli di entrambe le giornate. Le Famiglie di Moraxellaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae e Flavobacteriaceae costituivano invece la maggioranza per quanto riguarda i gruppi di batteri non lattici. In tutti i campioni di formaggio i batteri lattici erano sempre dominanti (sempre più del 75% qualsiasi fosse lo stadio o la porzione campionata). Le Famiglie dominanti erano, come per il latte, le Lactobacillaceae e le Streptococcaceae che però mostravano un andamento nel tempo opposto: mentre le prime dominavano a 9 mesi e calavano in percentuale a 18, le Streptococcaceae a 18 mesi erano in proporzione maggiore che a 9 mesi segno questo di una possibile crescita durante la seconda fase di maturazione rispetto alle Lactobacillaceae. Le Streptococcaceae erano anche una componente importante al centro della forma rispetto alle altre zone di campionamento e in particolare dopo 18 mesi al centro della forma diventano la famiglia dominante in entrambe le filiere.

CONCLUSIONI

L'influenza di differenti trattamenti di conservazione e raccolta del latte sono stati valutati sia dal punto di vista microbiologico che chimico del formaggio attraverso una sperimentazione importante di più di 100 giornate che ha coinvolto tre caseifici della provincia di Trento. È la prima volta che una sperimentazione di questo tipo viene conclusa su formaggi a pasta dura tipo Grana. È stato dimostrato come le cariche microbiche variassero non tanto in base alla sperimentazione effettuata quanto in base alla zona di campionamento del formaggio mostrando una chiara decrescita nella zona centrale della forma. Inoltre ad un'analisi delle specie presenti si è mostrata la dominanza nel sottocrosta di *Lb. rahmnosus* e *Lb. paracasei*, mentre nel centro sono stati trovati biotipi principalmente di *Lb. rahmnosus*. Biotipi appartenenti alle specie di *Lb. casei* e *Lb. delbrueckii* sono stati inoltre trovati, anche se non dominanti, nel centro. Tutti i biotipi nel centro erano termofili. Sembra quindi che l'evoluzione della microflora

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

nella forma durante la stagionatura sia più indirizzata dalla tecnologia di cottura che da quella di raccolta del latte, con la selezione di specie termofile nelle zone in cui la pasta rimane più a lungo calda (zone centrali).

Con l'occasione dello svolgimento di questo progetto per la prima volta sono state usate tecnologie di *deep-sequencing* (Roche-454) per tracciare la microflora al completo lungo la filiera del prodotto caseario. Questo ha permesso la scoperta di dinamiche microbiologiche non evidenti dai precedenti studi dove lo sviluppo delle *Streptococcaceae* non era mai stato ritrovato nelle ultime fasi di maturazione dei formaggi tipo Grana. Queste tecnologie hanno aperto nuovi scenari e nuove opportunità di ricerca per la microbiologia non solo del formaggio ma dei prodotti alimentari in generale.

RINGRAZIAMENTI

Ringraziamo Massimo Pindo e tutto il personale della piattaforma di genotipizzazione e sequenziamento per l'aiuto nello studio del meta genoma del Grana. Vorrei inoltre ringraziare di cuore il personale dei diversi caseifici e in particolare Cesare, Adriano e Mario che hanno collaborato alla sperimentazione con tutta la loro sapienza e pazienza.

BIBLIOGRAFIA

- Andrighetto C., Marazzan G., Lombardi A. (2004). Use of RAPD-PCR and TTGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 38, 400-405.
- Butikofer M., Ruegg M., Ardo Y. (1993). Determination of nitrogen fractions in cheese: evaluation of a collaborative study. *Lebensmittel Wissenschaft Technologie*, 26, 271-275.
- Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Pena A.G., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 7, 35-36.
- Coppola R., Nanni M., Iorizzo M., Sorrentino A., Sorrentino E., Grazia L. (1997). Survey of lactic acid bacteria isolated during the advanced stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *Journal of Dairy Research*, 64, 305-310.
- Coppola R., Nanni M., Iorizzo M., Sorrentino A., Sorrentino E., Chiavari C., Grazia L. (2000). Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the first months of the ripening. *Le Lait*, 80, 479-490.
- Ercolini D., Mosetti G., Blaiotta G., Coppola S. (2001). Behaviour of variable V3 region from 16S rDNA of lactic acid bacteria in Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Current Microbiology*, 42, 199-202.
- Fajardo-Lira C., Oria M., Hayes K.D., Nielsen S.S. (2000). Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Pseudomonas fluorescens* M3/6 on the plasmin system of fresh milk. *Journal of Dairy Science*, 83, 2190-2199.

Capitolo 3 – Da latte a formaggio

- Fornasari M.E., Rossetti L., Carminati D., Giraffa G. (2006). Cultivability of *Streptococcus thermophilus* in Grana Padano cheese whey starters. *FEMS Microbiology Letters*, 257, 139-144.
- Franciosi E., Settanni L., Cavazza A., Poznanski E. (2009). Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk. *International Dairy Journal*, 19, 3-11.
- Gala E., Landi S., Solieri L., Nocetti M., Pulvirenti A., Giudici P. (2008). Diversità of lactic acid bacteria population in ripened Parmigiano Reggiano cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 125, 347-351.
- Gatti M., Bernini V., Lazzi C., Neviani E. (2006). Fluorescence microscopi for studying the viability of micro-organism in natural whey starters. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 338-343.
- Gatti M., De Dea Lindner J., De Lorentis A., Bottari B., Santarelli M., Bernini V., Neviani E. (2008). Dynamics of entire and lysed bacterial cells during Parmigiano Reggiano cheese production and ripening. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 6161-6167.
- Giraffa G., Rossetti L., Mucchetti G., Addeo F., Neviani E. (1998). Influence of the temperature gradient on the growth of thermophilic lactobacilli used as natural starters in Grana cheese. *Journal of Dairy Science*, 81, 31-36.
- Gripon J. C., Desmazeaud M.J., Le Bars D., Bergère J. L. (1975). Étude du rôle des micro-organismes et des enzymes au cours de la maturation des fromages. II. Influence de la présure commerciale. *Le Lait*, 55, 502-516.
- Lazzi C., Rossetti L., Zago M., Neviani E., Giraffa G. (2004). Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 481-490.
- Monfredini L., Settanni L., Poznanski E., Cavazza A., Franciosi E. (2011). The spatial distribution of bacteria in Grana-cheese during ripening. Accepted the 1st July 2011 on *Systematic and Applied Microbiology*.
- Rossetti L., Fornasari M.E., Gatti M., Lazzi C., Neviani E., Giraffa G. (2008). Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. *International Journal of Food Microbiology*, 127(1-2), 168-171.
- Santarelli M., Gatti M., Lazzi C., Bernini V., Zapparoli G.A., Neviani E. (2008). Whey starter for Grana Padano cheese: effect of technological parameters on viability and composition of the microbial community. *Journal of Dairy Science*, 91, 883-891.