

## CONTRIBUTO DELLA POPOLAZIONE LATTICA AUTOCTONA IN UNA PRODUZIONE DI MOZZARELLA AL LATTE CRUDO CON STARTER TERMOFILI COMMERCIALI

Floriana CIARROCCHI<sup>1\*</sup>, Lucia AQUILANTI<sup>1</sup>, Marco ANGELOZZI<sup>2</sup>,  
Francesca CLEMENTI<sup>1</sup>

### INTRODUZIONE

Tra i formaggi a pasta filata, la cui tecnologia di caseificazione costituisce un patrimonio della tradizione casearia italiana, la Mozzarella è quello più conosciuto ed apprezzato. Tradizionalmente la produzione di Mozzarella prevede l'esclusivo utilizzo di latte intero crudo nel quale, a seguito di un processo spontaneo di fermentazione, viene a svilupparsi una complessa associazione di microrganismi. Oggi, la Mozzarella è generalmente prodotta con latte pastorizzato addizionato di starter selezionati composti da uno o più ceppi di cocchi termofili (*Streptococcus thermophilus*) o da associazioni di cocchi e lattobacilli termofili (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e/o *Lb. helveticus*) in grado di promuovere e guidare il processo di acidificazione. Sebbene la pastorizzazione sia una pratica introdotta a garanzia di una maggiore sicurezza microbiologica del prodotto, numerosi studi hanno evidenziato come la microflora naturalmente presente nel latte crudo rivesta un ruolo chiave nella definizione delle peculiarità sensoriali del formaggio [1]. Il presente lavoro ha avuto come obiettivo la caratterizzazione della popolazione lattica autoctona di una produzione al latte crudo di Mozzarella dell'entroterra marchigiano ottenuta con uno starter commerciale di cocchi termofili, attraverso l'impiego di tecniche microbiologiche tradizionali, molecolari e saggi fenotipici.

### MATERIALI E METODI

Tre campionamenti su latte crudo (Lc), cagliata (Cc) e Mozzarella al latte crudo (Mc) sono stati effettuati in un caseificio industriale della regione Marche, nei periodi luglio 2004 (I e II campagna) e gennaio 2005 (III campagna). Sono stati inoltre prelevati campioni dello starter commerciale (S) in uso presso il caseificio (I e II campagna) e di Mozzarella a latte pastorizzato (Mp) (III campagna) prodotta con il suddetto starter per isolare ceppi commerciali di *St. thermophilus* da utilizzare come controllo. Per ciascun campione di Lc, Mc, Cc sono stati contati e, successivamente, isolati: (i) lattobacilli su MRS incuba-

\* *Corrispondenza ed estratti:* f.ciarrocchi@univpm.it

<sup>1</sup> Dipartimento di SAIFET, Università Politecnica delle Marche. Via Breccia Bianche, 60131 Ancona.

<sup>2</sup> Sabelli S.p.A., z.i. Marino del Tronto, 63100 Ascoli Piceno.

to a 37°C per 72 h; (ii) cocchi mesofili e termofili su M17 incubato rispettivamente a 22°C e 45°C per 48 h e 72 h in anaerobiosi. Gli isolati Gram positivi e catalasi negativi sono stati successivamente sottoposti ad identificazione molecolare mediante ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e sequenziamento di una porzione del gene codificante il 16S rRNA [2]. La tipizzazione genotipica è stata condotta solo sugli isolati ascritti alle specie di interesse per il settore lattiero-caseario. In particolare l'analisi RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) accoppiata all'analisi PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) è stata eseguita sugli isolati ascritti a *Lb. helveticus*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris* e *Lc. lactis* ssp. *lactis*, mentre per le specie *St. thermophilus*, *Lb. gasseri* e *Lb. plantarum* è stata condotta la sola analisi RAPD. Per l'analisi RAPD sono stati utilizzati i primer D8635 [3] e 5'-AGC AGC GTG G-3' [4]. L'analisi PFGE è stata condotta mediante estrazione e digestione con *Sma*I del DNA genomico [5]. I profili elettroforetici ottenuti mediante analisi RAPD e PFGE sono stati convertiti in una matrice binaria (0 = assenza e 1 = presenza di banda) sulla base della quale è stata successivamente calcolata una matrice di similarità [6]. L'analisi cluster è stata effettuata utilizzando il metodo *Unweighed Pair Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA) [7] ed il software NTSYS, versione 1.8. Gli isolati ascritti a specie di interesse per la formulazione di starter destinati alla produzione di Mozzarella (*St. thermophilus* e *Lb. helveticus*) sono stati inoltre sottoposti a saggio dell'attività acidificante, come precedentemente descritto [8]. I valori di pH, misurati dopo 6 ore di incubazione a 36° C in Skim milk (SM), sono stati sottoposti ad analisi ANOVA, al fine di individuare, all'interno di ciascuna specie, gli isolati caratterizzati da attività statisticamente differenti ( $P < 0,05$ ).

#### RISULTATI E DISCUSSIONE

Dall'enumerazione dei lattococchi mesofili, dei cocchi termofili e dei lattobacilli nei campioni di Lc, Cc e Mc, prelevati nel corso delle prime due campagne di campionamento, le conte più elevate sono state riscontrate nei campioni di cagliata (valori compresi tra 7,8 e 9,5 Log UFC/g). Tuttavia, in entrambe le campagne, le conte dei cocchi termofili nella Mc sono risultate più alte rispetto a quelle dei campioni di Lc e Cc.

L'identificazione genotipica dei 335 isolati Gram-positivi e catalasi negativi ha permesso di osservare una microflora autoctona estremamente biodiversa nei campioni di Lc, Cc e Mc, in accordo a quanto osservato da altri autori in produzioni di Mozzarella al latte crudo (Fig. 1) [10]. Tra i cocchi, la maggior parte degli isolati è risultata ascritta ai generi *Streptococcus* (56 isolati) ed *Enterococcus* (82 isolati), mentre tra i lattobacilli, *Lb. helveticus* è risultata la specie dominante (17 isolati) (~ 49%). In particolare sono state isolate specie termofile (*Lb. delbrueckii* e *Lb. gasseri*), mesofile (*Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *lactis*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lc. garvieae*), ed altre specie indice di ricchezza biologica del

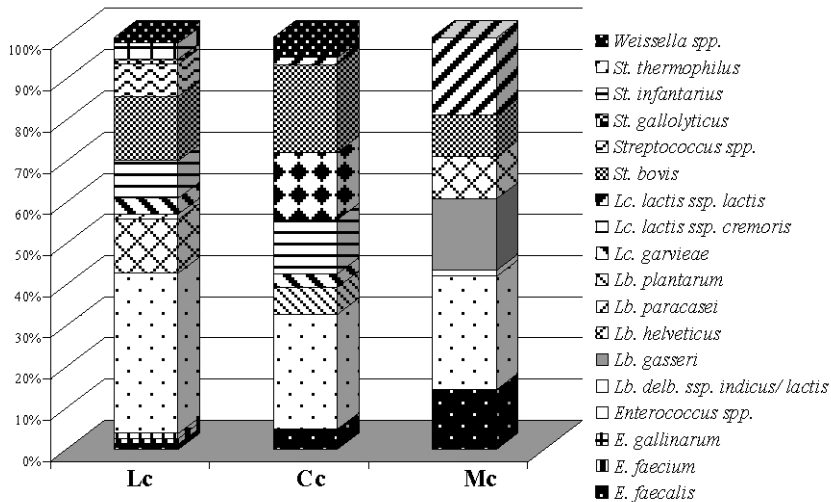


Figura 1 – Ripartizione percentuale delle specie isolate nel corso delle prime due campagne di isolamento da latte crudo (Lc), cagliata (Cc) e Mozzarella (Mc).  
 Figure 1 – Percent distribution of the species isolated from raw milk (Lc), curd (Cc) and raw milk Mozzarella cheese (Mc) during the first two isolation campaigns.

latte [10] (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *St. gallolyticus*, *St. infantarius* e *St. bovis*). Come atteso, i 41 isolati ottenuti dai campioni di Mp e S sono risultati appartenere alla specie *St. thermophilus*.

La biotipizzazione mediante RAPD ha permesso di individuare diversi livelli di eterogeneità genetica all'interno delle singole specie considerate (dati non mostrati). Al fine di individuare eventuali ulteriori polimorfismi genotipici tra gli isolati appartenenti alla specie *Lb. helveticus*, utilizzabile come starter per la produzione di Mozzarella, è stata condotta l'analisi PFGE (Fig. 2). Attraverso la clusterizzazione RAPD e PFGE, è stato possibile distinguere 6 genotipi per *Lb. helveticus*, 12 genotipi per *Lc. lactis ssp. cremoris* e 9 genotipi per *Lc. lactis ssp. lactis*. È interessante notare che, con l'eccezione della specie *Lc. lactis ssp. lactis*, per tutte le specie testate, l'analisi PFGE ha evidenziato una maggiore eterogeneità infraspecifica e quindi una maggiore capacità discriminante rispetto all'analisi RAPD.

La caratterizzazione tecnologica è stata condotta sulle specie *St. thermophilus* e *Lb. helveticus*. L'impiego di starter a composizione definita costituiti da *St. thermophilus* e *Lb. helveticus*, infatti, consente di raggiungere tempi di produzione più brevi e migliori proprietà funzionali [9]. Gli isolati provenienti dallo

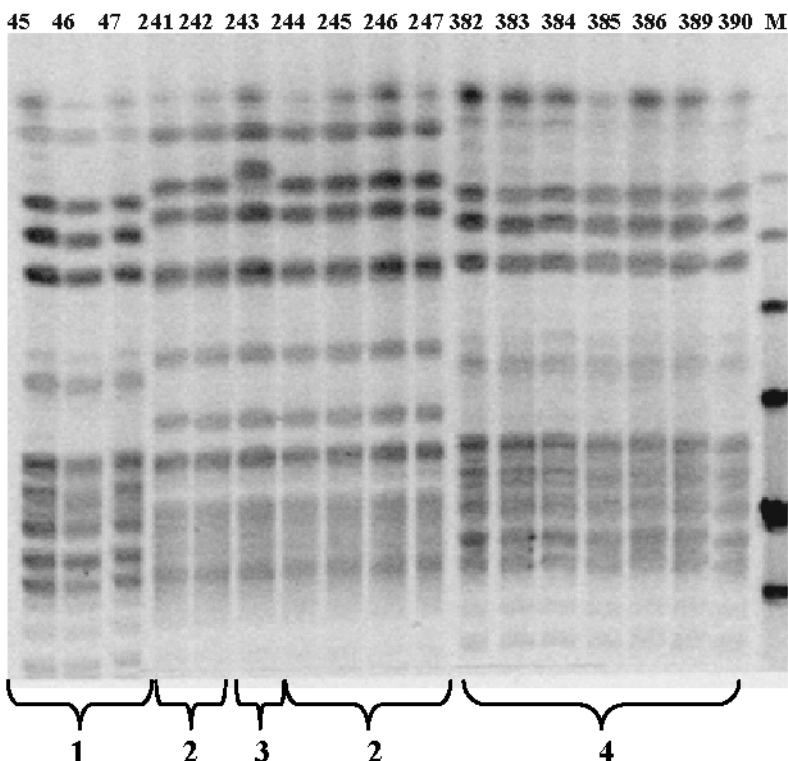


Figura 2 – PFGE-tipi ottenuti dagli isolati di *Lb. helveticus* con l'endonucleasi *Sma*I. M Marker.

*Figura 2 – PFGE- types obtained by SmaI- PFGE of Lb. helveticus isolates. M Marker.*

starter, tutti identificati come *St. thermophilus*, hanno mostrato, come atteso, una elevata attitudine alla acidificazione, portando il pH a valori prossimi o inferiori a 5. Tra gli isolati naturali di *St. thermophilus*, l'isolato 355 (ottenuto da Mc) e gli isolati 406, 407, e 428 (ottenuti da Mp) sono risultati in grado di raggiungere pH comparabili a quelli dei ceppi commerciali. Tra gli isolati appartenenti alla specie *Lb. helveticus*, nessuno ha mostrato una altrettanto elevata capacità, raggiungendo, per circa il 76 % dei casi, valori di pH superiori a 5,5. Questo comportamento può essere spiegato dal fatto che la specie *Lb. helveticus*, una specie omofermentante, termofila ed acidotollerante, presenta una lenta acidificazione iniziale, che tuttavia risulta più intensa man mano che la fermentazione procede. I risultati della clusterizzazione molecolare e dell'analisi ANOVA effettuata sui dati dell'attività acidificante sono stati combinati al fine di defini-

re, all'interno delle specie di interesse per la produzione di Mozzarella i diversi biotipi. Sono stati in tal modo definiti 6 biotipi per *Lb. helveticus* e 23 per *St. thermophilus*.

**RIASSUNTO** – La Mozzarella è uno dei formaggi a pasta filata più conosciuti ed apprezzati in Italia ed in altri paesi europei. Il presente lavoro ha avuto come obiettivo lo studio della popolazione lattica autoctona di produzioni di Mozzarella dell'entroterra marchigiano al latte vaccino crudo addizionato di uno starter commerciale di cocchi termofili, attraverso l'impiego di tecniche microbiologiche tradizionali, molecolari e saggi fenotipici. L'approccio polifasico adottato ha permesso di verificare una elevata biodiversità nella popolazione lattica autoctona investigata, sia a livello di specie che di ceppo.

**Parole chiave:** Mozzarella, popolazione lattica autoctona, RAPD, PFGE, attività acidificante

**SUMMARY** – *Contribution of the autochthonous lactic acid bacteria population in a production of raw milk Mozzarella cheese.* – Mozzarella cheese is one of the most popular members of the Pasta Filata cheeses. The present research was aimed at investigating the microbial population of a raw milk Mozzarella cheese manufacture produced in the hinterland of the Marche region by using a commercial starter culture of thermophilic cocci. At this aim, both molecular and phenotypic assays were performed. The polyphasic approach utilized revealed an high diversity of the autochthonous LAB population investigated, both at the species and strain level.

**Keywords:** Mozzarella cheese, autochthonous lactic acid bacteria, RAPD, PFGE, acidifying activity

**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) Mukherjee KK, Hutkins RW (1994). *Isolation of galactose-fermenting thermophilic cultures and their use in the manufacture of low browning Mozzarella cheese.* J. Dairy Sci., 77, 2839-2849.
- 2) Aquilanti L, Silvestri G, Zannini E, Osimani A, Santarelli S, Clementi F (2007). *Phenotypic, genotypic and technological characterization of resident lactic acid bacteria in Pecorino cheese from Central Italy.* J. Appl. Microbiol., 103, 948-960.
- 3) Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE (1992). *DNA diversity among clinical isolates of Helicobacter pylori detected by PCR-based RAPD fingerprinting.* Nucl. Acid Research, 20, 5137-5142.

- 4) Cocconcelli PS, Porro D, Galandini S, Senini L (1995). *Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci*. Lett. Appl. Microbiol., 21, 376-379.
- 5) Biavasco F, Miele A, Vignaroli C, Manso E, Lupidi R, Varaldo PE (1996). *Genotypic characterization of a nosocomial outbreak of VanA Enterococcus faecalis*. Microb. Drug Resist., 2, 231-237.
- 6) Dice LR (1945). *Measures of the amount of the ecologic association between species*. Ecology, 26, 297-302.
- 7) Sokal RR, Sneath PHA (1963). *Principle of numerical taxonomy*, 181-185. Freeman, San Francisco, California.
- 8) Aquilanti L, Zannini E, Zocchetti A, Osimani A, Clementi F (2006). *Polyphasic characterization of indigenous lactobacilli and lactococci from PDO Canestrato Pugliese cheese*. LWT-Food Science and Technology, 40, 1146–1155.
- 9) Oberg CJ, Merrill RK, Moyes LV, Brown RJ, Richardson GH (1991). *Effects of Lactobacillus helveticus culture on physical properties of Mozzarella cheese*. J. Dairy Sci., 74, 4101-4107.
- 10) de Candia S, De Angelis M, Dunlea E, Minervini E, McSweeney PLH, Faccia M, Gobbetti M (2007). *Molecular identification and typing of natural whey starter cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheeses*. Int. J. Food Microbiol., 119, 182-191.