



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ZOOTECNICHE  
ED ISPEZIONE DEGLI ALIMENTI

SEZIONE DI ISPEZIONE

TESI DI DOTTORATO IN PRODUZIONE E SANITA'  
DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE  
XXIV CICLO

*Studio della microflora lattica autoctona del Pecorino di  
Tramonti: un formaggio artigianale prodotto  
nel territorio del Parco Regionale dei Monti Lattari*

Candidata  
Dott.ssa  
Amalia Mormile

Coordinatore  
Prof.ssa Maria L.Cortesi

Tutor  
Prof.ssa Nicoletta Murru

ANNO ACCADEMICO 2009/2011

*Ai miei cari genitori ed al mio amato Antonio*

<b>SUMMARY</b>	<b>1</b>
RIASSUNTO .....	2
1. PARTE INTRODUTTIVA .....	4
1.1 I batteri lattici ed il formaggio .....	5
1.2 Fattori che ne influenzano la crescita dei microrganismi coinvolti nella maturazione del formaggio.....	7
1.3 I batteri lattici .....	13
1.3.1 Genere <i>Lactobacillus</i> .....	17
1.3.2 Genere <i>Lactococcus</i> .....	20
1.3.3 Genere <i>Leuconostoc</i> .....	22
1.3.4 Genere <i>Streptococcus</i> .....	23
1.3.5 Genere <i>Pediococcus</i> .....	24
1.4 I batteri lattici starter (SLAB) .....	26
1.5 I batteri lattici non starter (NSLAB) .....	36
1.6 I batteri lattici probiotici.....	42
1.7 Le colture “protettive”.....	49
1.8 Metabolismi dei batteri lattici coinvolti nella produzione e maturazione del formaggio .....	52
1.8.1 Glicolisi .....	52
1.8.2 Catabolismo del citrato .....	57
1.8.3 Lipolisi .....	60
1.8.4 Proteolisi.....	65
1.9 Utilizzo di ceppi lattici con un metabolismo selezionato per il miglioramento dei prodotti lattiero-caseari.....	76
2. STUDIO ED IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI LATTICI.....	79

2.1 L'attuale concetto di specie batterica.....	80
2.2 Caratteri fenotipi classici: morfologia e caratteri fisiologici/biochimici .....	82
2.3 L'approccio polifasico nella tassonomia dei LAB.....	87
2.3.1 La triade d'oro: DNA – DNA reassociation, %G + C e sequenza del gene 16S rRNA .....	89
2.3.2 Pulse field gel electrophoresis.....	91
2.3.3 Restricion fragmetn lenght polymorphism of 16S e 23S rRNA gene (Ribotyping) .....	92
2.3.4 Altri metodi basati sul profilo del DNA .....	94
2.3.5 Randomly amplified polymorphic DNA .....	95
2.3.6 Amplified fragment lenght polymorphism .....	96
2.3.7 Denaturing gradient gel electrophoresis .....	96
2.3.8 Lenght heterogeneity- PCR.....	97
2.4 Studi genomici sui batteri lattici .....	99
3. PARTE SPERIMENTALE .....	104
3.1 Introduzione e scopo della tesi.....	105
3.2 “Tramonti” ed il “Parco Regionale dei Monti Lattari”: caratteristiche geografiche e geo-morfologiche .....	109
3.2.1 Caratteristiche climatiche.....	110
3.2.3 Aspetti paesaggistici.....	111
3.3 Il Pecorino di Tramonti .....	113
3.4 La tecnologia di produzione del “Pecorino di Tramonti” .....	115
4. Materiali e metodi .....	123
4.1 Descrizione dell'azienda coinvolta nello studio .....	123

4.2 Protocollo sperimentale.....	124
4.2.1 Descrizione della prima fase .....	125
a) Produzione del Pecorino di Tramonti Classico ( <i>PTC</i> ) .....	125
b) Produzione del Pecorino Tramonti Speziato ( <i>PTS</i> ).....	126
c) Modalità di campionamento del formaggio Pecorino di Tramonti ..	127
d) Ricerca della flora lattica .....	128
e) Determinazione del pH e dell' $a_w$ .....	129
4.2.2 Descrizione della seconda fase della sperimentazione: caratterizzazione molecolare dei batteri lattici mediante Rybotiping..	130
a) Isolamento e restrizione del DNA genomico .....	130
b) Southern blotting ed ibridazione dei frammenti di DNA genomico con sonde oligonucleotidiche marcate con digoxigenina .....	131
c) Analisi dei patterns.....	132
5. RISULTATI .....	133
5.1 Risultati della ricerca della flora lattica nel <i>PTC</i> .....	134
5.2 Risultati della ricerca della flora lattica nel <i>PTS</i> .....	135
5.3 Risultati della determinazione di pH ed $a_w$ nel <i>PTC</i> e <i>PTS</i> .....	136
5.6 Grafici relativi ai risultati della ricerca della flora lattica e della ...	137
determinazione di pH e $a_w$ nel <i>PTC</i> e nel <i>PTS</i> .....	137
5.7 Risultati della ribotipizzazione dei ceppi isolati dal <i>PTC</i> .....	147
5.8 Risultati della ribotipizzazione dei ceppi lattici isolati dal <i>PTS</i> ...	148
5.9 Grafici e Dendrogrammi relativi ai risultati della ribotipizzazione dei ceppi isolati dal <i>PTC</i> e <i>PTS</i> .....	150
6. CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI .....	159

7. BIBLIOGRAFIA.....	168
----------------------	-----

## SUMMARY

The natural lactic flora of Tramonti Pecorino, a typical cheese manufactured in the “Lattari mountain” area in the province of Salerno (Italy), was investigated. Particular attention was paid to the assessment of the growth dynamics 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. Two batches of cheese were produced for the trial: the first called Classical Tramonti Pecorino (*CTP*) and the second called chilli Tramonti Pecorino (*CTP<sub>1</sub>*). In total, 4 samples from *CTP* were taken, the first one on the manufacturing day and the others on the 39°, 60° and 94° ripening day. Subsequently, 4 samples from *CTP<sub>1</sub>* were taken, the first one on the manufacturing day and the others on the 30°, 50° and 105° ripening day. *Lactobacillus* and *Lactococcus* were enumerated and randomly isolated on MRS and LM17 agar (32°C x 48h ± 2h -mesophilic flora- and 42°C x 48h ± 2h -thermophilic flora) in both batches of pecorino cheese. The gram positive and catalase negative colony (n. 101 in *CTP* and n. 67 in *CTP<sub>1</sub>*) were genotypically identified by Ribotyping. In *CTP* the thermophilic lactic flora initial values of  $\log_{10}$  5.2 cfu/g (*Lactobacillus*) and  $\log_{10}$  7.5 cfu /g (*Lactococcus*) reached the average values of  $\log_{10}$  5.5 cfu/g at the end of ripening. The mesophilic *Lactobacillus* and *Lactococcus* showed an initial charge of  $\log_{10}$  8.3 cfu /g reaching, at the end of ripening, the values of  $\log_{10}$  5.3 and 6.5 cfu / g. In *CTP<sub>1</sub>*, mesophilic *Lactobacillus* attested on  $10^7$  cfu/g during whole ripening time while thermophilic *Lactobacillus*, at the end of ripening reached  $10^6$  cfu/g from initial values of  $10^5$  cfu/g; on average, mesophilic and

thermophilic *Lactococcus* attested on  $10^6$  cfu/g from the beginning of ripening. Ribotyping allowed us to detect 4 lactic acid bacteria species in both batches: *Enterococcus faecium* (69,30% in CTP; 64,17% in CTP<sub>I</sub>), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (18,81% in CTP; 25,37% in CTP<sub>I</sub>), *Enterococcus faecalis* (8,91% in CTP; 5,97% in CTP<sub>I</sub>), *Enterococcus durans* (2,97 % in CTP; 4,47% in CTP<sub>I</sub>). The four species of lactic acid bacteria identified by Ribotyping show the diversity of indigenous lactic acid bacteria that characterizes both Tramonti Pecorino cheese examined.

## RIASSUNTO

E' stata studiata la flora lattica naturale del Pecorino di Tramonti, un formaggio tipico prodotto nell'area dei "Monti Lattari" in provincia di Salerno (Italia). Particolare attenzione è stata dedicata alla valutazione della dinamica di crescita ed all'identificazione molecolare dei batteri lattici autoctoni coinvolti nella maturazione di questo formaggio prodotto con latte crudo di pecora senza colture starter. Per lo studio, sono stati prodotti due lotti di Pecorino: il primo, denominato Pecorino Tramonti Classico (PTC) ed il secondo denominato Pecorino Tramonti Speziato al peperoncino (PTS). In totale, sono state prelevate 4 u.c. dal PTC, una al giorno di produzione e le altre al 39 °, 60 ° e 94° giorno di stagionatura. In seguito, sono state prelevate 4 u.c. dal PTS, una al giorno di produzione e le altre al 30 °, 50 ° e 105 ° giorno di stagionatura. Latobacilli e Lattococchi sono stati enumerati ed isolati in modo casuale su MRS agar e LM17 (32 ° C x 48h ± 2h-flora-mesofili e 42 ° C x 48h ± 2h-termofila flora) in entrambi i lotti pecorino. Le colonie gram + e



catalasi negative (n. 101 nel *PTC* e n. 67 nel *PTS*) sono state identificate genotipicamente mediante Ribotyping. Nel *PTC* la flora lattica termofila, da valori iniziali di  $\log_{10}$  5.2 ufc/g (lattobacilli) e  $\log_{10}$  7,5 (lattococchi), ha raggiunto alla fine della stagionatura, in media, valori di  $\log_{10}$  5,5 ufc/g ; i lattobacilli ed i lattococchi mesofili hanno mostrato una carica iniziale di  $\log_{10}$  8.3 ufc/g per poi, attestarsi a fine stagionatura, su  $\log_{10}$  5,3 e 6,5 ufc/g. Nel *PTS*, i lattobacilli mesofili si sono attestati su  $10^7$  ufc/g durante l'intero periodo di maturazione mentre i lattobacilli termofili, dai valori iniziali di  $10^5$  ufc/g, hanno raggiunto la carica di  $10^6$  ufc/g al fine della stagionatura; i lattococchi mesofili e termofili si sono attestati, in media, su valori di  $10^6$  ufc/g dall'inizio della stagionatura. La ribotipizzazione ha permesso di individuare quattro specie di batteri lattici in entrambe i lotti di pecorino: *Enterococcus faecium* (69,30% nel *PTC*; 64,17% nel *PTS*), *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* (18,81% nel *PTC*, 25,37% nel *PTS*), *Enterococcus faecalis* (8,91% nel *PTC*; 5,97% nel *PTS*), *Enterococcus durans* (2,97 % nel *PTC*; 4,47% nel *PTS*). Le 4 specie di batteri lattici identificate mediante Ribotyping evidenziano la diversità della flora lattica autoctona caratterizzante entrambi i Pecorino di Tramonti esaminati.

**KEY WORDS:** raw milk cheese, Lactic acid bacteria, Bacterial identification, Ribotyping.

**Parole chiave:** formaggio a latte crudo, batteri lattici, identificazione batterica, Ribotyping.

## **1. PARTE INTRODUTTIVA**

## 1.1 I batteri lattici ed il formaggio

Gli uomini confidano sulle tecnologie per preservare e migliorare sempre più la qualità degli alimenti: una delle più antiche tecnologie alimentari è quella che confida sull'attività dei batteri lattici (LAB) per la fermentazione del latte e la produzione del formaggio. Nel corso dei secoli, queste fermentazioni "accidentali" sono divenute processi fermentativi controllati, consentendo la produzione a tutt'oggi di oltre 1000 varietà di formaggi, yogurt e latti fermentati (Broadbent e Steele, 2005 ).

Il processo di caseificazione, iniziato circa 8000 anni fa, prevede la combinazione di 4 ingredienti: latte, rennina, microrganismi e sale i quali sono lavorati attraverso diverse tappe comuni quali la formazione del gel, l'espulsione del siero, la produzione di acido e l'aggiunta di sale, seguite da un periodo di stagionatura. Le variazioni delle miscele di ingredienti e del processo di produzione, hanno determinato la nascita dell'elevata varietà di formaggi presenti oggi nel mondo. Variations in ingredient blends

Le variazioni dei parametri di produzione quali la temperatura di cottura e la tecnica di rottura della cagliata, svolgono un ruolo importante nel determinare le caratteristiche di ogni tipo di formaggio, mentre la microflora gioca un ruolo critico e fondamentale nel conferire le caratteristiche di unicità ad ogni varietà di formaggio.

La microflora casearia, comprende due gruppi di microrganismi: i batteri lattici starter (SLAB) ed i microrganismi secondari.

I SLAB sono coinvolti nella produzione di acido durante la caseificazione e contribuiscono al processo di maturazione.

L'acidificazione e / o la disidratazione, garantiscono quello che è stato l'obiettivo primario della produzione di formaggio fin dall'origine: l'estensione della shelf- life del latte preservandone i principi nutritivi. La produzione di acido lattico da parte della flora starter durante la caseificazione, determina una diminuzione del pH del latte che, in combinazione con la cottura ed il mescolamento, promuove la sineresi della cagliata e l'espulsione del siero (Walstra, 1993).

I microrganismi secondari, tra cui i più importanti sono i batteri lattici non starter (NSLAB) non contribuiscono alla produzione di acido, ma svolgono in generale un ruolo significativo nel complesso processo biochimico quale è la maturazione del formaggio (Cogan, 2000).

## 1.2 Fattori che ne influenzano la crescita dei microrganismi coinvolti nella maturazione del formaggio

Il formaggio rappresenta un complesso ecosistema di biotipi batterici diversi. I microrganismi presenti in esso giocano un ruolo fondamentale nei processi di proteolisi e lipolisi che avvengono durante la maturazione, rendendosi così responsabili dello sviluppo di tutte le caratteristiche finali tra cui l'aroma .

Molteplici parametri fisici controllano la crescita di tali microrganismi durante la maturazione, tra cui il contenuto di acqua libera ( $a_w$ ), la concentrazione di sale ed il pH. Il grado di variazione di tali parametri è influenzato dalla tecnologia di produzione utilizzata.

□ **L'umidità** rappresenta sicuramente un fattore condizionante molto importante perché i microrganismi per crescere hanno bisogno di acqua. Per questo motivo, uno dei meccanismi più efficaci per controllare lo sviluppo microbico, è la riduzione del contenuto di acqua libera attraverso la disidratazione del sistema o l'aggiunta di componenti solubili in acqua, come lo zucchero ed il sale. L'attività dell'acqua è un concetto termodinamico definito come il rapporto tra la pressione del vapore acqueo presente nel sistema e la pressione dell'acqua pura alla stessa temperatura: 
$$a_w = p/p_0 \quad 0 \leq a_w \leq 1$$

L'attività dell'acqua è direttamente proporzionale al contenuto di umidità del formaggio e inversamente proporzionale alla concentrazione di NaCl e di altri composti a basso peso molecolare (Esteban & Marcos, 1989). Durante le prime fasi del processo produttivo del formaggio, l' $a_w$  è ~0.99, valore che permette la crescita e l'attività degli starter. Tuttavia,

dopo il drenaggio del siero, la salatura e durante la maturazione, il valore di  $a_w$  più basso di quello ottimale per la crescita degli starter, contribuisce al controllo della loro attività metabolica e moltiplicazione (Brown, 1976). Generalmente i batteri lattici hanno un valore minimo di attività dell'acqua più alto rispetto agli altri microrganismi presenti nel formaggio; l'attività dell'acqua minima per *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Propionibacterium freudenreichii* è rispettivamente di  $> 0.98$ ,  $0.93$ ,  $> 0.96$  e  $0.96$ , (Weber & Ramet, 1987). La diminuzione del valore di  $a_w$  durante la maturazione consegue alla perdita di acqua per evaporazione, per idrolisi delle proteine a peptidi ed amminoacidi e dei trigliceridi a glicerolo ed acidi grassi e all'aggiunta di sale; l'idrolisi di ogni peptide richiede 1 molecola di acqua. Data l'imponente proteolisi che avviene nel formaggio, l'acqua non legata decrescerà durante la maturazione (Cogan, 2000). Il controllo della perdita di umidità è ottenuto controllando l'umidità relativa della sala di stagionatura o dal confezionamento in plastica. Ci possono essere delle variazioni dei valori dell' $a_w$  nelle diverse zone del formaggio, generalmente quelli duri salati in salamoia e semiduri riportano valori più alti al centro della forma.

#### □ Sale

Il contenuto in sale è fortemente correlato al concetto di  $a_w$  : in realtà, l'attività inibente gli starter ed i batteri alteranti garantita dal sale, si esplica principalmente attraverso la riduzione dell' $a_w$  che il sale stesso determina. La concentrazione di sale richiesta per inibire l'attività microbica dipende dal tipo di alimento, dal suo pH ed umidità, ma generalmente una quantità di 10-100g /Kg può essere considerata sufficiente (Beresford *et al.*, 2001). La relazione che intercorre tra la

concentrazione del sale ( $x$ ,g/kg di formaggio) ed l' $a_w$  è descritta dalla seguente formula (Cogan, 2000):  $- 0.0007x + 1.004$ .

Generalmente sono ritrovate concentrazioni di sale in un intervallo che va da 0.7 a 7g/100g che corrispondono a valori di  $a_w$  rispettivamente di 0.99 e 0.95. Svariati microrganismi possono crescere a tali valori, sottolineando così il contributo di altri fattori coadiuvanti nell'inibire la crescita microbica. E' importante sottolineare che è la concentrazione di sale disciolta nell'acqua libera del formaggio (% s/m) anziché la reale concentrazione del sale aggiunto a determinarne l'effetto inibente.

#### □ pH

Il valore ottimale per la crescita dei batteri, generalmente è intorno alla neutralità, per cui le specie batteriche non acido tolleranti, vengono inibite dai valori tra 4.5 e 5.3 che il pH raggiunge dopo la caseificazione grazie all'accumulo di acidi organici. Si pensa che il reale inibitore sia l'acido organico nella forma indissociata (Beuchat & Golden, 1989). Gli acidi organici maggiormente presenti sono l'acido lattico, l'acido acetico e l'acido propionico, i quali hanno valori di pKa rispettivamente di 3.08, 4.75, 4.87, di modo che l'acido lattico è il minore e l'acido propionico è il più efficace inibitore alla stessa concentrazione, al pH. Tuttavia, nella cagliata l'acido lattico si ritrova invariabilmente in maggiori quantità rispetto agli altri, tranne che nel formaggio Svizzero dove l'acido propionico può essere presente in concentrazione maggiore dell'acido lattico (Steffen, Eberhard, Bosset & Rüegg, 1993).

## **Temperatura di stagionatura**

I microrganismi coinvolti nei processi di produzione e maturazione del formaggio sono sia mesofili che termofili con una temperatura ottimale di 30 e 42°C. La temperatura di stagionatura è sicuramente un parametro fondamentale che deve essere ottimale per favorire i processi proteolitici e lipolitici, garantire lo sviluppo della flora desiderabile e inibire la crescita di microrganismi indesiderati e patogeni. Aumentare la temperatura comporterebbe sicuramente una più veloce stagionatura, ma anche cambiamenti nelle caratteristiche sensoriali del formaggio spesso svantaggiosi.

### **□ Potenziale di ossidoriduzione**

**Il potenziale di ossido riduzione ( $E_h$ )** rappresenta la misura della capacità di un sistema chimico/biochimico di cedere o prendere elettroni, indicando lo stato ossidato o ridotto, con valori negativi o positivi di mV. Il potenziale di ossido-riduzione del latte è +150 mV, mentre quello del formaggio è -250 mV; il meccanismo di ossido-riduzione nel formaggio non è molto chiaro, ma, probabilmente, esso è correlato con la fermentazione dell'acido lattico da parte dei microrganismi starter e con la riduzione, nel latte, di piccole quantità di  $O_2$  ad acqua (Crow *et al.*, 1995a). La conseguenza di tali reazioni, all'interno del formaggio è essenzialmente un sistema anaerobico in cui possono crescere solo microrganismi anaerobi obbligati e/o facoltativi. In diverse colture microbiche,  $E_h$  può essere compreso tra circa +300mV per gli aerobi e -400mV per gli anaerobi (Brown & Emberger, 1980). Per questo motivo, il valore di  $E_h$  del formaggio, è uno dei maggiori fattori che concorre nella determinazione dei gruppi microbici che potranno crescere. Generalmente, i batteri aerobi obbligati, quali *Pseudomonas*,



*Brevibacterium*, *Bacillus* e *Micrococcus*, si sviluppano sulla superficie mentre sono esclusi dalla crescita al suo interno.

#### □ **Nitrato**

In alcuni formaggi, come il Gouda e formaggi tipo irlandese, il nitrato viene aggiunto sotto forma di  $\text{KNO}_3$  o  $\text{NaNO}_3$  per prevenire lo sviluppo del *Clostridium tyrobutyricum* che fermenta il lattato in butirrato,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ . Il butirrato è responsabile della produzione di aromi sgradevoli, mentre l' $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$  portano alla formazione di gonfiori .

In tali situazioni il livello di migrazione del sale è relativamente basso e la sua distribuzione uniforme in tutta la forma può richiedere alcune settimane, inoltre, il contenuto di umidità è elevato.

Pertanto, l'inibizione della crescita di microrganismi alteranti come il *C. tyrobutyricum* è necessariamente prioritaria per raggiungere un equilibrio nel contenuto salino ed il nitrato svolge questa funzione.

Durante la maturazione il nitrato viene ridotto a nitrito (composto realmente inibente) grazie all'azione dell'enzima xantina-ossidasi presente nel latte e nella cagliata.

Il nitrito non influenza la crescita dei LAB, ma inibisce i propionobatteri essenziali per la formazione delle occhiature nel formaggio tipo Emmenthal, per cui non è possibile usarlo nella prevenzione dello sviluppo del *C. tyrobutyricum* nel formaggio che necessita della crescita dei batteri propionici. Il nitrito può reagire con amminoacidi aromatici portando alla formazione di nitrosammine, alcune preoccupanti in quanto cancerogene; questa reazione avviene preferibilmente a pH bassi, tra 2 e 4.5, mentre, generalmente, nei formaggi si raggiungono valori di pH più elevati che rallentano il rilascio di questi composti. Il livello di nitrito consentito è 50 mg/Kg, ma

generalmente la concentrazione presente nel formaggio al momento del consumo è molto più bassa.

### 1.3 I batteri lattici

I batteri lattici, rientrando nella costituzione dei numerosi prodotti lattiero-caseari, verosimilmente sono diventati parte della dieta umana da quando gli uomini iniziarono la raccolta e la conservazione del latte in contenitori grezzi.

Si pensa che i LAB siano nati 1,5-2,0 miliardi di anni fa, essi costituiscono forse il gruppo più numeroso di batteri collegati all'uomo. Sono, naturalmente associati alle superfici mucose, in particolare del tratto gastrointestinale, e sono anche indigeni di svariate matrici alimentari quali frutta, verdura, cereali, vino, latte e carne (Wood e Holzapfel, 1995, Wood e Warner, 2003).

Il termine LAB, viene usato principalmente per definire la caratteristica del metabolismo basale di tali batteri, la fermentazione degli zuccheri esosi, attraverso cui essi portano alla liberazione di alcuni acidi organici, in primo luogo, di acido lattico. Essendo legata alla produzione di acido lattico, la definizione di LAB è di natura biologica piuttosto che tassonomica, quindi i LAB non comprendono un gruppo monofiletico di batteri.

I LAB sono microrganismi procarioti, eterotrofi e chemiorganotrofi. Sono definiti batteri Gram-positivi, immobili, non sporigeni, ed anaerobi facoltativi o microaerofili, ossia tolleranti solo piccole quantità di ossigeno. Sono privi di catalasi, di riduttasi attiva sui nitrati e di citocromo ossidasi (Bottazzi, 1993). Costituiscono un gruppo batterico relativamente eterogeneo che condivide una serie di caratteristiche definite, tra cui: basso contenuto di G + C (<55% mol), elevata acido tolleranza, incapacità di sintetizzare porfirine ed un

metabolismo rigorosamente fermentativo con l'acido lattico come principale prodotto finale del metabolismo (Broadbent e Steele, 2005).

Considerando i prodotti finali della fermentazione degli zuccheri a 6 atomi di carbonio, si parla generalmente di batteri lattici eterofermentanti se i prodotti finali della fermentazione sono: acido lattico (in forma L, D o contemporaneamente); acido acetico (o etanolo, secondo le condizioni di ossidoriduzione) e CO<sub>2</sub> in proporzione 1:1:1. Si parla invece di batteri lattici omofermentanti se l'unico prodotto che scaturisce dalla fermentazione degli esosi è l'acido lattico.

La maggior parte dei LAB appartiene all'ordine *Lactobacillales*, gruppo di batteri non sporigeni, gram-positivi e solo una piccola parte appartiene agli *Actinobacteria* (Wood e Holzapfel, 1995).

Sulla base dell'analisi della parete cellulare e della similarità fra le sequenze dell'RNA ribosomiale (Stackebrandt e Teuber, 1988), i generi che compongono il gruppo dei batteri lattici sono i seguenti: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Weissella*, e *Vagococcus*.

La posizione tassonomica dei ceppi appartenenti al genere *Lactobacillus* è sempre stata oggetto di intensi studi da parte dei microbiologi per svariate ragioni tra cui la presenza di specie batteriche appartenenti a questo genere, in habitat ecologici molto diversi fra loro.

La quasi ubiquità di questi batteri è ben evidenziata dall'elevato numero di specie (oltre 80 specie e circa 20 subspecie) che sono raggruppate nel genere *Lactobacillus* e che sono elencate nell'*Approved List of Bacterial Names*.

È bene sottolineare come la tassonomia batterica sia soggetta a regole ben precise ed accettate in campo internazionale. Il testo di

riferimento è rappresentato dal Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.

L'uso di tecniche d'indagine basate sulla biologia molecolare, ha portato ad una moltiplicazione delle conoscenze rispetto a quest'importante gruppo di organismi, riguardo al rapporto fra ambiente ecologico di appartenenza e posizione tassonomica.

La specie *Lactobacillus acidophilus*, era ritenuta essere la specie di lattobacilli omofermentanti maggiormente presente nell'intestino umano e di diversi altri mammiferi. L'analisi molecolare ha invece dimostrato, come i ceppi raggruppati in questa specie in base ai loro fenotipi, fossero geneticamente non correlati fra loro.

Sono state affiancate alla specie “*acidophilus*” ben cinque nuove specie, di cui almeno due (*L. gasseri* e *L. johnsonii*), filogeneticamente non vicine ai ceppi tradizionalmente descritti come “*acidophilus*”, costituiscono la più probabile vera flora lattica omofermentante obbligata dell'intestino umano.

Analisi filogenetiche più recenti, hanno inoltre dimostrato come i ceppi del genere *Bifidobacterium*, una volta compresi nel genere *Lactobacillus* con il nome di *Lactobacillus bifidum*, non siano in realtà imparentati con i lattobacilli. I bifidobatteri sono in generale presenti solo nella flora batterica umana ed animale, e si distinguono in modo evidente dal resto dei batteri lattici, sia per quanto riguarda un carattere fenotipico quale i prodotti finali della fermentazione del glucosio (l'acido lattico ed l'acido acetico si trovano in rapporto di 2:3, e sono gli unici prodotti finali) sia per la composizione del loro DNA, che ha un contenuto in guanina e citosina ben più alto di quello riscontrato nei veri lattobacilli.

Tra i LAB ci sono sia importanti patogeni, come diverse specie di *Streptococcus*, che preziose specie non patogene utilizzate nella fermentazione industriale di prodotti caseari, carne e verdure, e fondamentali nella produzione di vino, caffè, insilati, cacao e lievito naturale (Dunny e Cleary, 1991; Wood e Holzapel, 1995; Wood e Warner, 2003). Inoltre, i LAB sono un'importante fonte di sostanze antimicrobiche, le batteriocine (Cotter *et al.*, 2005). Alcuni ceppi di batteri lattici, in particolare la maggior parte dei ceppi del genere *Lactobacillus*, sono sempre più riconosciuti come health-promoting, cioè, batteri probiotici (Saxelin *et al.*, 2005), mentre alcuni ceppi dello stesso genere sono noti per la produzione di peptidi bioattivi dalle proteine del latte, benefici per la salute (Korhonen e Pihlanto, 2003). *Lactococcus lactis* è il batterio lattico maggiormente studiato ed il secondo batterio gram-positivo più studiato nella sua genetica, fisiologia e biologia molecolare (Savijoki *et al.*, 2006).

### 1.3.1 Genere *Lactobacillus*

La morfologia cellulare dei batteri lattici di questo genere è molto variabile: alcune specie appaiono come bastoncelli lunghi e sottili, talvolta ricurvi, mentre in altre le cellule sono corte e tozze (coccobacilli), al punto da poter essere confuse con il genere *Leuconostoc*, di forma coccica. Tuttavia, all'interno di ciascuna specie, la lunghezza varia anche con l'età della coltura, con la composizione del mezzo e con la concentrazione di ossigeno; inoltre in alcune specie, ad esempio *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus brevis*, si trovano bastoncelli sia lunghi che corti (Kandler e Weiss, 1986).

Le colonie coltivate su substrato solido, invece, appaiono piccole (2-5 mm), con margini interi e convessi, bianche o completamente trasparenti, in genere lisce.

Come per tutti i batteri lattici, le esigenze nutrizionali del genere *Lactobacillus* sono elevate e per garantire la presenza di tutti i fattori di crescita necessari, i mezzi di coltura utilizzati di solito contengono carboidrati fermentescibili, peptone, estratto di carne ed estratto di lievito; la presenza di supplementi come il Tween 80, un estere dell'acido oleico, è fondamentale per molte specie (Kandler e Weiss, 1986).

Nonostante la complessità delle esigenze nutrizionali, il genere *Lactobacillus* è ampiamente diffuso (Hammes, 1991): si trova infatti nell'organismo umano e animale (soprattutto nell'intestino), negli insilati e in molti alimenti di origine animale e vegetale, come prodotti a base di carne e di pesce, prodotti lattiero-caseari, vino, aceto, birra, sidro ed altre bevande alcoliche ottenute dalla fermentazione di frutta o cereali, nonché nell'impasto acido del pane. Il genere *Lactobacillus* riunisce

microrganismi notevolmente versatili, con una grande diffusione in natura e che possono crescere in differenti condizioni ambientali. La diffusione non è uguale per tutte le specie, né le associazioni che si formano tra di loro trovano uguali nicchie ecologiche di sviluppo (Bottazzi, 1993).

Dal punto di vista metabolico, il genere *Lactobacillus* è diviso in tre gruppi (Kandler e Weiss, 1986):

1. Lattobacilli omofermentanti obbligati
2. Lattobacilli eterofermentanti facoltativi
3. Lattobacilli eterofermentanti obbligati

**1. I lattobacilli omofermentanti obbligati**, fermentano i carboidrati esosi producendo esclusivamente acido lattico, in ragione di 2 moli di acido lattico per ogni mole di carboidrato fermentata. Non sono in grado di fermentare i pentosi e non producono gas. Tuttavia possono produrre quantità molto piccole di acetato, CO<sub>2</sub> ed acetoina, dalla decarbossilazione del piruvato (Schlegel, 1976). Questo gruppo corrisponde ai “Termobatteri” di Orla-Jensen (1919), che comprende quei batteri capaci di crescere a 45°C. Sulla base della minore o maggiore omologia DNA/DNA, all’interno del gruppo degli omofermentanti obbligati, si possono distinguere due sottogruppi di specie correlate fra loro e diverse specie singole, che non hanno alcuna particolare correlazione con le altre. Al 1° di tali sottogruppi di lattobacilli omofermentanti obbligati, appartengono le tre sottospecie di *Lb. delbrueckii*, ossia *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

Il 2° sottogruppo è caratterizzato da una maggiore eterogenicità a livello genetico ed è rappresentato dalla specie *Lb. Acidophilus*.



La specie più affine a *Lb. acidophilus*, è *Lb. helveticus*, che può essere considerato un derivato di *Lb. acidophilus* specializzato per la crescita nel siero acido del latte. E' quindi un microrganismo di particolare interesse lattiero-caseario. Alcuni ceppi sono in grado di fermentare il maltosio. Tra le altre specie omofermentanti obbligate, si trovano *Lb. farciminis* e *Lb. amylovorus* (Corsetti *et al.*, 2000).

**2. I lattobacilli eterofermentanti facoltativi**, fermentano gli esosi producendo acido lattico come gli omofermentanti, ma alcune specie, in determinate condizioni, producono anche acido acetico, acido formico e/o etanolo. Sono inoltre in grado di fermentare i pentosi ad acido lattico ed acido acetico. Rappresentano gli "Streptobatteri" di Orla-Jensen, microrganismi mesofili con temperature ottimali di crescita comprese tra 30 e 37°C. E' un gruppo di batteri molto eterogeneo. I lattobacilli eterofermentanti facoltativi vengono di seguito riportati:

- *Lb. alimentarius*
- *Lb. casei* comprende quattro sottospecie: *Lb. casei* subsp. *casei*, *Lb. casei* subsp. *pseudopantarum*, *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* e *Lb. casei* subsp. *tolerans*
- *Lb. curvatus*
- *Lb. plantarum*
- *Lb. sake*

**3. I lattobacilli eterofermentanti obbligati**, fermentano gli esosi producendo acido lattico, CO<sub>2</sub> ed acido acetico e/o alcol etilico in quantità equimolare (1 mole di acido lattico, 1 mole di CO<sub>2</sub> e 1 mole di acido acetico/alcol etilico per ogni mole di zucchero fermentata). Sono capaci di

fermentare anche i pentosi con produzione di acido lattico e acetico. Questo gruppo corrisponde ai "Betabatteri" di Orla-Jensen, i microrganismi eterofermentanti produttori di gas. Tutte le specie di questo gruppo producono acido lattico in entrambe le forme, D e L, tranne *Lb. fructosus*, che produce quasi esclusivamente D acido lattico, e *Lb. divergens* che produce solo la forma L. *Lb. bifementans* ha la particolarità di fermentare il glucosio a D/L acido lattico in modo omofermentante, ma poi l'acido lattico prodotto è convertito, più o meno rapidamente in dipendenza del pH, ad acido acetico, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>. In generale i lattobacilli eterofermentanti obbligati, costituiscono un gruppo molto eterogeneo, sia per quanto riguarda i profili fermentativi, sia per il livello di omologia DNA/DNA, sia per la percentuale di G + C. Le uniche due specie più vicine dal punto di vista dell'omologia DNA/DNA (40%) sono *Lb. kefir* e *Lb. buchneri*.

### 1.3.2 Genere *Lactococcus*

Il genere *Lactococcus* comprende batteri lattici di forma coccica, con una temperatura ottimale di crescita di 30°C, in grado comunque di crescere a 10°C ed anche meno, ma non a 45°C e non in presenza del 6.5% di NaCl. Il metabolismo delle specie appartenenti a questo genere è di tipo omofermentante obbligato, con acido L-lattico come principale prodotto della fermentazione.

Il genere *Lactococcus* comprende sostanzialmente poche specie, di cui tre di particolare interesse lattiero-caseario: *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, entrambe capaci di crescere su un substrato contenente fino al 2% di NaCl, e *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis*, che è capace di utilizzare l'acido citrico per produrre acetoina e diacetile.

Queste tre specie sono tutte strettamente legate dal punto di vista dell'omologia a livello di DNA. Alle tre sottospecie di *Lc. lactis* si aggiungono *Lc. garviae*, considerato un probabile agente di mastite, *Lc. plantarum* e *Lc. raffinolacti* (Teuber *et al.*, 1993).

### ***Lactococcus lactis subsp. lactis***

*Lactococcus lactis subsp. lactis* e *subsp. cremoris*, sono batteri lattici a morfologia coccica che formano catene anche lunghe. Sono microaerofili, non sporigeni, immobili, catalasi e citocromo negativi, non emolitici, molto sensibili all'infezione fagica e crescono a 10°C ma non a 45°C. I principali caratteri distintivi per la specie *Lactococcus lactis subsp. lactis* sono riuniti nella tabella n. 1 (Battistotti e Bottazzi, 1998).

**Tabella n. 1 Principali caratteri distintivi per *Lactococcus lactis subsp. lactis***

<b>Peptide del peptidoglicano</b>	L-Lys-D-Asp
<b>Produzione di acido lattico in latte dalla fermentazione di</b>	Lattosio, glucosio, galattosio
<b>Tipo di acido lattico prodotto</b>	L (+)
<b>Quantità di acido lattico prodotto in latte</b>	<1%
<b>Sviluppo in presenza del 4% di NaCl</b>	Positivo
<b>Metabolismo</b>	Omofermentante
<b>(G+C) del DNA</b>	% 34-37
<b>NH<sub>3</sub> da arginina</b>	positivo

### 1.3.3 Genere *Leuconostoc*

Tale genere comprende batteri di forma coccica, distinguibili dal genere *Lactococcus* per la produzione di gas. Tutte le specie del genere *Leuconostoc* hanno, infatti, metabolismo eterofermentante. Sono ampiamente diffusi in natura, specialmente sui substrati di origine vegetale, anche se le loro esigenze nutritive sono molto elevate, come per i lattobacilli.

Hanno temperature ottimali di crescita comprese tra 20 e 30°C e sono meno acidofili dei lattobacilli, preferendo substrati debolmente acidi o del tutto neutri, tranne che per *Leuconostoc oenos* (riclassificato recentemente come *Oenococcus oenos*), che si è adattato al pH basso del vino (è l'agente della fermentazione malolattica dei vini); sono anaerobi, molte specie formano una caratteristica pellicola ("slime") ed alcune si distinguono in base alla produzione di un pigmento giallo limone (Holzapfel e Schillinger, 1991). Il genere *Leuconostoc* è di grande interesse dal punto di vista lattiero-caseario, comprendendo, infatti, diverse specie utilizzate come starter nel burro e formaggio, perchè in grado di produrre acetoino e diacetile a partire dal citrato del latte e quindi di conferire aroma al prodotto finito. Due sono le specie di maggiore interesse lattiero-caseario: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc lactis*. Per le due specie indicate, lo sviluppo migliore avviene in condizioni di anaerobiosi e con l'aggiunta al substrato nutritivo di 0,05 % di cisteina- HCL.

Le specie lattiche di *Leuconostoc* non crescono in presenza del 3% di cloruro di sodio e non sono in grado di iniziare lo sviluppo a pH 4,8. Il latte è per questi batteri un substrato povero e per molti ceppi è necessario un supplemento di estratto di lievito o di amminoacidi e

glucosio. Nel latte, producono gas in quanto hanno un metabolismo etero fermentante: a tale riguardo, essi seguono la via del pentoso fosfato con produzione equimolare di D(-) acido lattico, acido acetico (o alcool etilico) ed anidride carbonica.

*Leuconostoc lactis* dimostra un'elevata termoresistenza e può sopravvivere a 60°C per trenta minuti (Bottazzi,1993).

*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* è in grado di fermentare L arabinosio, fruttosio, saccarosio e trealosio e, soprattutto se si trova a 20-25°C, produce, a partire dal saccarosio, una caratteristica patina di destrano che lo protegge dal calore. La maggior parte dei ceppi è anche in grado di fermentare il maltosio. Non produce alcun pigmento (Teuber M. *et al.*, 1993).

*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum*, ha caratteristiche simili alla specie precedente, anche se l'attività di produzione di destrano dal saccarosio è minore, lo spettro fermentativo è più ridotto e cresce anche a 37°C.

*Leuconostoc citreum* fermenta fruttosio, maltosio, mannosio, saccarosio e trealosio. Molti ceppi producono un pigmento giallo (Schleifer, 1986).

#### **1.3.4 Genere Streptococcus**

Il genere *Streptococcus* comprende molte specie che si possono riunire in differenti gruppi. L'unica specie del genere *Streptococcus* da far rientrare nel gruppo dei batteri lattici è *Streptococcus thermophilus*. Si può dire che rientra tra gli "streptococchi orali" poiché l'analisi degli acidi grassi della parete cellulare e gli esami di ibridazione DNA-DNA ,

avvicinano *S. thermophilus* a *S. salivarius*. La specie *S. thermophilus* si differenzia dalla specie di *Lactococcus* per due caratteristiche di notevole importanza: il tempo di generazione ed il numero di carboidrati fermentati.

Il tempo di generazione nel latte è per *S. thermophilus* di 22-28 minuti, mentre per *Lactococcus* è di circa 60-70 minuti. I carboidrati fermentati da *S. thermophilus* sono molto pochi e la specie manifesta una marcata preferenza per i disaccaridi lattosio e saccarosio. Si segnala inoltre che *S. thermophilus* è altamente specializzato a crescere in latte o particolari nicchie ecologiche a base di latte per un adattamento iniziato in tempi lontanissimi. La linea evolutiva di *S. thermophilus* si può ritenere sia stata parallela a quella di *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, infatti, le due specie coesistono nelle stesse nicchie ecologiche ed hanno molte caratteristiche fisiologiche simili (Bottazzi, 1993).

### **1.3.5 Genere *Pediococcus***

I pediococchi sono gli unici batteri lattici che si dividono su piani ortogonali. Le specie di maggior interesse sono *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentasaceus*.

I pediococchi, possono essere differenziati dai micrococchi perchè non sono pigmentati, sono catalasi negativi e perchè producono una maggiore quantità di acido lattico. Il latte è un terreno povero per i pediococchi e quindi, per *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentasaceus*, occorre supplementarlo con amminoacidi.

Alcuni ceppi di *P. pentasaceus* richiedono anche acido folico. Nei riguardi dei carboidrati, diversi sono i monosaccaridi fermentati e le due

specie di interesse caseario fermentano anche i pentosi. Con i pediococchi non sono stati descritti attacchi da batteriofago.

La specie *P. pentasaceus* è più diffusa sui vegetali mentre *P. acidilactici* nei formaggi; nel latte e derivati sono comunque in associazione ma sono meno importanti degli altri batteri lattici. Da un punto di vista fisiologico sono più vicini ai bacilli lattici e *Leuconostoc* che non agli streptococchi (Battistotti e Bottazzi, 1998).

## **1.4 I batteri lattici starter (SLAB)**

Le colture starter, sono ceppi di batteri lattici (LAB) che si aggiungono al latte per indirizzare il processo di fermentazione (producendo acido lattico a partire dal lattosio) ed, allo stesso tempo, per influire sulle caratteristiche sensoriali dei prodotti caseari (migliorando sapore e tessitura) e sulla loro sicurezza per il consumatore, inibendo alcuni microrganismi indesiderati.

Sono usate nella produzione di molti formaggi, tipi di latte fermentato e burro.

La microflora autoctona del latte, da sola in alcuni casi, è insufficiente e difficile da controllare, ed in molti processi di produzione, viene distrutta dal trattamento termico al quale viene sottoposto il latte prima di essere trasformato. Esempi classici sono lo yogurt e i diversi tipi di latte fermentato, infatti, le alte temperature alle quali viene sottoposto il latte, riducono la microflora autoctona e le colture starter diventano le principali responsabili del processo di fermentazione.

Nella produzione del formaggio, lo starter ha il ruolo di indirizzare il processo di fermentazione, anche se, al processo di trasformazione del latte in formaggio, contribuisce anche l'eventuale microflora residua del latte e quella dell'ambiente che si sviluppa insieme alle colture starter.

Durante la fermentazione, la diminuzione del pH dei prodotti caseari influenza diversi aspetti del processo di caseificazione, come la qualità igienica, la tessitura e la composizione dei prodotti.

L'acido lattico nella produzione del formaggio, è responsabile della coagulazione e della tessitura finale della pasta. Il decremento del pH, influisce indirettamente sull'aroma controllando l'attività



proteolitica ed influenzando le reazioni biochimiche coinvolte nella formazione di altri composti aromatici.

I batteri lattici usati come starter, sono coinvolti anche nella produzione di composti aromatici che definiscono le proprietà organolettiche e determinano l'identità specifica dei prodotti lattiero-caseari. Lo sviluppo di composti aromatici, può derivare dalla fermentazione di lattosio e citrato, dalla degradazione di proteine e grasso del latte nonché dal metabolismo degli aminoacidi ed acidi grassi liberi. Il contributo aromatico al prodotto finale dipende da un grosso numero di fattori come, specifiche caratteristiche metaboliche dei ceppi starter, condizioni di fermentazione del latte, tipi di prodotti e composizione, condizioni di maturazione, stoccaggio ecc.

Le condizioni acide, il ridotto pH dei prodotti lattiero caseari fermentati insieme alla produzione da parte di alcuni ceppi di metaboliti secondari ad attività inibente (come batteriocine, perossido di idrogeno e diacetile), prevengono la crescita o la sopravvivenza di alcuni batteri patogeni ed alteranti.

La diminuzione di pH, migliora anche l'espulsione del siero dalla cagliata ed indirettamente influenza la tessitura del formaggio. Generalmente i LAB sono capaci di produrre esopolisaccaridi che possono migliorare le caratteristiche di tessitura in alcuni prodotti caseari (Broome *et al.*, 2003).

La classificazione delle colture starter, può essere fatta in base alla loro funzione, alla loro temperatura di crescita ed alla loro composizione.

Le colture starter, in base alla temperatura d'incubazione e di lavorazione del prodotto nel quale vengono introdotte, possono essere mesofile o termofile.

- **Le colture mesofile** crescono e producono acido lattico ad una temperatura ottimale attorno a 30°C pur se possono resistere ad una temperatura massima di fermentazione di 38-40°C. Le specie più usate di LAB mesofili sono: *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *L. lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis* subsp *cremoris* e *Leuconostoc lactis*.

Le colture mesofile possono essere classificate in base alla fermentazione e composizione del citrato come

- starter citrato negativi (*L. lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*)
- starter citrato positivi (*Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*).

- **Le colture termofile** invece, hanno una temperatura ottimale di crescita attorno a 42°C. Le specie più usate sono: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*. Possono essere usate colture mesofile e termofile in associazione per produrre alcuni tipi di prodotti (Parente e Cogan, 2004).

Tutti i ceppi di LAB, utilizzati oggi come starter, provengono da starter artigianali contenenti un misto di differenti ceppi e/o specie. La produzione di tali colture deriva dall'uso di una parte di prodotto già fermentato, inoculata in un nuovo prodotto da fermentare e/o dall'applicazione di elementi selettivi quali, per esempio, trattamento termico e temperatura d'incubazione. In questo tipo di lavorazione, la composizione del latte crudo può facilmente venire influenzata dall'ambiente di lavorazione del formaggio ed il controllo delle condizioni delle colture durante la loro riproduzione sono molto limitate. Questi starter naturali hanno quindi una composizione non ben definita.

In Europa, è ancora oggi presente una considerevole produzione di formaggi tradizionali, realizzati con starter naturali che costituiscono una fonte preziosa di ceppi con proprietà tecnologiche desiderate, anche se diversi di questi mostrano una limitata abilità a produrre acido quando coltivati in coltura pura (Parente e Cogan, 2004).

Gli starter naturali sono considerati altamente resistenti all'infezione fagica, perchè si sono riprodotti in presenza di fagi e questo porta ad una dominanza di ceppi resistenti o tolleranti.

La fluttuazione nella composizione degli starter naturali, dà luogo a performance variabili e questo non è accettabile nella moderna pratica casearia. Sono riconosciuti due tipi di starter artigianali (naturali) in relazione al substrato ed alla tecnica usata per la loro riproduzione:

- siero-starter (o sieroinnesto)
- latte-starter (o lattoinnesto)

I sieroinnesti vengono preparati incubando, per una notte in condizioni selettive, una parte di siero restante dalla lavorazione precedente. Nella produzione del Parmigiano Reggiano e del Grana Padano, il siero a fine lavorazione (50-54°C) viene rimosso e lasciato una notte a 45°C; il pH deve scendere sino a 3,3.

Il siero risulta composto da colture LAB come *Lact. helveticus*, *Lact. delbrueckii*, e *Strep. thermophilus*. Siero - colture simili sono utilizzate nella produzione di paste filate italiane, formaggi a lunga stagionatura argentini e nel formaggio Comté francese.

Altri tipi di sieroinnesti sono deproteinizzati e vengono usati per la produzione di formaggio Pecorino e per la fabbricazione di formaggi tipo svizzero (Emmental, Sbrinz, Gruyere) in piccoli caseifici nelle Alpi.

I lattobacilli termofili (*Lact helveticus*, *Lact delbrueckii* subsp *lactis*) dominano le colture prodotte in condizioni selettive di alta

temperatura, mentre gli streptococchi (*Strep thermophilus*) ma anche lattococchi ed enterococchi spesso dominano colture incubate a temperatura più basse (35-40°C), e generalmente mostrano alta diversità microbica (Mucchetti e Neviani, 2006).

I lattoinnesti invece, sono impiegati in piccole produzioni sia al Sud che al Nord Italia per la produzione di formaggi tradizionali. La pressione selettiva usata per lo sviluppo della microflora desiderata, include la termizzazione/pasteurizzazione del latte crudo (62-65°C per 10-15 min) seguito da incubazione a 37-45°C sino al raggiungimento dell'acidità desiderata, in tal caso la metodologia usata caratterizza la microflora.

La microflora dominante può essere composta da *Strep thermophilus*, enterococchi (*Enterococcus faecium* e *Enterococcus faecalis*), lattobacilli (*Lact helveticus*, *Lact delbrueckii* subsp *bulgaricus/lactis*, e *Lactobacillus casei* subsp *paracasei*), e *Streptococcus macedonicus* (Reinheimer *et al.*, 1997; Marino *et al.*, 2003; Parente e Cogan, 2004; Mucchetti e Neviani, 2006; De Angelis *et al.*, 2008).

Nella produzione di molti formaggi, gli starter artigianali sono stati sostituiti da starter commerciali, allestiti, in realtà, mediante una specifica selezione di ceppi “naturali”.

Gli starter commerciali, sono prodotti in condizioni controllate in laboratori specializzati e vengono distribuiti ai caseifici dove vengono impiegati direttamente in caldaia (inoculazione diretta). Possono essere utilizzati entrambi gli starter commerciali mesofili o termofili nella produzione di formaggio (Parente e Cogan, 2004). La produzione di starter commerciali in condizioni controllate, riduce la variabilità

intrinseca associata all'uso di starter artigianali e di conseguenza la variabilità del prodotto (Limsowtin *et al.*, 1996).

L'uso, nella produzione, di starter commerciali costituiti da un numero limitato di ceppi, può comportare problemi di infezione fagica che a sua volta può annullare la fermentazione lattica.

Esistono diversi studi sull'utilizzo di ceppi, isolati e selezionati da aree geografiche specifiche. Questi studi riguardano formaggi italiani (Carminati *et al.*, 1985; Gatti *et al.*, 1993; Randazzo *et al.*, 2007; de Candia *et al.*, 2007; De Angelis *et al.*, 2008), spagnoli (Menendez *et al.*, 2000), portoghesi (Macedo *et al.*, 2004), e argentini (Candioti *et al.*, 2002).

Questi studi sottolineano come la sostituzione di colture naturali non è sempre un'alternativa adeguata per ottenere un prodotto finale con caratteristiche sensoriali simili a formaggi tradizionali. Tuttavia viene incoraggiato l'uso di colture multiceppo, per limitare la diminuzione di ceppo-diversità nel formaggio (Marino *et al.*, 2003) e per raggiungere una certa uniformità ed un'alta qualità finale dei prodotti fermentati.

La moderna produzione di starter commerciali mette a disposizione colture che si possono inoculare direttamente in caldaia senza la necessità di propagarle.

Gli starter ad inoculo diretto sono riprodotti in grosse quantità a partire dalle colture di partenza, concentrate (normalmente per centrifugazione) e congelate o congelate liofilizzate per la conservazione ed il trasporto al caseificio.

Gli starter ad inoculo diretto possono essere vantaggiosi specialmente per le aziende che non hanno personale specializzato e macchinari specifici. La produzione del formaggio, così, può avvenire in condizioni ideali d'igiene e stabilità di composizione del latte, potendo,

l'inoculazione dello starter, essere standardizzata e testata in precedenza. Inoltre, la propagazione e concentrazione dello starter di un fornitore esterno, riduce la probabilità di contaminazione dello stesso da parte dei fagi provenienti dall'ambiente aziendale. In generale, i formaggi che richiedono una rapida produzione di batteri lattici durante le prime 2-3 ore richiedono un alto livello di inoculo e in questi casi l'uso di questo tipo di starter risulta molto costoso. Per piccole produzioni di formaggio, invece, risulta più conveniente.

Come sopra ricordato, l'uso di starter industriali ha ridotto le diversità tra i prodotti caseari fermentati a causa della limitata disponibilità commerciale di nuove colture starter.

Oggi, si ricercano potenziali organismi starter dal pool di ceppi autoctoni isolati da latte crudo e da formaggi tradizionali e/o artigianali. I sieroinnesti utilizzati nella produzione di formaggi stagionati, possono rappresentare una fonte d'isolamento interessante (Rossetti *et al.*, 2009) contenendo lattobacilli, in particolare *Lact. helveticus* a forte attività proteinasica e peptidasica influenti sulla qualità del formaggio (Korhonen and Pihlanto, 2006)

Ogni potenziale nuovo starter deve produrre rapidamente acidità, svilupparsi in maniera ottimale nel latte ed essere fago-resistente. Sono stati isolati da vegetali, *L. lactis* subsp. *lactis* ma non *L. lactis* subsp. *cremoris* e diversi di questi sono dei buoni produttori di acido coagulando il latte in 18h a 21°C. Di contro, pochissimi ceppi di *L. lactis* isolati da prodotti caseari artigianali sono forti produttori di acido (Parente e Cogan, 2004).

Alcuni ceppi producono aromi anormali nel latte, ad esempio, la combinazione di un ceppo autoctono a bassa attività proteolitica ed alta attività aminoacido decarbossilasica, con un ceppo commerciale, ad alta

attività proteolitica e bassa attività decarbossilasica, determina la produzione di aroma di cioccolato nel latte, dovuto alla presenza di diverse catene ramificate di aldeidi e acidi (Wouters *et al.*, 2002). Quest'ultimo esempio sottolinea la difficoltà nel produrre una formulazione appropriata di starter, cosa molto importante per la produzione industriale degli stessi.

Tra le diverse difficoltà nel produrre una formulazione appropriata di starter, l'infezione da parte dei batteriofagi rappresenta un serio problema in quanto influisce negativamente nel processo fermentativo caseario. Tale effetto inibitorio nei confronti dei batteri lattici starter è conosciuto da oltre 70 anni, (Moineau and Levesque, 2005). Whitehead and Cox (1935) hanno identificato il primo fago specifico per i batteri lattici. La presenza di nuovi fagi nell'ambiente caseario causa mutazione e ricombinazione con altri fagi litici (Brüssow and Hendrix, 2002) o con il cromosoma ospite batterico (Moineau *et al.*, 1994).

Considerando che, la presenza di fagi è inevitabile nell'ambiente caseario, sono state adottate diverse strategie per controllarli (Moineau and Levesque, 2005).

Programmi di rotazione delle colture starter ad inoculo diretto, attenta gestione e smaltimento del siero (Coffey e Ross, 2002), sanificazione ottimizzata ed uso di colture starter fago resistenti potrebbero essere considerati gli approcci da applicare per minimizzare la fago diffusione in caseificio.

*L. lactis* e *Strep. thermophilus* costituiscono la chiave di molte fermentazioni industriali casearie e sono stati spesso trovati infetti da fagi (Brüssow, 2001). L'estesa co-sopravvivenza di LAB e fagi nello stesso ambiente, ha predisposto i ceppi all'acquisizione di sistemi di difesa nei confronti di una varietà di batteriofagi autoctoni. Questo

meccanismo include il blocco dell'iniezione di DNA, sistemi di restrizione/modificazione ed infezione abortiva (Moineau e Levesque, 2005). La coniugazione di plasmidi autoctoni fago-resistenti è stata una strategia vincente, e ha coinvolto LAB caseari per 20 anni, creando formulazioni tuttora sotto brevetto in tutto il mondo (Klaenhammer e Fitzgerald, 1994; Moineau e Levesque, 2005).

Il trasferimento di plasmidi fago-resistenti per coniugazione, rappresenta oggi, una delle più convenienti, semplici e “naturali” strategie che coinvolgono i ceppi starter, ma questo può essere limitato a causa della mancanza di adeguati marcatori selezionabili sui plasmidi.

Mills *et al.*, (2002) hanno sviluppato il *lacticin 481* come marker per il trasferimento di un plasmide fago-resistente nel ceppo starter *L. lactis*. Questo approccio ha un doppio vantaggio: il nuovo ceppo sviluppato è fago-resistente e produttore di batteriocine, altra caratteristica benefica per le fermentazioni industriali.

Diverse ricerche hanno descritto l'isolamento di varianti fago-resistenti naturali in ceppi di lattococchi (Limsowtin e Terzaghi, 1976), *Strep thermophilus* (Binetti *et al.*, 2007), *Lact. helveticus* (Neviani *et al.*, 1992; Quiberoni *et al.*, 1999), e *Lact. delbrueckii* (Guglielmotti *et al.*, 2006). Questa metodologia è stata recentemente rivalutata perché è semplice e naturale prevedendo manipolazioni non genetiche. Essa ha consentito l'isolamento di molte varianti fago-resistenti, con alte performance tecnologiche, usate successivamente in fermentazioni industriali (Quiberoni *et al.*, 1999).

Il tema dell'infezione fagica coinvolge anche il settore dei probiotici che possono essere usati come starter ( Forsman *et al.*, 1993; Capra *et al.*, 2006). Questi ceppi normalmente crescono con una certa lentezza e sono particolarmente vulnerabili ai fagi (Capra *et al.*, 2006).



Lo sviluppo di starter probiotici resistenti è molto limitato, ma è un problema cruciale che deve essere considerato visti gli importanti benefici che i ceppi probiotici possono apportare all'uomo.

## 1.5 I batteri lattici non starter (NSLAB)

I LAB non starter sono microrganismi che si sviluppano in quasi in tutte le varietà di formaggio: essi sono lattobacilli mesofili e pediococchi costituenti una parte significativa della flora microbica della maggiore varietà di formaggi durante la stagionatura e possono anche costituire un'impronta microbica per formaggi tradizionali. Non fanno parte della normale flora starter; essi generalmente non crescono bene nel latte (Cogan *et al.*, 1997) e non contribuiscono alla produzione di acido. I Lattobacilli NSLAB, regolarmente rilevati nel formaggio, rientrano nel gruppo degli eterofermentanti facoltativi e sono quindi a volte indicati come lattobacilli facoltativi eterofermentanti (FHL).

La flora NSLAB di molte varietà di formaggi è stata riportata in letteratura negli ultimi anni: pur essendo molte le specie di lattobacilli mesofili isolate dal formaggio, quelle più frequentemente riscontrati sono *Lb. casei* / *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. curvatus* (Chamba e Irlinger, 2004). *Pediococcus acidilactici* e *Pe. pentosaceus* sono i più frequenti pediococchi nel formaggio.

Il *Lb. plantarum* è predominante nella microflora non-starter del formaggio Calabrese maturato in grotta, mentre il *Lb. paracasei* è presente in formaggi italiani come il Montasio; esso non è rilevato nelle prime fasi di maturazione, ma cresce fino a  $10^7$  ufc/g nel primo mese, per poi rimanere a questo livello fino circa al quarto mese (Lombardi, Cattelan, Martina e Basso, 1995). In formaggi caratterizzati da una lunga maturazione come il Parmigiano Reggiano, la flora non-starter è costituita principalmente da *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus* e *Pediococchi acidilactici*; durante la maturazione la loro densità diminuisce a partire da  $10^8$  ufc/g al quinto mese fino ad arrivare a  $10^4$  ufc/g dopo 24 mesi.

Nel formaggio Toma sono stati identificati ceppi di *Lb. fermentum* e *Lb. plantarum* (Cocconcelli, 1996). I formaggi svizzeri come l'Emmenthal e il Groviera possono essere prodotti a partire da latte crudo, termizzato o pastorizzato; la microflora non-starter è maggiore nei formaggi a latte crudo ( $10^8$  ufc/g) rispetto a quelli a latte pastorizzato ( $10^6$  ufc/g). I batteri NSLAB dei formaggi freschi sono principalmente *Lb. paracasei*, *Lb. plantarum* e *Lb. brevis*, mentre il *Lb. paracasei* è il componente principale della flora non-starter dei formaggi maturi.

Nel formaggio Cheddar la microflora non-starter è rappresentata principalmente da *Lb. paracasei*, *Lb. casei* e *Lb. plantarum*, seguiti da *Lb. brevis*, *Lb. curvatus*, *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum*, *Lb. buchneri*, *Lb. bifementans*, *Lb. parabuchneri*, *Lb. farciminis* e *Lb. kefir*.

I NSLAB, usati come colture aggiunte nel processo di produzione, possono esplicare un'azione coadiuvante nella maturazione abbreviandone i tempi e conferendo l'aroma desiderato, contribuire alla sicurezza microbica mediante il controllo dei germi patogeni e/o alteranti ed eventualmente offrire benefici per la salute.

Colture di lattobacilli eterofermentanti facoltativi mesofili, possono essere aggiunte (come colture secondarie) per dare un importante contributo alla proteolisi secondaria ed alla formazione dell'aroma nel periodo di stagionatura, come nei formaggi Cheddar (McSweeney *et al.*, 1994), Danbo (Antonsson *et al.*, 2003), e Armada (Herrerros *et al.*, 2007).

La fonte di energia utilizzata dalla flora non-starter per la loro crescita non è molto chiara, in quanto nel momento in cui avviene il loro sviluppo il lattosio è esaurito (Turner & Thomas, 1980). I NSLAB possono trasformare L isomero del lattato nell'isomero D (Thomas & Crow, 1983) ma è improbabile che agisca come una fonte di energia.

Il citrato è presente nel formaggio Cheddar giovane a circa 8 mmol / kg ed alcuni ricercatori lo hanno suggerito come una potenziale fonte di energia per i NSLAB (Jimeno, Lazaro, e Sollberger, 1995a). Questo però è risultato improbabile come l'utilizzo del ribosio, poiché molti ceppi di NSLAB isolati dal formaggio Cheddar maturo, sono risultati incapaci di fermentare il ribosio (Fitzsimons *et al.*, 1999). Infatti, uno studio sul Cheddar ha rilevato come quasi nella totalità delle forme esaminate, c'è stato un ridottissimo o nessun utilizzo del citrato (Jordan & Cogan, 1993), implicando che, almeno in alcuni casi, i NSLAB possono raggiungere alte cariche senza l'utilizzazione del citrato.

Gli starter sono presenti ad una densità iniziale di circa  $10^8$ - $10^9$  ufc/g nella maggiore varietà dei formaggi ma tali livelli diminuiscono durante la stagionatura a causa dell'attività dei propri enzimi autolitici (Thomas & Batt, 1969). È stato dimostrato che molti ceppi non starter sono in grado di crescere servendosi dei prodotti rilasciati dalle cellule starter, in seguito ad autolisi. (Thomas, 1987)

I lattobacilli mesofili hanno dimostrato di possedere alcune attività glicoside idrolasi (Williams & Banks, 1997) grazie alle quali potrebbero utilizzare gli zuccheri dalle glicoproteine della membrana del globulo di grasso del latte come fonte di energia (Fox, McSweeney, & Lynch, 1998; Diggin, Waldron, McGoldrick, Cogan, e Fox, 1999).

La fonte dei NSLAB nel formaggio è stato al centro di dibattito, poiché essi sono stati rilevati nei formaggi a base di latte sia crudo che pastorizzato. Nel caso dei tradizionali formaggi Europei ottenuti da latte crudo, la fonte principale è probabilmente il latte, mentre nei formaggi da latte pastorizzato, come il Cheddar, la probabile fonte di NSLAB è la contaminazione post-pastorizzazione e/o una pastorizzazione

insufficiente ad inattivare completamente i NSLAB (Turner, Lawrence e Lelièvre, 1986; Martley & Crow, 1993).

Uno studio su 21 culture di NSLAB isolati dal formaggio Cheddar, ha dimostrato come il ceppo più resistente al calore, il *Lb. casei* NCDO161, ha subito una riduzione di 3,5 log quando riscaldato a 72°C per 15'', e la maggior parte delle altre culture si sono ridotta di 6 log (Turner *et al.*, 1986). Ciò suggerirebbe che i NSLAB sarebbero inattivati dalla pastorizzazione. Tuttavia, un altro studio ha indicato che un piccolo numero di NSLAB può sopravvivere alla pastorizzazione anche se stressati e rivitalizzarsi durante la stagionatura e successivamente moltiplicarsi nel formaggio (Jordan & Cogan, 1999) con un tempo di generazione di 8,5 giorni nel formaggio stagionato a 6°C (Jordan & Cogan, 1993) così che, da bassi livelli essi rapidamente diverrebbero una parte significativa della flora totale del formaggio.

La flora microbica del formaggio, in particolare quella dei formaggi a latte crudo, è molto complessa. E' quindi probabile che molte interazioni avvengono tra i ceppi di NSLAB ed altri batteri, nel formaggio, interazioni molto importanti il cui studio è difficile a causa dei complessi ecosistemi microbiologici trovati nel formaggio (Martley & Crow, 1993), è stato osservato come il *Lb. casei*, il *Lb. rhamnosus* e il *Lb. plantarum* possono inibire gli enterococchi e i batteri propionici, con un meccanismo di inibizione ancora sconosciuto (Jimeno *et al* 1995; Lynch, McSweeney, Fox, Cogan, e Drinan, 1996) anche se probabilmente l'inibizione non è mediata da una sostanza inibente come un batteriocina, ma avverrebbe attraverso la competizione per i metaboliti limitanti.

Il significato della presenza dei lattobacilli eterofermentanti nel formaggio è controversa. Negli ultimi dieci anni, ci sono stati un certo

numero di studi circa gli effetti di lattobacilli aggiunti, sullo sviluppo del sapore del Cheddar, con la maggior parte degli autori che descrivono un' aumento dei livelli di proteolisi secondaria e una maggiore intensità nel sapore (Hynes *et al.*, 2003; Di Cagno *et al.*, 2006; El Soda, Desmazeaud, Aboudonia, e Kamal, 1981; Puchades, Lemieux, e Simard, 1989; Lemieux, Puchades, e Simard, 1989; Broome, Krause, & Hickey, 1990; Trepanier, Simard, e Lee, 1991; McSweeney *et al.*, 1994; Johnson, Etzel, Chen, & Johnson, 1995; Lane & Fox, 1996; Lynch *et al.*, 1996).

Secondo diversi Autori questi, invece, sarebbero responsabili di molte alterazioni di sapore nel formaggio determinando sapori di acido ed amaro (Lawrence & Gilles, 1987; Herreros *et al.*, 2007). Inoltre l'aggiunta di questo tipo di colture può inibire la crescita di batteri accidentali indesiderabili prevenendo in tal modo l'insorgenza dei difetti (Banks e Williams, 2004). Questi ceppi hanno molte proprietà in base alle quali possono essere selezionati in vario modo come aggiunte. Queste proprietà sono fortemente ceppo dipendenti e rendono difficile la scelta di combinazioni di ceppi che colleghi le proprietà richieste alla concomitante mancanza di imperfezioni.

Il catabolismo degli aminoacidi, la produzione di composti aromatici e specialmente la loro attività glutammato deidrogenasica, sembrano essere attività determinanti per la scelta colture aggiunte di ceppi lattobacilli eterofermentanti facoltativi mesofili per il loro contributo durante la stagionatura. Tanous *et al.*, (2002) hanno mostrato che circa la metà dei *Lact. plantarum* e dei *Lact. paracasei* isolati dal formaggio, ha attività glutammato deidrogenasica. Mancano studi comparativi sul comportamento di un determinato ceppo in differenti formaggi; questi studi possono, tuttavia, fornire importanti informazioni, su come le condizioni di produzione (tecnologia di caseificazione,

velocità di raffreddamento, temperatura di stagionatura ecc) e gli starter possono favorire o danneggiare la crescita delle colture aggiunte ed influenzare fortemente le attività enzimatiche.

## 1.6 I batteri lattici probiotici

I probiotici sono microrganismi che somministrati in quantità adeguate conferiscono un beneficio alla salute dell'ospite (FAO/WHO, 2002).

I batteri, per essere considerati probiotici, devono soddisfare i seguenti requisiti:

- essere di provenienza intestinale: i batteri probiotici devono essere normali componenti della microflora dell'intestino umano in buone condizioni di salute.

- essere assolutamente sicuri per l'impiego nell'uomo senza cioè causare effetti collaterali, specialmente in pazienti debilitati o immunocompromessi.

- essere attivi e vitali alle condizioni ambientali tipiche dell'intestino.

- essere resistenti ad un pH basso, al succo gastrico, al succo pancreatico ed alla bile.

- essere in grado di persistere almeno temporaneamente nell'intestino umano (Johansson *et al.*, 1993).

Sono stati attribuiti un certo numero di benefici sulla salute a prodotti che contengono microrganismi probiotici.

Per quanto riguarda la fisiologia dell'intestino, i probiotici rinforzano la barriera gastrointestinale, che può considerarsi formata da una componente fisica (struttura epiteliale) ed una funzionale (cellule immunitarie della parete intestinale).

Alcuni studi dimostrano come i batteri probiotici svolgono un importante ruolo nella prevenzione di alterazioni della permeabilità paracellulare (Caplan *et al.*, 1999; Isolauri *et al.*, 1993).



Gli effetti positivi dei probiotici sulla funzionalità intestinale in parte possono essere dovuti ad un'azione trofica sulla mucosa del colon (Ichikawa *et al.*, 1999).

E' stato dimostrato che ceppi di lattobacilli e bifidobatteri sono in grado di unirsi al muco intestinale senza degradarlo inibendo l'adesione di batteri enteropatogeni al muco (Jin *et al.*, 2000).

Sulla barriera funzionale dell'intestino, tali probiotici hanno una serie di azioni, elencate sinteticamente come segue:

- i microrganismi intestinali, sono necessari per lo sviluppo del sistema immunitario dell'intestino come i linfociti epiteliali intestinali e le cellule produttrici di IgA. Le IgA secretorie, attivamente prodotte dall'intestino, giocano un ruolo centrale nell'immunità locale e hanno un ruolo significativo nel creare una barriera contro l'infezione da batteri patogeni o virus. I batteri probiotici giocano un' importante ruolo incrementando le IgA secretorie (Bautista *et al.*, 2001; Fukushima *et al.*, 1998). Alcuni dati indicano che i probiotici sono anche capaci di modulare la produzione di IgE e di citochine (Haller *et al.*, 2000).

- Per alcuni batteri, sono state dimostrate anche proprietà antiossidanti; infatti *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 e *L. acidophilus* ATCC 4356 sono capaci di eliminare radicali liberi (Lin e Chang, 2000).

- Miglioramento della digeribilità del lattosio nei soggetti con insufficienza della lattasi (de Vrese *et al.*, 2001).

Altra importante caratteristica dei probiotici è quella di ridurre i tempi di recupero negli episodi di diarrea e di essere coadiuvanti nelle diarree croniche.

Per i microrganismi probiotici selezionati come starter, deve essere presa in considerazione una delle caratteristiche più rilevanti, la capacità di produrre acidità.

I probiotici sono spesso inappropriati come organismi starter; l'ambiente del tratto gastrointestinale (il normale ambiente dei probiotici) è abbastanza diverso da quello di una matrice alimentare. Alcuni elementi fondamentali per la crescita dei batteri probiotici come antiossidanti, minerali o vitamine possono essere aggiunti alla matrice alimentare. Tuttavia, devono essere considerati diversi aspetti tecnologici, tra cui il conferimento di buone proprietà sensoriali al prodotto, resistenza ai fagi, stabilità nel prodotto e durata di conservazione (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002).

In generale, le tecniche usate nei processi industriali possono influenzare significativamente la funzionalità dei probiotici (Mattila-Sandholm *et al.*, 2002). I batteri probiotici, in alcuni casi, vengono usati come starter ad una concentrazione critica che non garantisce la loro funzionalità ( $10^7$  ufc/gr o ml in accordo con i consensi internazionali) ma che invece è la concentrazione adatta all'uso come starter.

Tuttavia, alcuni ceppi (specialmente appartenenti al gruppo dei *Lact. casei* e *Lact. plantarum*) sono capaci di crescere su substrati lattici ed esercitano il ruolo di starter probiotici. In questi casi, i probiotici, oltre al beneficio funzionale, svolgerebbero una funzione tecnologica, rappresentando una valida strategia per superare le barriere imposte dal drastico cambio di condizioni ambientali.

*Lact. plantarum* è un batterio lattico versatile, che può essere trovato in una vasta gamma di nicchie ambientali e può essere usato come starter nella produzione di formaggi, carne e una larga quantità di prodotti fermentati vegetali. Si trova normalmente nel tratto

gastrointestinale umano ed è stato dimostrato sicuro per il consumo umano e capace di esercitare effetti probiotici sul consumatore (de Vries *et al.*, 2006). Diverse applicazioni di *Lact. plantarum* coinvolgono la fermentazione di substrati vegetali (de Vries *et al.*, 2006) e si ritrova come componente starter (combinato con altri microrganismi) in un cospicuo numero di prodotti tradizionali caseari come formaggi e diversi tipi di latte fermentato (Ercolini *et al.*, 2003; De Angelis *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2008). E' importante che, diversi ceppi di *Lact. plantarum* siano stati testati per i loro effetti sulla salute umana. Per queste ragioni, *Lact. plantarum* emerge come specie di grande interesse per lo sviluppo di nuovi alimenti funzionali, basati sul potenziale probiotico e sulla caratteristica non trascurabile di adattabilità e versatilità in differenti substrati alimentari (de Vries *et al.*, 2006).

Altri microrganismi con dimostrate proprietà probiotiche ed abilità nel crescere in prodotti caseari sono specie appartenenti al gruppo dei *Lact. casei* (*Lact. casei*, *Lact. paracasei* e *Lact. rhamnosus*).

In ogni caso, come in tutti i processi di fermentazione che coinvolgono ceppi probiotici, devono essere ricercate le seguenti caratteristiche: idoneità tecnologica e benefici per la salute. Il ceppo probiotico deve soddisfare non solo il criterio di buona sopravvivenza, ma anche il criterio di fermentazione ed interazione armoniosa con le altre specie batteriche coinvolte.

Almeida *et al* (2008) hanno lavorato sui tassi di acidificazione di diversi ceppi probiotici (*Lact. delbrueckii* subsp *bulgaricus*, *Lact. acidophilus*, *Lact. rhamnosus* e *B. animalis* subsp *lactis*) in co-culture con *Strep. thermophilus*, per la produzione di una bevanda probiotica dal siero derivante dalla lavorazione del formaggio "Brasiliano".

In generale, il tempo di fermentazione è molto variabile (da 3 a 12 ore) e dipende dalle co-culture. Un lungo periodo di fermentazione è stato osservato nella co-cultura *Lact. rhamnosus-Strep. thermophilus*, mentre, è stata osservata un'acidificazione veloce, nella co-cultura *B. animalis* subsp *lactis-Strep. thermophilus*.

Il formaggio rappresenta una matrice alimentare veramente molto interessante per l'incorporazione di batteri probiotici.

In Argentina, il *Lact. casei* usato come starter, è stato capace di moltiplicarsi (da 1 a 1,5 log) nel formaggio probiotico Fresco (Vinderola *et al.*, 2000), durante il periodo di stagionatura ed anche nel periodo di stoccaggio in condizioni di refrigerazione. In questo contesto, questo ceppo probiotico potrebbe agire come uno starter secondario e controllare la flora di LAB non starter ed essere una coltura funzionale. In modo simile, altri lattobacilli (*Lact. plantarum*, *Lactobacillus fermentum* e *Lact. rhamnosus*) possono essere usati nella caseificazione per la loro duplice attitudine: starter probiotico e starter secondario. In generale, queste specie acidificano lentamente nel latte e mostrano attività proteolitica moderata, ma possono essere capaci di essere presenti in numero considerevole nel formaggio durante la stagionatura come risultato della loro attività peptidolitica. Come conseguenza, i formaggi contenenti ceppi di lattobacilli probiotici mostrano un certo miglioramento dell'intensità di aroma (Bude Ugarte *et al.*, 2006; Briggiler Marco *et al.*, 2007) in aggiunta ai risultati dei benefici sulla salute.

Negli esempi precedenti, i ceppi probiotici sono combinati con colture starter dello yogurt, per permettere la produzione di prodotti fermentati con proprietà nutrizionali e sensoriali superiori. I componenti tradizionali dello yogurt, *Strep thermophilus* e *Lact delbrueckii* subsp

*bulgaricus*, non fanno normalmente parte della microflora indigena dell'intestino dei mammiferi e mostrano, in generale, limitata sopravvivenza dopo l'ingestione orale. Tuttavia, specie di LAB starter (*Strep thermophilus*, *Lact delbrueckii* or *Lact helveticus*) sono adesso considerate come microrganismi con potenziale probiotico. Recenti studi hanno mostrato che questi organismi possono rilasciare enzimi come  $\beta$ -galattosidasi, che migliorarono la digestione di nutrienti nell'intestino e contribuiscono al normale sviluppo del sistema immunitario della mucosa intestinale (de Moreno e Perdigon, 2005; Guarner *et al.*, 2005). Il potenziale ruolo probiotico di *Lact. delbrueckii* non è stato ancora dimostrato e sono necessari ulteriori studi per identificare gli effetti benefici sulla salute dell'ospite di ceppi individuali. Recentemente, l'abilità di attivare la risposta immunitaria della mucosa intestinale (nello specifico la produzione di cellule IgA) è stato riportato per diversi ceppi di *Lact delbrueckii* e loro mutanti spontanei fago-resistenti (Guglielmotti *et al.*, 2007). Sono state inoltre riportate, per gli stessi ceppi, proprietà tecnologiche adeguate (Guglielmotti *et al.*, 2006, 2007b). Tutte queste caratteristiche, aggiunte alla loro provata fago-resistenza, evidenziano il potenziale di questi ceppi come starter probiotici per il loro uso industriale nei cibi funzionali.

In conclusione, anche se la caratteristica più importante dei batteri probiotici è il loro contributo per la salute dell'ospite, la valutazione del loro comportamento tecnologico dovrebbe essere un parametro chiave per la selezione razionale di ceppi adeguati per le applicazioni alimentari. Per i LAB starter, la determinazione delle loro performance tecnologiche dovrebbe precedere la ricerca del loro potenziale probiotico. Chiaramente, batteri lattici che mostrano entrambi le

proprietà desiderate, sono sicuramente interessanti per l'eventuale uso nei vari prodotti caseari.

## 1.7 Le colture “protettive”

Le colture dette “protettive”, sono colture di batteri lattici che mostrano specifiche attività antimicrobiche contro batteri patogeni e/o alteranti.

I LAB producono sostanze antimicrobiche naturali tra cui acidi organici, diossido di carbonio, perossido di idrogeno, diacetile, etanolo e proteine (o batteriocine) e, per questa ragione, possono aiutare a combattere la contaminazione microbica.

Sia gli SLAB che NSLAB possono essere usati come colture protettive. Il loro impiego nelle produzioni casearie può dipendere dai microrganismi target, dal tipo di prodotto e dallo spettro di attività delle sostanze antimicrobiche prodotte. Tra l’ampia gamma di antimicrobici prodotti dai LAB, le batteriocine sono le più studiate anche nella possibile loro applicazione in questi prodotti.

Le batteriocine prodotte dai LAB, sono peptidi a basso peso molecolare che esplicano un’azione antibatterica verso batteri Gram + ma, occasionalmente, anche verso microrganismi Gram-, agendo direttamente a livello di membrana (Bruno, *et al.*) perché sono appunto “membrana-attive”.

La nisina prodotta da *L. lactis* è la batteriocina più studiata ed utilizzata, sono note altre batteriocine prodotte dai LAB (specialmente quelle prodotte da *Strep. thermophilus*, *Strep. macedonicus* ed enterococchi) che potrebbero essere utilizzate nel formaggio (Grattepanche *et al.*, 2008).

Diversi studi hanno dimostrato il potenziale delle batteriocine nel controllo della crescita di batteri patogeni e/o alteranti nel formaggio. Alcune di tali ricerche, hanno valutato la possibile applicazione di

batteriocine prodotte dai LAB, per il controllo di *Listeria monocytogenes* e la prevenzione di gonfiori tardivi nel formaggio a causa di contaminazione da clostridi (Grattepanche *et al.*, 2008). Ceppi di *Lact. curvatus*, *Lact. plantarum* e *Lact. rhamnosus* producono batteriocine attive contro clostridi, *Staphylococcus aureus*, e *Listeria spp* (Chamba e Irlinger, 2004).

La produzione di composti inibenti e batteriocine può, anche essere problematica, dato che per esempio, i ceppi produttori di batteriocine inclusi con lo starter primario possono inibire altre componenti starter.

*Lact. casei* e *Lact. rhamnosus* producono acetato e piccole quantità di diacetile dal citrato interferendo negativamente con la crescita di *Propionibacterium freudenreichii* nel formaggio svizzero (Chamba e Irlinger, 2004).

L'uso di ceppi produttori di batteriocine potrebbero aumentare i problemi di sicurezza, come nel caso degli enterococchi. La potenziale patogenicità degli enterococchi per l'uomo, accentuata dalla loro resistenza a una vasta gamma di antibiotici (Moellering, R. C.1992, Murray, B. E. 1990), costituisce causa di dibattito sul rischio del loro impiego nella tecnologia casearia come colture aggiunte protettive, probiotiche e starter (Giraffa *et al.*, 1997), nonostante alimenti contenenti enterococchi si siano dimostrati da lungo tempo sicuri per il consumatore.

I ceppi produttori di batteriocine aggiunti come starter devono anche mostrare buona crescita in latte e formaggio. La selezione e l'isolamento di ceppi competitivi produttori di batteriocine da ambienti caseari e la messa a punto di un corretto starter con bassa sensibilità alle



batteriocine sono dei prerequisiti per il loro corretto impiego come colture protettive.

## **1.8 Metabolismi dei batteri lattici coinvolti nella produzione e maturazione del formaggio**

### **1.8.1 Glicolisi**

La primaria funzione di ogni cultura starter, nel processo di produzione del formaggio, è la fermentazione del lattosio in acido L-lattico.

La produzione di acido è un fattore critico per il controllo della qualità del formaggio, determinando la cultura, il pH finale ed il contenuto in minerali della cagliata, che a sua volta influenza la struttura delle proteine e la quantità residua di coagulante nella cagliata, e, quindi, le caratteristiche di consistenza e sapore della stessa.

Il Lattato è di per sé anche un componente del gusto del formaggio, per esempio, nel formaggio tipo svizzero serve come nutriente fondamentale per i batteri propionici, i quali lo convertono in acido propionico, altro importante componente del flavour, e CO<sub>2</sub> che conferisce al formaggio la sua occhiatura.

Il rapido consumo da parte degli starter del lattosio residuo nella cagliata, aiuta a prevenire la crescita di batteri contaminanti indesiderati che utilizzano il lattosio come substrato di crescita, come per esempio, i batteri etero fermentanti che possono provocare gravi difetti di sapore e texture (Broadbent e Steele, 2005). La degradazione del lattosio avviene ad opera dei batteri lattici presenti nel latte e degli starter aggiunti durante il processo di produzione dei formaggi.

Il primo step della degradazione del lattosio riguarda il suo trasporto dentro la cellula; i sistemi di trasporto del lattosio sono essenzialmente due: il primo vede la fosforilazione del lattosio durante il

suo passaggio attraverso la membrana citoplasmatica; il gruppo fosfato viene ceduto dal fosfoenolpiruvato, molecola che si forma durante la glicolisi e, per questo motivo, tale meccanismo prende il nome di sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferasi (PEP-PTS). Sono coinvolte inoltre quattro proteine: una di queste (EII), che si trova nella membrana citoplasmatica, ha il compito di trasportare il lattosio dall'esterno della cellula all'interno, mentre la seconda (EIII), situata nel citoplasma, fosforila la molecola producendo il lattosio-P; le altre due (EI e HPr) sono proteine citoplasmatiche non specifiche, che trasferiscono il gruppo fosfato dal fosfoenolpiruvato (PEP) all'EIII.

Il secondo sistema di trasporto coinvolge alcune proteine citoplasmatiche, dette permeasi, che trasportano il lattosio all'interno della cellula senza alcuna modificazione chimica; esse sono situate nella membrana citoplasmatica e, insieme al lattosio, trasportano anche protoni derivanti dall'idrolisi di ATP.

Alcuni ceppi termofili non sono in grado a questo punto, di idrolizzare il galattosio e quindi, una trans membrana permeasi trasporta contemporaneamente una molecola di lattosio all'interno della cellula e una di galattosio all'esterno; in questo modo, l'energia generata attraverso l'uscita di galattosio supporta l'entrata di lattosio.

Il lattosio-P che ora si trova all'interno della cellula, viene degradato da una fosfo $\beta$ galattosidasi in glucosio e galattosio-6-fosfato; il glucosio viene convertito in glucosio-6-fosfato. Nei lattococchi, il glucosio-6-fosfato viene metabolizzato attraverso la via glicolitica o grazie alla via metabolica di Embden-Meyerhof (EM), mentre il galattosio-6-fosfato entra nella via metabolica del tagatosio. Attraverso queste vie metaboliche si arriva alla produzione di gliceraldeide-3-P grazie all'azione di enzimi aldolasi e l'unico prodotto finale è l'acido

lattico; quindi, questo processo prende il nome di fermentazione acido lattica omofermentante, in cui una mole di lattosio si trasforma in quattro moli di acido lattico.

Nei batteri termofili, in cui avviene l'espulsione di galattosio, si producono solo due moli di acido lattico.

Per quanto riguarda ceppi appartenenti alle specie *Leuconostoc* e lattobacilli, il galattosio viene trasformato in glucosio-1-P attraverso la via di Leloir, mentre il glucosio viene degradato nella via fosfochetolasica. Attraverso l'azione dei due enzimi fosfochetolasi e glucosio-6-P deidrogenasi, si arriva alla conversione di 6-P-gluconato a CO<sub>2</sub> e pentoso-5-P, che a loro volta portano alla formazione di gliceraldeide-3-P e acetil-P; quest'ultimo viene convertito in etanolo, mentre la gliceraldeide-3-P in acido lattico attraverso la via glucolitica. In questo caso si parla di fermentazione acido lattica eterofermentante.

Nella figura n.1 è mostrata la via metabolica del lattato. I principali prodotti del metabolismo del lattosio sono l'L- e D-lattato o una miscela racemica di entrambi, anche se alcuni ceppi producono altri prodotti, come l' etanolo (Vedamuthu,1994).

*S. thermophilus* non è in grado di metabolizzare la molecola galattosio del lattosio e deve crescere con microrganismi galattosio-positivi (Gal +) (ad esempio, Lactobacilli Gal +), o galattosio si accumulerà nella cagliata (Mcsweeny e Sousa, 2000). La produzione di D-lattato durante la maturazione, è probabilmente maggiore nei formaggi prodotti con latte crudo, ma, per quanto ne si è consapevoli, ad ora, solo pochi studi hanno indagato a tale riguardo (Steffen, 1971; Steffen 1980). La racemizzazione del lattato ha uno scarso impatto sul sapore, ma può avere conseguenze nutrizionali indesiderate, in particolare per i neonati. La solubilità del Ca-D-lattato è inferiore a quella del Ca-L-lattato, ed il

Ca-D-lattato può cristallizzare nel formaggio formando macchie bianche, in particolare sulle superfici di taglio (Fox *et al.*,1990). Il prodotto finale della fermentazione del lattosio, il lattato, può essere catabolizzato ulteriormente da alcuni NSLAB. Per esempio, è stato visto che alcuni lattobacilli e pediococchi isolati dal formaggio Cheddar, possono ossidare il lattato ad acetato e CO<sub>2</sub> in condizioni aerobiche, e questo sistema di ossidazione del lattato nei lattobacilli e pediococchi del formaggio è operativo nelle condizioni di maturazione del formaggio Cheddar (Thomas, 1986; Thomas, 1987). Inoltre, in presenza di O<sub>2</sub>, alcuni membri di NSLAB, in particolare pediococchi, possono ossidare il lattato a formiato ed acetato. In alcuni formaggi duri, dalla glicolisi possono formarsi prodotti negativi: gonfiore tardivo e off-flavour risultano dal metabolismo del lattato (o del glucosio) in acido butirrico e CO<sub>2</sub> da parte di *Clostridium spp.* (Fox *et al.*,1993). Questi difetti possono essere evitati con una buona igiene, l'aggiunta di NO<sub>3</sub><sup>-</sup> o lisozima, o mediante l'eliminazione fisica delle spore per bactofugazione o microfiltrazione.

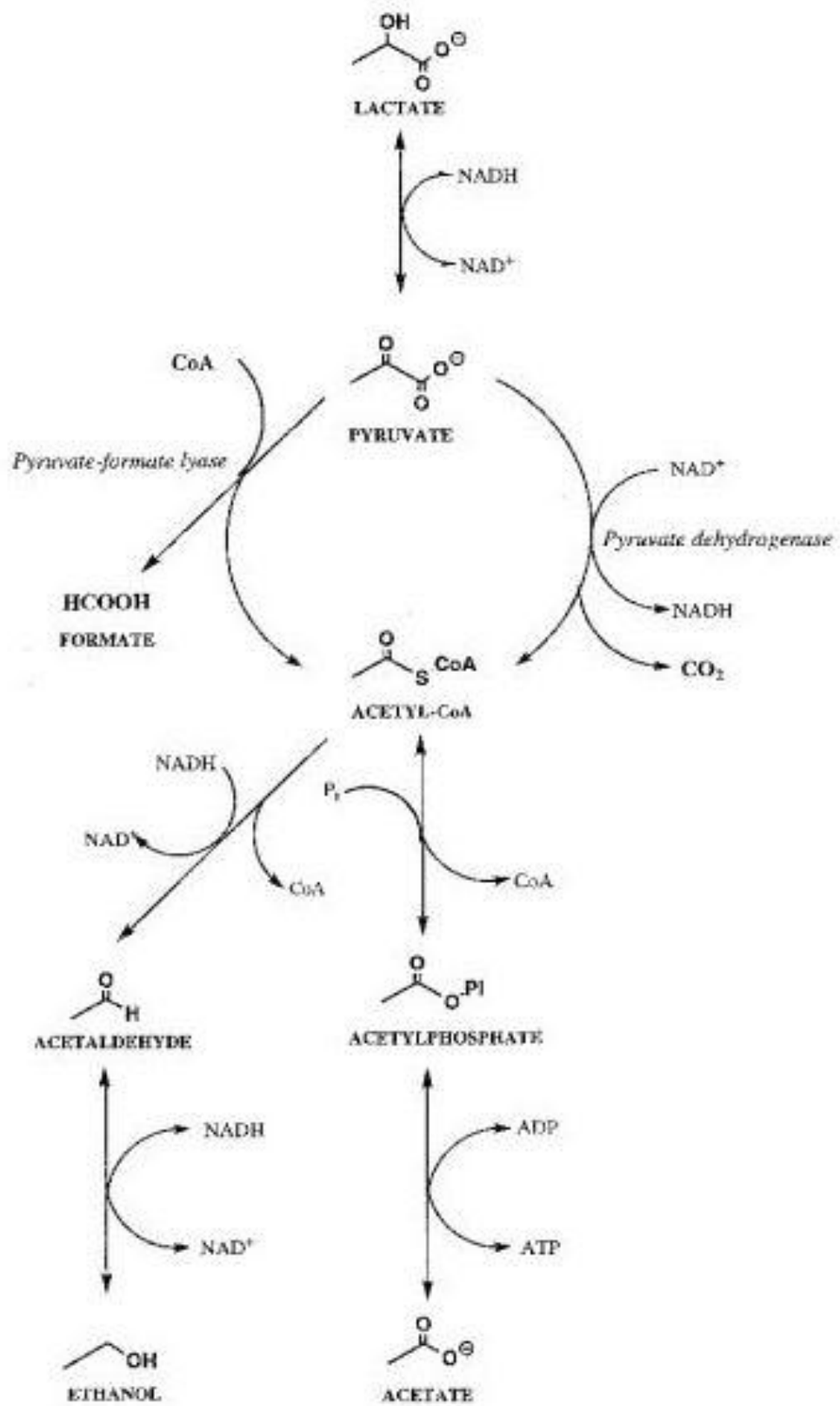


Fig. n.1 Metabolismo del lattato (McSweeney & Sousa, 2000).

## 1.8.2 Catabolismo del citrato

I LAB possono utilizzare il citrato per la produzione di succinato o diacetile. Il citrato viene trasportato nella cellula da una citrato permeasi ed inizialmente, grazie all'azione di una citrato-liasi, è idrolizzato ad acetato, CO<sub>2</sub> e piruvato; successivamente, il diacetile può essere formato a partire da piruvato via  $\alpha$ -acetolattato, attraverso la condensazione di acetaldeide attiva e un'altra molecola di piruvato. L' $\alpha$ -acetolattato, inoltre, può essere decarbossilato portando alla formazione di acetoino; l' $\alpha$ -acetolattato è una molecola instabile che, a bassi valori di pH, può essere decarbossilata non enzimaticamente ad acetoino, mentre in presenza di ossigeno, può essere trasformata in diacetile.

Il succinato, un composto con proprietà promuoventi il flavour simili al glutammato monosodico, è stato isolato da diverse varietà di formaggi, studi sul profilo sensoriale suggeriscono che contribuisce al sapore di salato nel formaggio tipo svizzero ed al sapore pieno, affinato nel formaggio Cheddar. In formaggi tipo svizzero, dove il *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* raggiunge cariche elevate, la produzione di succinato è attribuito al catabolismo dell'acido aspartico da parte dei batteri propionici. Nel formaggio Cheddar ed altre varietà, tuttavia, i NSLAB producono succinato a partire dal citrato attraverso la via della riduzione degli acidi tricarbossilici. Un altro importante componente del flavour, derivato dal citrato, il diacetile, conferisce una nota di "burrosità", la cui importanza nel burro, latticello, ed alcuni tipi di formaggio, è stata riconosciuta per decenni.

Il diacetile si forma dalla decomposizione ossidativa dell' $\alpha$ -acetolattato, un prodotto intermedio nei percorsi del metabolismo del piruvato e della biosintesi degli amminoacidi. Negli ultimi anni, la

conoscenza dettagliata del metabolismo del citrato e della produzione di diacetile, ha prodotto efficaci strategie per l'ingegneria dei ceppi di *L. lactis* per aumentare la produzione di diacetile (Broadbent e Steele, 2005) (Fig n. 2).

Il citrato è una sostanza presente nel latte, con una quantità di circa 1,5 g/l, la maggior parte del quale si perde nel siero durante la caseificazione, dato che il 94% del citrato è insolubile nel latte; tuttavia, il basso livello di citrato che rimane nella cagliata (circa 2 g/ Kg) è importante, in quanto la sua metabolizzazione ad opera di starter mesofili appartenenti alle specie *Leuconostoc* e lattococchi Cit + e di alcuni lattobacilli mesofili della microflora NSLAB (Mc Sweeney e Sousa, 2000), porta alla formazione di composti volatili importanti per lo sviluppo di aromi nel prodotto finito. Il citrato non viene metabolizzato dallo *S. thermophilus* né dai lattobacilli termofili.

I microrganismi in grado di metabolizzare il citrato, lo co-metabolizzano insieme al lattosio o ad altri zuccheri e lo possono utilizzare come fonte di energia. Le condizioni richieste per l'utilizzazione del citrato dal *Lactobacillus casei* ATCC334 sono state recentemente studiate da Díaz-Muñiz e Steele (2006).

Il citrato è stato utilizzato da questo microrganismo come una fonte di energia in un terreno modificato, in presenza unicamente di limitate concentrazioni di galattosio. La presenza di glucosio ha inibito l'utilizzo del citrato da parte di questo microrganismo, anche quando è stato aggiunto in basse concentrazioni. Tale risultato spinge a presupporre che il *Lb. casei* utilizza il citrato come fonte di energia, durante la stagionatura del formaggio, solo quando i livelli residui dei carboidrati, dopo la fermentazione, sono limitati (<2,5 mM), ed il lattosio o il glucosio sono assenti.



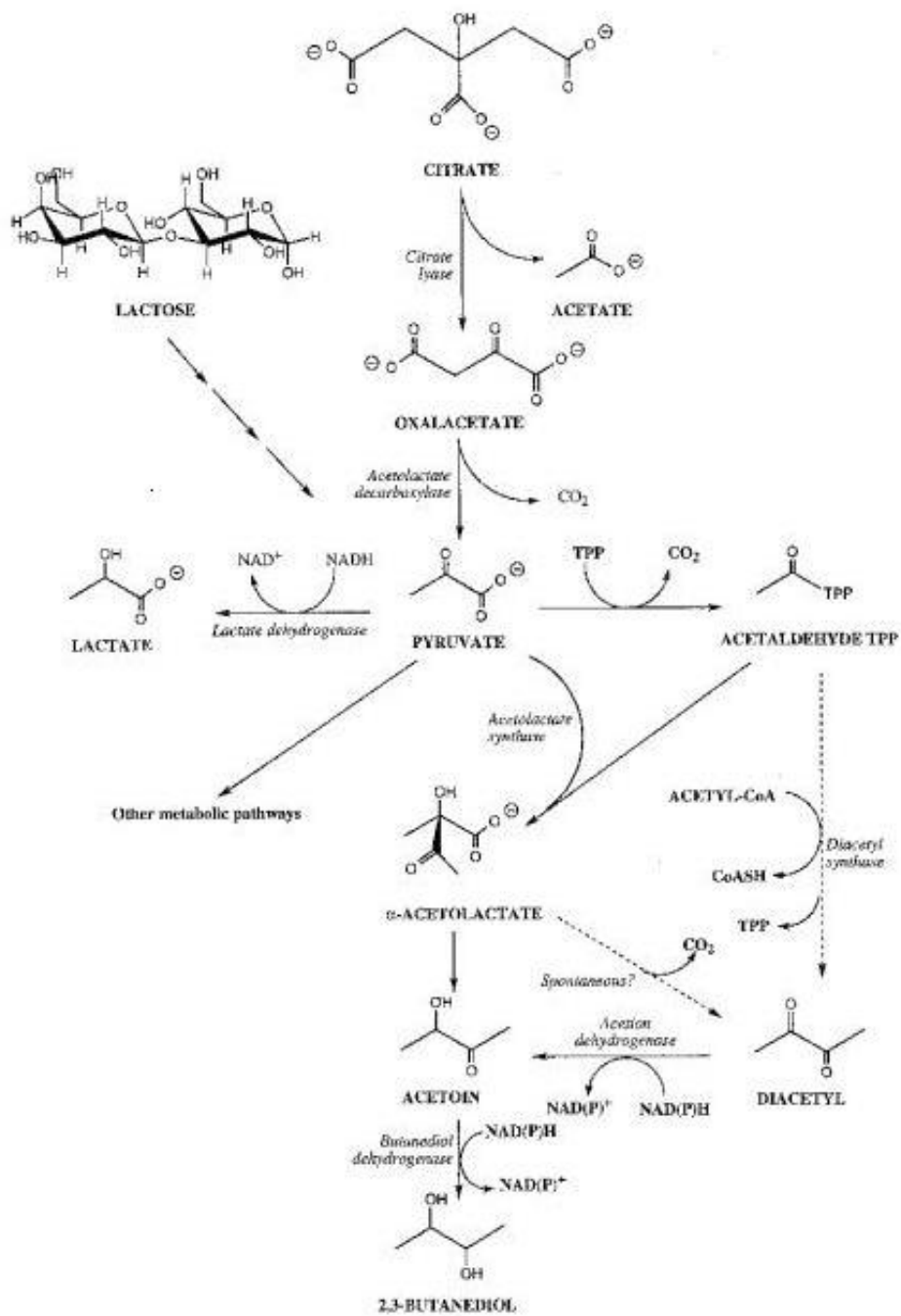


Fig. n.2 Metabolismo del citrato (McSweeney & Sousa, 2000)

### 1.8.3 Lipolisi

I prodotti principali del processo di lipolisi sono gli acidi grassi liberi (FFA): questi derivano dall'attività di lipasi od esterasi sui grassi del latte, influenzando direttamente sul sapore del formaggio, oltre che avere ulteriori effetti servendo come precursori di esteri ed altri composti aromatici. L'esterasi e le lipasi catalizzano l'idrolisi o la sintesi degli esteri, in funzione dell'attività dell'acqua del formaggio e dei livelli degli altri acidi grassi ed alcoli disponibili.

Gli aromi conferiti dagli FFA dipendono molto dalla loro concentrazione e dalla soglia di percezione e, quindi, possono contribuire positivamente oppure conferire al formaggio dei difetti apportando un gusto rancido (Yvonne *et al.*, 2003).

Generalmente, gli FFA a lunga catena, cioè con un numero di atomi di carbonio superiore a dodici, a causa della loro alta soglia di percezione, non danno un significativo contributo alla formazione di aromi; mentre gli acidi grassi a media e corta catena (C4:0 – C12:0) avendo una soglia di percezione più bassa, conferiscono alcune tipiche note aromatiche. Per esempio, l'acido esanoico ha una nota aromatica pungente, tipica dei formaggi con muffa mentre l'acido butanoico può contribuire all'aroma rancido e di formaggio.

Gli FFA sono molto importanti per lo sviluppo di aromi in diversi tipi di formaggi, come il Parmigiano, il Provolone e il Romano (Aston & Dulley, 1982); quest'ultimo contiene la più alta concentrazione di FFA e quindi mostra gli aromi più forti da essi conferiti, mentre formaggi con un basso contenuto di FFA, come ad esempio la mozzarella, sono caratterizzati da aromi delicati. Acidi grassi liberi come il butanoico, il propanoico e l'etanoico sono importanti nel formaggio Svizzero, mentre

l'acido 4-etilottanoico, conferisce una nota aromatica caratteristica di capra e montone nei formaggi prodotti con latte di capra e di pecora; inoltre, gli FFA sono importanti precursori di composti aromatici in formaggi della Nuova Zelanda (Lawrence, 1967). Nel formaggio Emmental sono stati rilevati quattordici diversi esteri (Rychlik *et al.*, 1997), esteri che sono stati ritenuti importanti anche nella determinazione del sapore del formaggio PR (Meinhart e Schreier, 1986). I più abbondanti dei 38 esteri individuati nel formaggio PR sono l'etil-butanoato, l'etil-esanoato, l'etil-acetato ed il metil-esanoato (McSweeney *et al.*, 1997).

La lipolisi porta alla formazione, oltre che agli acidi grassi liberi, di altri composti: i metilchetoni, i lattoni, gli esteri e gli alcoli secondari.

I metil-chetoni sono importanti soprattutto nei formaggi a muffa blu, in particolare l'eptan-2-one e il nonan-2-one, presenti anche nel formaggio Camembert (Molimard & Spinnler, 1996). I metil-chetoni ottan-2-one, nonan-2-one, decan-2-one, undecan-2-one e tridecan-2-one conferiscono un aroma fruttato, floreale e di stantio, mentre l'eptan-2-one ha l'aroma tipico del formaggio a muffa blu. Inoltre, i metil-chetoni con aroma di funghi e di stantio contribuiscono in maniera significativa all'aroma del formaggio Camembert (Molimard & Spinnler, 1996).

Non solo i metil-chetoni, ma anche i lattoni possiedono note aromatiche molto forti; infatti, essi possono contribuire con una nota burrosa, caratteristica di alcuni formaggi (Dirinck & De Winne, 1999). Alcuni lattoni sono stati identificati nel formaggio Cheddar, come  $\delta$ -C10,  $\delta$ -C12,  $\delta$ -C14,  $\delta$ -C15,  $\delta$ -C16,  $\delta$ -C18,  $\delta$ -C12,  $\delta$ -C14 e  $\delta$ -C16 e la loro concentrazione è correlata con l'età del formaggio e con l'intensità aromatica (O'Keefe *et al.*, 1969; Wong *et al.*, 1975). I  $\delta$ -lattoni sono caratterizzati da una forte nota aromatica fruttata di pesca,

albicocca e noce di cocco e una bassa soglia di percezione (Dufossé *et al.*,1994). Essi sono stati analizzati in diversi formaggi, come l'Emmental e il Gouda (Dirinck & De Winne, 1999); quest'ultimo è risultato più ricco di  $\delta$ -decalattoni e  $\delta$ -dodecalattoni e il suo aroma burroso è stato attribuito alle alte concentrazioni di questi composti.

Anche gli esteri possono contribuire all'aroma di diversi formaggi, come il Parmigiano e il Groviera, nei quali sono stati identificate alte concentrazioni di etil-butanoato responsabile di una nota aromatica fruttata. Questo aroma fruttato, tipico degli esteri, risulta indesiderabile in altri formaggi, i tioesteri possono conferire un aroma "di formaggio", burroso o fruttato; nel Cheddar, i tioesteri, formati dalla reazione di esteri di acidi grassi a corta catena con metionale, contribuiscono al tipico aroma cosiddetto "di formaggio".

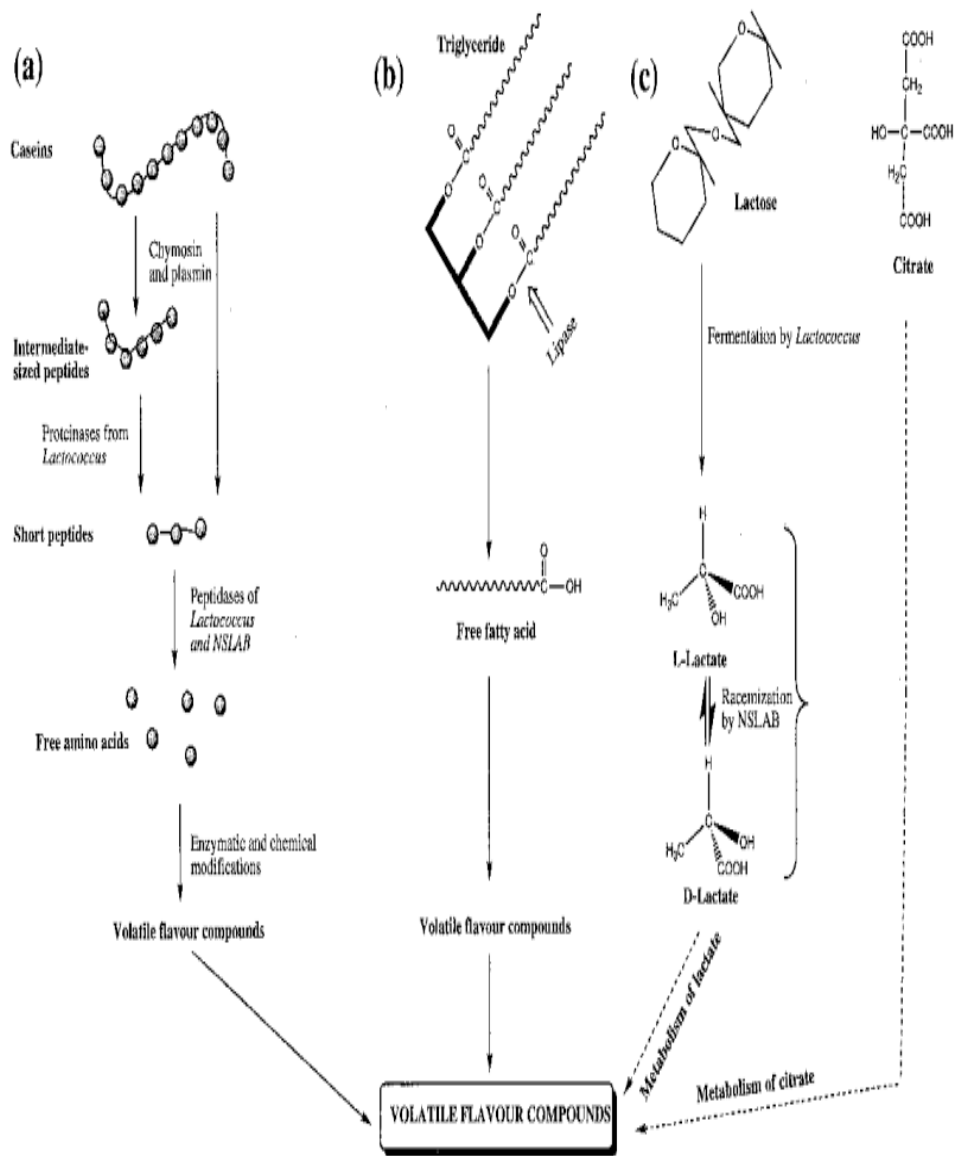
Infine, anche gli alcoli secondari partecipano alla formazione di aromi nel formaggio. Infatti, il propan-2-olo, il butan-2-olo, l'octan-2-olo e il nonan-2-olo sono presenti in alte quantità in formaggi morbidi come i formaggi a muffa blu, mentre l'eptan-2-olo e il nonan-2-olo sono stati ritrovati nel Camembert insieme al oct-1-an-3-olo, al quale è da attribuire un tipico odore di funghi ed è sicuramente uno dei composti principali dell'aroma di questo formaggio. Gli enzimi coinvolti in queste reazioni possono provenire dal caglio, dal latte stesso, e dai SLAB o NSLAB. E' ben chiaro, per esempio, che lipasi pregastrica ed esterasi provenienti da ruminanti, sono responsabili del forte sapore a base di acidi grassi che caratterizza alcuni formaggi italiani. In formaggi come il Parmigiano Reggiano in cui non si utilizzano lipasi pregastriche ed esterasi, tuttavia, note aromatiche associate a lipolisi sono probabilmente dovute ad enzimi indigeni del latte e dei batteri. La maggior parte dei LAB sono privi di attività lipolitica ed hanno una bassa attività estero

litica, ma nel formaggio a lunga maturazione, queste cellule microbiche possono produrre sufficienti quantità di acidi grassi liberi ed esteri per influenzare il sapore (Broadbent e Steele, 2005).

I sistemi lipasi / esterasi dei batteri starter hanno ricevuto molta meno attenzione dei loro sistemi proteolitici. *Lactococcus spp.* sono solo debolmente lipolitici, ma i lattococchi possono essere responsabili della liberazione di elevate quantità di FFA, quando presenti in elevate cariche o in stagionature prolungate. Sono stati studiate le lipasi / esterasi dei ceppi di *Lactococcus*, che sembrano essere intracellulari (Fox *et al*, 1993), così come quelle dei Lactobacilli omofermentatni obbligati utilizzati come starter (*Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii subsp. Lactobacillus bulgaricus e delbrueckii subsp. lactis*) (Khalid e Marth, 1990). I Lattobacilli eterofermentanti facoltativi (ad esempio, *Lb. Casei*, *Lactobacillus paracasei e Lactobacillus plantarum*) che dominano la flora NSLAB di molte varietà di formaggi, sono debolmente lipolitici. così come i generi *Micrococcus* e *Pediococcus* sono debolmente lipolitici (Bhownik e Marth, 1990).

In generale, i LAB, contribuiscono relativamente poco alla lipolisi, ma culture aggiuntive, come colture di muffe, spesso hanno elevate attività nella conversione dei grassi (Molimard e Spinnler, 1996).

Nella figura n. 3 sono riportati i principali meccanismi biochimici che avvengono durante la maturazione del formaggio (McSweeney & Sousa, 2000).



**Figura n. 3 Principali meccanismi biochimici durante l'affinamento (McSweeney & Sousa, 2000).**

#### 1.8.4 Proteolisi

La proteolisi e le sue reazioni secondarie svolgono un ruolo importante nei formaggi stagionati, rendendo l'idrolisi della caseina ed i suoi rapporti con lo sviluppo del sapore, un'area d'intenso interesse per la ricerca da decenni.

L'idrolisi della caseina integra è quasi esclusivamente catalizzata dal coagulante (ad esempio, chimosina) e dalle proteinasi endogene del latte (per esempio, plasmina), mentre le proteinasi e le peptidasi dei LAB sono responsabili della produzione di peptidi ed aminoacidi liberi, solubili in acqua. La proteolisi primaria e secondaria della caseina, insieme, influenzano il sapore del formaggio in almeno tre modi significativi:

- In primo luogo, la rottura della rete di caseina ammorbidisce la texture del formaggio, che facilita il rilascio di composti aromatici quando lo stesso è consumato.

- In secondo luogo, alcuni peptidi a basso peso molecolare prodotti in queste reazioni, influiscono direttamente sul sapore potendo essi riportare particolari gusti di dolce, amaro o maltato. I peptidi non alterano il gusto del formaggio, a meno che non avvenga un forte squilibrio nel processo di proteolisi, che potrebbe in tal caso portare alla formazione di un eccesso di peptidi amari, i quali andrebbero ad alterare la percezione dell'aroma finale del formaggio. La parte C-terminale della  $\beta$ -caseina, chiamata C-peptide, è responsabile del gusto amaro che si può ritrovare nel formaggio Gouda. Proprio per questo motivo, sono state selezionate diverse culture di ceppi starter con un'elevata abilità di degradazione dei peptidi dal gusto amaro.

- In terzo luogo, anche il rilascio di amminoacidi liberi può influenzare direttamente il sapore. I peptidi entrano all'interno della cellula grazie a un sistema di trasporto, e vengono attaccati dalle numerose peptidasi intracellulari dei LAB con il conseguente rilascio di amminoacidi liberi. Il successivo metabolismo di questi ultimi porta alla formazione di diversi composti aromatici, importanti per l'aroma del prodotto finito, come aldeidi, alcoli, acidi, esteri e vari composti solforici. Queste reazioni sono di particolare interesse perché, sempre maggiori evidenze, indicano che la conversione degli amminoacidi liberi in composti aromatici da parte dei LAB è il fattore limitante nello sviluppo dell'aroma dei formaggi stagionati.

I prodotti del catabolismo degli amminoacidi, che può avvenire tramite decarbossilazione, deaminazione, transaminazione, desulfurazione, o rimozione della catena laterale, può determinare sapori desiderabili o indesiderabili.

Gran parte della ricerca sul catabolismo degli amminoacidi da parte dei LAB è stata focalizzata sul destino della catena ramificata degli amminoacidi contenenti zolfo, a causa del loro ruolo chiave nell'aroma. Per esempio, si ritiene che la conversione della metionina in composti solforati volatili come metanetiolo, solfuro di idrogeno, dimetil- solfuro e trimetil-solfuro contribuisca allo sviluppo di aromi sulfurei di molti tipi di formaggio, mentre la rottura della leucina è la probabile fonte di un desiderabile sapore di nocciola nel formaggio Cheddar.

Al contrario, la rottura di amminoacidi aromatici contribuisce allo sviluppo di vari derivati indesiderabili come indolo, scatolo, [para]-cresolo, e fenil - acetaldeide fenil responsabili di "off-flavours" nel formaggio (Broadbent e Steele, 2005).





L'assorbimento dei peptidi avviene attraverso sistemi di trasporto degli oligopeptidi (sistema Opp) e trasportatori di-/tri-peptidi. Inoltre, sono stati identificati vari sistemi di trasporto degli aminoacidi con una specificità elevata per aminoacidi strutturalmente simili (Peltoniemi *et al.*, 2002.; Charbonnel *et al.*, 2003). Le proteine Opp, appartengono ad una superfamiglia di trasportatori, con sistemi ATP-binding altamente conservati che mediano l'assorbimento dei peptidi derivati dalla caseina. (Higgins, 1992). Il sistema Opp del *L. lactis* trasporta peptidi fino ad almeno 18 residui e la natura di questi peptidi influenza in modo significativo la cinetica di trasporto coinvolta (Detmers *et al.*, 1997.; Juillard *et al.*, 1998). Sistemi Opp, descritti per altri LAB, si mostrano simili a quello descritto per il *Lactococcus* (Garault *et al.*, 2002.; Peltoniemi *et al.*, 2002). Altri trasportatori di peptidi, identificati nei ceppi MG1363 e IL1403 di *L. lactis*, includono una forza motrice protonica (PMF)-driven dipeptide/tripeptide DTPT e ATP-driven Dpp sistema (Hagting *et al.* 1994; Foucaud *et al.*, 1995).

Dopo che i peptidi derivati dalla caseina vengono assorbiti dalle cellule, essi sono degradati da un'azione concertata di peptidasi con differenti e in parte simili specificità (Kunji *et al.*, 1996). Le endopeptidasi intracellulari, le aminopeptidasi (PepN e PEPC) e la X prolyl dipeptidil aminopeptidasi (PepX) sono i primi enzimi ad agire sui oligopeptidi.

Numerose endopeptidasi di LAB sono state caratterizzate e diversamente nominate. Tutte sono metallo-peptidasi, fatta eccezione per la PepE del *Lb. helveticus*, che ha dimostrato di avere un'attività tiolo-dipendente (Fenster *et al.*, 1997). Una caratteristica comune delle endopeptidasi è di essere incapaci di idrolizzare la caseina integra, ma capaci di idrolizzare legami peptidici interni di peptidi derivati dalla

caseina. Per esempio, l' $\alpha$ -<sub>SI</sub> caseina f1-23 e / o  $\beta$ -caseina f193-209 sono i substrati maggiormente preferiti dalle endopeptidasi degli starter LAB (Caira *et al.*, 2003). Una specificità unica di scissione sulla  $\alpha$  <sub>SI</sub>-caseina f1-23 e sui residui post-prolina della  $\beta$ -caseina f203-209, è stata recentemente dimostrata per una PepO da un ceppo nonstarter, il *Lactobacillus rhamnosus* HN001 e per la PepO2 dal ceppo starter *Lb. helveticus* CNRZ32 (Christensson *et al.*, 2002.; Chen *et al.*, 2003). Oltre che per la scissione di oligopeptidi da 7 a 17 residui, la PepF è importante anche per il turnover proteico in condizioni di carenza di azoto nel *L. lactis* (Monnet *et al.*, 1994.; Nardi *et al.*, 1997).

Altre peptidasi capaci di agire su oligopeptidi sono le metallopeptidasi PepN ad ampia specificità e le PepC peptidasi della cisteina, proteine che sono state caratterizzate da diversi ceppi di batteri lattici. Collettivamente, questi enzimi possono rimuovere gli aminoacidi N-terminali di un peptide, con una specificità dipendente dalla lunghezza del peptide e dalla natura del residuo dell'aminoacido N-terminale (Kunji *et al.*, 1996.; Christensen *et al.*, 1999).

Di / tripeptidi generati da endopeptidasi, aminopeptidasi generali e PepX sono soggetti a successiva scissione supplementare da parte della tripeptidasi, PepT e dalle dipeptidasi, PepV e PepD. Questi enzimi preferiscono peptidi contenenti aminoacidi idrofobici tra cui leucina, metionina, fenilalanina, o glicina. Un enzima con una specificità verso di / tripeptidi con residui di leucina N-terminale e dipeptidi contenenti prolina, è stato caratterizzato biochimicamente dal *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus* (Klein *et al.*, 1995). Altre peptidasi con specificità verso più substrati sono: PepA, che libera residui acidi N-terminali (acido glutammico e acido aspartico) da peptidi che hanno da 3 a 9 residui; PepP, che preferisce i tripeptidi spostando la prolina in posizione

centrale; PepR e PepI, che agiscono su dipeptidi contenenti la prolina in penultima posizione; PepQ, che taglia i dipeptidi portando la prolina nella seconda posizione, e Peps che mostra una preferenza per peptidi contenenti 2-5 residui con Arg o per aminoacidi aromatici residui in posizione N-terminale (Kunji *et al.* 1996; Christensen *et al.*, 1999) (Tabella n. 2).

Nella cellula, la maggior parte degli aminoacidi possono essere convertiti primariamente dalle aminotransferasi (Fig. n.4 (1)) nei loro corrispondenti  $\alpha$ -cheto acidi. Altri tipi di enzimi deaminanti non sono stati trovati nei LAB. Gli  $\alpha$ -Keto acidi sono composti intermedi molto importanti; infatti, successivamente possono essere idrogenati nei corrispondenti idrossiacidi (Fig. n.4 (2)), decarbossilati ad aldeidi (Fig. n.4 (3)) o trasformati in CoA-esteri (Fig. n.4 (8)). Queste reazioni sono per lo più enzimatiche, ma sono stati anche descritti alcuni step di conversione chimica, come la formazione di benzaldeide dall'acido fenil-piruvico (Smit, 2004b). Gli idrossi-acidi non sono considerati tra i maggiori composti aromatici e nemmeno precursori di altri composti; l'idrogenazione degli  $\alpha$ -cheto-acidi a idrossi acidi porta a una diminuzione della concentrazione degli  $\alpha$ -cheto-acidi e, quindi, influisce negativamente sulla formazione di aroma, in quanto penalizza la conversione di  $\alpha$ -cheto-acidi in composti aromatici, come ad esempio le aldeidi. La decarbossilazione dei cheto-acidi a catena laterale forma delle aldeidi con un aroma al malto e al cioccolato; la produzione di questi composti maltati è caratteristica di alcuni ceppi appartenenti alle specie: *Carnobacterium piscicola*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis maltigenes* e *Lactococcus lactis*; i lattococchi producono solo piccole quantità di queste aldeidi.

Le aldeidi liberate, generalmente possono essere deidrogenate (Fig. n.4 (4)), o idrogenate (Fig. n.4 (5)) ai loro rispettivi alcoli o acidi organici, che sono a loro volta, substrati per esterasi e aciltransferasi (Fig. n.4) (7), portando ai (tio)esteri. Le aldeidi possono essere idrogenate nei loro rispettivi alcoli, ma l'intensità aromatica nelle aldeidi è molto più forte rispetto a quella degli alcoli, quindi, quando si vogliono ottenere aromi molto intensi, la loro idrogenazione ad alcoli non è ottimale.

Gli esteri derivano dalla reazione tra gli alcoli e acidi organici; alcuni esteri, come l'etilbutirrato, sono responsabili di aromi di alcuni formaggi come il Cheddar o il Gouda, anche se un eccesso di questi potrebbe portare ad alcuni difetti, come ad esempio l'aroma fruttato nel Cheddar (Bills *et al.*, 1965). Altri composti che derivano dalla degradazione della fenilalanina, come la fenil-acetaldeide, il 2-feniletanolo e l'estere fenil-etil-acetato, sono considerati i responsabili della nota floreale del formaggio Camembert (Kubickova e Grosch, 1997).

Uno dei ruoli biologici dei percorsi di degradazione di questi aminoacidi è di generare precursori necessari ad esempio nella sintesi di steroli ed acidi grassi a catena ramificata (Oku e Kaneda, 1988). D'altra parte, l'idrogenazione dei  $\alpha$ -cheto acidi può agire come dissipatore di un eccessivo potenziale riduttivo (NADH). La conversione degli aminoacidi ad alcoli via  $\alpha$ -keto acidi è stata identificata per la prima volta per la formazione dei cosiddetti flemma alcoli (alcoli a catena ramificata corta) nei lieviti, dove fù denominata la via di Ehrlich (Ehrlich, 1907).

Un'altra importante via di conversione degli aminoacidi è avviata dalle liasi (Fig. n.4 (10)), coinvolte nel metabolismo della metionina, aminoacido solforato dalla quale si formano diversi composti solforati.

Diversi composti volatili solforati sono stati identificati in diversi tipi di formaggi, come ad esempio il Parmigiano, il Cheddar e il Gouda.

La metionina è un amminoacido che riveste un ruolo molto importante nella formazione di aromi; nei batteri starter sono state identificate due principali vie metaboliche per la degradazione della metionina.

- La prima riguarda l'enzima cistationina  $\beta$ -liasi, che catalizza una simultanea deaminazione e demetilazione della metionina, in metanotiolo (Alting *et al.*, 1995;. Dias e Weimer, 1998; McSweeney e Sousa, 2000). Il metanotiolo, influisce direttamente sull'aroma o come precursore di altri composti solforici, come il dimetilsulfide e dimetildisulfide. Enzimi simili sono stati ritrovati in *Pseudomonas ovalis*, la metionina  $\gamma$ -liasi, l'enzima PLP-dipendente (piridossal-5'-fosfato), e la cistationina  $\gamma$ -liasi, identificata in *Lactococcus lactis subsp. cremoris*.

- La seconda via metabolica riguardante l'amminoacido metionina comprende, in primo luogo, una transaminazione che porta alla formazione di acido 4-metiltio-2-ossobutirrico (KMBA), seguita da una decarbossilazione con il rilascio di metionale, infine, il metionale viene convertito in metanotiolo (Smith *et al.*, 2000).

La treonina aldolasi (Fig. n.4 (9)) appartiene ad un'altra classe di liasi ed è in grado di convertire la treonina direttamente in acetaldeide (Raya *et al.*, 1986;. Hugenholtz *et al.*, 2000;. Ott *et al.*, 2000).

Anche la conversione di altri amminoacidi è importante per lo sviluppo di aromi; infatti, dalla leucina e dalla isoleucina si ottengono il 3-metil-butanale e il 2-metilbutanale, rispettivamente; questi composti rivestono un ruolo significativo negli aromi di alcuni formaggi (Neeter *et al.*, 1996), mostrando un aroma di malto. Inoltre, gli alcoli derivanti

dagli amminoacidi a catena laterale hanno un aroma alcolico e fruttato, mentre gli acidi possono mostrare aroma dolce, acido, rancido, fruttato a seconda dell'amminoacido da cui derivano.

Gli amminoacidi aromatici, cioè fenilalanina, tirosina e triptofano, portano alla formazione di composti che possono donare un aroma rosato e di mandorle amare, così come anche un aroma putrido e fecale. Questi ultimi aromi vengono definiti come “off-flavours” e sono causa di difetti nei prodotti finali. Nella tabella n.3 sono riportati alcuni composti aromatici con i gusti che possono conferire.

Un altro percorso di conversione degli amminoacidi è la deaminazione/ decarbossilazione in ammine. Queste reazioni sono state studiate, in riferimento al rischio per la salute delle ammine biogene (Leuschner *et al.* 1998). La diretta decarbossilazione degli aminoacidi spiega la presenza della maggior parte delle ammine trovate, ma non la formazione di ammine secondarie e terziarie (Adda *et al.*, 1982).

I più potenti composti aromatici riportati in figura 4 sono le aldeidi, gli alcoli, gli acidi carbossilici e gli esteri. Particolarmente importanti sono le aldeidi, alcoli, acidi carbossilici ed esteri derivati dagli aminoacidi metionina, fenilalanina, treonina ed aminoacidi a catena ramificata. L'importanza di questi aminoacidi per il flavour del formaggio è dato dalla combinazione di diversi fattori quali quantità, grado di conversione e soglia dell'odore dei composti derivati da essi.

**Tabella n.2 Peptidasi dai LAB. # Classe catalitica di peptidasi secondo l'analisi di sequenza o la caratterizzazione biochimica. \* La freccia indica il sito di scissione. M: Metallopeptidase; C: Cisteina-peptidasi; S: Serina peptidasi**

Peptidasi	Tipo #	Specificità del substrato*
<b>Endopeptidasi</b>		$\text{NH}_2\text{-X}_n \downarrow \text{X}_n\text{-COOH}$
PepO	M	
PepO2	M	
PepO3	M	
PepF	M	
PepF1	M	
PepF2	M	
PepE	C	
PepE2	C	
PepG	C	
<b>Aminopeptidasi</b>		
PepN	M	$\text{NH}_2\text{-X} \downarrow \text{X}_n\text{-COOH}$
PepC	C	$\text{NH}_2\text{-X} \downarrow \text{X}_n\text{-COOH}$
PepS	M	
PepA	M	$\text{NH}_2\text{-Glu/Asp} \downarrow \text{X}_n\text{-COOH}$
PepL	S	$\text{NH}_2\text{-Leu} \downarrow \text{X}_n\text{-COOH}$
<b>Tripeptidasi</b>		
PEPT	M	$\text{NH}_2\text{-X} \downarrow \text{X-X-COOH}$
<b>Dipeptidasi</b>		
PepD	C	$\text{NH}_2\text{-X} \downarrow \text{X-COOH}$
PEPV	M	
<b>Specifiche per la prolina</b>		
PepQ	M	$\text{NH}_2\text{-X} \downarrow \text{Pro-COOH}$
PepI	S	$\text{NH}_2\text{-Pro} \downarrow \text{X}_n\text{-COOH}$
PepR	S	$\text{NH}_2\text{-Pro} \downarrow \text{X-COOH}$
PepX	S	$\text{NH}_2\text{-X-Pro} \downarrow \text{X}_n\text{-COOH}$
PepP	M	$\text{NH}_2\text{-X} \downarrow \text{Pro-X}_n\text{-COOH}$



Tabella n.3 **Descrizione di alcuni importanti composti aromatici (McSweenwy & Sousa, 2000)**

<b>Composto aromatico</b>	<b>Descrizione</b>
<b>2-metil-propanale</b>	<b>banana, malto, cioccolato</b>
<b>3-metil-butanale</b>	<b>malto, formaggio</b>
<b>3-metil-butanolo</b>	<b>formaggio fresco, alcolico</b>
<b>Acido 3-metil-butirrico</b>	<b>rancido, dolce, formaggio, putrido</b>
<b>Acido butirrico</b>	<b>Dolce, burroso, formaggio, forte, acido</b>
<b>Acido propionico</b>	<b>Pungente, latte acido, formaggio</b>
<b>Etil-butirato</b>	<b>Fruttato, burroso, frutto maturo</b>
<b>Diacetile</b>	<b>Forte, burroso</b>
<b>Acetaldeide</b>	<b>Yougurt, pungente, balsamico, verdura</b>
<b>Metionale</b>	<b>Carne, zolfo, patate bollite</b>
<b>Metanetiolo</b>	<b>Cavolo in decomposizione, formaggio, vegetali, zolfo</b>
<b>Benzaldeide</b>	<b>Olio di mandorle amare, ciliegia dolce</b>
<b>Fenil-acetato</b>	<b>Gelsomino con una nota metallica</b>

## **1.9 Utilizzo di ceppi lattici con un metabolismo selezionato per il miglioramento dei prodotti lattiero-caseari**

I ceppi di batteri lattici differiscono per la diversa capacità di convertire gli aminoacidi. A volte, i ceppi che hanno una maggiore attività sono ceppi isolati da fonti naturali e non dall'ambiente caseario, i cosiddetti "wild lattococchi" (Smit *et al.*, 2005). Ayad *et al.* (2000) hanno approfondito la capacità di questi ceppi, rilevando in essi proprietà uniche e diverse da quelle dei ceppi starter disponibili in commercio.

Ad esempio, alcuni tra questi ceppi non degradano le caseine, producono composti antimicrobici e/o hanno una bassa attività acidificante. Tuttavia, quando la necessità di aminoacidi nei terreni di crescita è stata rilevata mediante la tecnica di omissione singola (Cocaign-Bousquet *et al.*, 1995), si è constatato che essi avevano un potenziale di sintetizzare i propri aminoacidi molto più grande dei ceppi industriali.

I lattococchi utilizzati nelle fermentazioni lattiero-casearie sono noti per la loro limitata capacità di biosintesi degli aminoacidi, aspetto che spiega le loro complesse esigenze nutrizionali. La maggior parte di questi ceppi richiedono almeno glutammato, valina, metionina, istidina, serina, leucina ed isoleucina per la crescita, ed il numero di aminoacidi essenziali è ceppo-dipendente (Chopin, 1993; Ayad *et al.*, 1999).

Ceppi industriali di *Lactococcus lactis subsp.cremoris* richiedono ancora più aminoacidi diversi per la crescita (Ayad *et al.*, 1999). Ceppi selvaggi di *L. lactis subsp. ceppi cremoris* generalmente richiedono solo 2-3 aminoacidi, mentre alcuni ceppi di *Lactococcus lactis subsp.lactis* necessitano di solo uno o due aminoacidi. L'assenza di alcune vie di sintesi di aminoacidi in lattococchi caseari, potrebbe essere una

conseguenza del loro adattamento ai prodotti lattiero-caseari, dal momento che nel latte, gli aminoacidi sono rapidamente reperibili dalla degradazione proteolitica della caseina. I ceppi selvaggi non sono naturalmente associati ad un ambiente ricco come il latte, e ciò li rende più dipendenti dalla auto sintesi di aminoacidi rispetto ai ceppi industriali (Smit *et al.*, 2005). È interessante notare che, lattococchi isolati da nicchie naturali, hanno mostrato non solo di avere un maggiore potenziale di produzione di aminoacidi, ma anche la capacità di produrre componenti aromatici e / o profili di sapore inusuali (Ayad *et al.*, 1999). Questa biodiversità naturale potrebbe offrire nuove possibilità quando studiate ed applicate nel settore industriale. Dal momento che l'impatto dei NSLAB sul sapore del formaggio, alla fine, sarà determinato dalle attività metaboliche dei ceppi e specie dominanti durante la fase di stagionatura, la dinamica e complessa natura della comunità selvaggia dei NSLAB, è una grande fonte di sapori incongruenti e difetti casuali del formaggio (Crow *et al.*, 2001). Di conseguenza, la necessità di produrre in maniera costantemente uniforme formaggi di alta qualità, richiede una tecnologia per controllare la composizione e la crescita della comunità NSLAB durante la stagionatura. Una strategia di controllo della composizione e della diversità dei NSLAB consiste nell'aggiunta di culture ben caratterizzate, capaci di crescere durante la fase di stagionatura di modo da ridurre l'emergenza di ceppi lattici non starter selvaggi, senza un impatto negativo sull'aroma del formaggio. Il principio generale di questa strategia è supportata da alcuni studi accademici che hanno mostrato come l'uso di culture aggiuntive, possono efficacemente sopprimere lo sviluppo di queste popolazioni selvagge di NSLAB (Cogan *et al.*, 2006), contribuendo a ridurre la suscettibilità del

formaggio ai difetti di qualità relazionati alle culture. (Frohlich-Wyder *et al.*, 2002).

## **2. STUDIO ED IDENTIFICAZIONE DEI BATTERI LATTICI**

## 2.1 L'attuale concetto di specie batterica

La specie è l'elemento base della tassonomia batterica. Rossellò-Mora e Amann (2001) l'hanno descritta come “un cluster monofiletico e genomicamente lineare di organismi individuali che mostrano un'alto grado di similarità globale in molte caratteristiche indipendenti, ed è distinguibile attraverso una proprietà fenotipica discriminativa”.

Questa descrizione, combacia bene con l'approccio polifasico di delimitazione di specie, ampiamente accettato. Nella tassonomia polifasica, si combinano il più grande numero di tecniche differenti ragionevolmente possibile (Vandamme *et al.*, 1996). Questo dovrebbe portare, nel miglior modo, ad una delimitazione stabile, offrire uno schema diagnostico per la differenziazione di specie e riflettere le relazioni filogenetiche.

La necessità di principi uniformi nella nomenclatura batterica, ed anche nella tassonomia, è stata già avvertita agli inizi del 1900. La Commissione per la Nomenclatura e Tassonomia è stata fondata per soddisfare tali esigenze. Con il tempo, tale Commissione si è evoluta nell'attuale International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICPS), una commissione subordinata alla International Union of Microbiological Societies (IUMS). La ICPS, costituita di un esecutivo, di una commissione giudicatrice e di un numero di sottocommissioni, è responsabile dei problemi relativi alla nomenclatura e tassonomia dei Procarioti. Le sottocommissioni si occupano dei problemi relativi alla nomenclatura e tassonomia di specifici gruppi di Procarioti; fra i loro principali compiti è quello di determinare uno standard minimo per la descrizione di specie all'interno di uno specifico gruppo. Purtroppo, i LAB mancano ancora di tale standard, ma la sottocommissione per il

*Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e gli organismi a loro correlati, ha deciso di agire in tal senso. (Comunicazione personale della Prof. J. Bjorkroth). In aggiunta a tali importanti commissioni, altre ne vengono formate in caso di necessità.

Per la definizione di specie batterica, tra la fine del 1980 e l'inizio del 2000 sono state fondate la "Ad Hoc Committee on The Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics" e la "Ad Hoc Committee for the Re-Evaluation of the Species Definition in Bacteriology".

Dunque, nonostante il sostanziale lavoro ben compiuto da queste commissioni specifiche, non c'è ancora un universale concetto di definizione di specie polifasica. Ad oggi, l'unica definizione accettata dalla Ad Hoc Committee for the Re-Evaluation of the Species Definition in Bacteriology, è quella secondo cui *una specie costituisce u gruppo di ceppi che condividono valori di riassociazione DNA-DNA del 70% o superiori e 5°C o meno di differenza nel punto di fusione del DNA-DNA ibrido* (Stackebrandt *et al.*, 2002).

In aggiunta alla definizione ufficiale, anche la similarità nella sequenza del gene codificante per la sub-unità 16S del rRNA, è stato suggerito come criterio nella delineazione di specie, con una tolleranza di divergenza del 3%, anche se alcuni studiosi suggeriscono di considerarlo come unico metodo per la delineazione di specie. (Stackebrandt e Goebel, 1994).

## **2.2 Caratteri fenotipi classici: morfologia e caratteri fisiologici/biochimici**

L'identificazione dei microrganismi, condotta in un tipico laboratorio di microbiologia si basa quasi esclusivamente sui classici e tradizionali test fenotipici, i quali costituiscono la base per una formale descrizione di una specie batterica, la coerenza fenotipica di specie è richiesta per un utile sistema di classificazione.

Orla-Jensen ha usato come base della sua prima descrizione dei LAB (Axelsson, 2004) la morfologia, il modo di fermentare il glucosio, la crescita a diverse temperature, e l'utilizzazione della fonte di carbonio. Tuttavia, la selezione delle proprietà fenotipiche non è standardizzata, e dipende dal genere studiato. Nell'ambito dei LAB, usualmente non è possibile differenziare le specie basandosi solo su tali tests (Axelsson, 2004), così il loro utilizzo nell'identificazione di specie è spesso limitato alla differenziazione a livello di genere.

Le caratteristiche fenotipiche classiche dei batteri comprendono le caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche (Goodfellow *et al.*, 1985). L'iniziale tassonomia batterica si basa maggiormente sulla morfologia, consistente nella morfologia della cellula e della colonia.

Infatti, la morfologia dei batteri, comprende sia la morfologia delle cellule (la forma delle cellule, la presenza di endospore, di flagelli, di organelli, d'inclusioni, colorazione di Gram) che la morfologia della colonia (colore, dimensione, forma e consistenza).

I LAB sono divisi in generi costituiti sia da cocci che da bacilli (*Weissella*), solo da bacilli (*Lactobacillus e Carnobacterium*) o solo da cocci (tutti gli altri generi).



La modalità di fermentazione del glucosio in condizioni standard non limitate è usata soprattutto nella differenziazione dei generi di LAB, ed anche delle specie di *Lactobacillus*. In base al tipo di fermentazione degli esosi (in parte anche dei pentosi), il genere *Lactobacillus* può essere diviso in 3 gruppi:

1. Specie omofermentati obbligate (fermentano gli esosi mediante via Embden Meyrhopf Parnas (EMP), non fermentano i pentosi
2. Specie eterofermentatni obbligate (fermentano gli esosi mediante la, possono anche fermentare i pentosi nella stessa via)
3. Specie etero fermentanti facoltative (fermentano gli esosi mediante via EMP ed i pentosi, quando necessario, mediante la via del fosfogluconato) (Hammes *et al.*, 1992).

Altri test ampiamente usati nell'ambito dei LAB includono (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1984):

- tipi di fattori di crescita richiesti
- idrolisi dell'arginina
- formazione di acetoina (Voges-Precauer)
- tolleranza al sale/bile
- possibile emolisi (primariamente nell'ambito degli Streptococchi)
- presenza di specifici enzimi (per esempio  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase).

Nonostante i test fisiologici, nutrizionali, biochimici siano laboriosi, lunghi nella durata e qualcuno difficile da standardizzare, tali tradizionali test hanno una grande importanza nella tassonomia.

Per superare questi problemi, numerosi sistemi d'identificazione commerciali basati sulle caratteristiche biochimiche e nutrizionali sono stati sviluppati, come il sistema API (bioMerieux, France), MicroLog

(Biolog Inc. USA) e Diatabs (Rosco, Denmark). La chiave identificativa per la maggior parte di questi test non è accurata per le specie LAB, ma i test stessi sono validi come una conveniente via di esecuzione di studi fenotipici su larga scala.

L'ecologia microbica degli alimenti fermentati a lunga maturazione appare complessa e non ancora del tutto compresa, perché i medium agarizzati tradizionali ed i metodi culturo-dipendenti hanno molte limitazioni (Gatti *et al.* 2006). Le indagini sulla popolazione microbica attraverso i metodi della microbiologia tradizionale, di solito, rivelano gli organismi maggiormente prevalenti, capaci di crescere ad un livello rilevabile formando colonie su media selettivi, ma non la parte minore di microflora, che ha eguale importanza per la stagionatura del formaggio e lo sviluppo del flavour.

Un potenziale problema nel conteggio dei NSLAB è che il basso numero nella prima fase della produzione, per esempio, è rilegato nella matrice solida a formare microcolonie. Altro possibile problema è l'incapacità di distinguere tra i NSLAB “selvaggi” avventizi ed i LAB deliberatamente aggiunti (SLAB) (Cogan *et al.*, 2007).

I tradizionali terreni di coltura commerciali, preparati al fine di recuperare la maggior parte dei microrganismi, potrebbero essere troppo generici e non sempre abbastanza selettivi per differenziare specie o biotipi presenti in diverse quantità. Ceppi e biotipi lattici che svolgono un ruolo importante nei processi di maturazione, potrebbero essere presenti in piccola quantità nel latte crudo o lattoinnesto naturale. Per queste ragioni, i terreni commerciali agarizzati, per sè ricchi, possono sottostimare tale popolazione microbica di minoranza, tuttavia presente in una matrice alimentare. Questa informazione è molto importante nello

studio dell'evoluzione microbica in un alimento fermentato al fine di capire chi sono i batteri realmente coinvolti nel processo.

I batteri lattici isolati da diverse fonti, tra cui prodotti alimentari d'alta qualità, la cui microflora è naturalmente sviluppata, in genere appartengono ai seguenti generi: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Stafilococcus*, *Streptococcus*, ed *Enterococcus*. Molti autori hanno notato che l'identificazione di batteri anaerobi facoltativi, catalasi-negativi è problematico.

L'identificazione di specie entro i generi *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* con i classici metodi fenotipici presenta particolari difficoltà per i microbiologi (Facklam *et al.*, 1989).

I batteri della specie *S. thermophilus* ed *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, sono difficili da distinguere con i metodi fenotipici a causa della loro similarità fenotipica. Inoltre, i ceppi con caratteristiche simili agli enterococchi e streptococchi, che rendono la loro identificazione problematica, sono anche piuttosto comuni. Questi ceppi sono mal identificati ed hanno un numero di tratti morfologici e biochimici simili a quelli degli enterococchi (Stepanenko, 1999).

Anche l'identificazione dei lattobacilli solo attraverso le analisi microbiologiche standard può presentare delle difficoltà. Per esempio, identificare i *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii*, *Lb. delbrueckii subsp. lactis*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. Casei* e *Lb. paracasei*, strettamente correlati, sulla base delle loro proprietà fisiologiche e biochimiche è problematico, perché questi batteri condividono molte caratteristiche. Per la loro identificazione di specie, sono necessari i metodi moderni basati sulla reazione a catena della

polimerasi ed il sequenziamento genico (Andrighetto *et al.*, 1998;. Giraffa *et al.* 2004; Dellaglio *et al.*, 2005). Dunque, una più precisa identificazione dei microrganismi, potrebbe essere ottenuta attraverso uno studio completo comprendente anche l'analisi delle caratteristiche del loro genoma.

Le moderne tendenze nella sistematica dei microrganismi, inclusi i LAB, sono dirette a semplificare e formalizzare gli studi tassonomici sulla base dell'utilizzo di caratteri quantitativi nell'analisi della similarità del genoma (Botina *et al.*, 2006).

### **2.3 L'approccio polifasico nella tassonomia dei LAB**

La tassonomia polifasica che utilizza sia le informazioni fenetiche (fenotipiche e genotipiche) che filogenetiche. In pratica, i dati fenetici sono elaborati attraverso la tassonomia numerica basata sul concetto della globale similarità (somialianza), mentre l'analisi filogenetica si fonda sul concetto dell'omologia (l'averne un'origine comune) e parsimonia.

La tassonomia numerica, anche conosciuta come la tassonomia Adansoniana, è stata introdotta da Sneath e Sokal tra il 1960 e 1970 (Austin e Priest, 1986), per eliminare gli errori originati dalla soggettività umana nella valutazione dei valori di caratteri differenti.

In uno studio di tassonomia numerica, tutti i caratteri sono considerati come uguali, e viene selezionato un livello tassonomico di campionamento quale l'unità tassonomica operativa (OTU). Quest'ultima, a seconda dello studio, si riferirà alla specie, popolazione, individui in questione etc... Nella comparazione a coppia degli organismi, la misurazione dei valori di similarità (a volte di dissimilarità) è eseguita tra 2 OTUs, ed a tal fine sono stati sviluppati numerose formule o coefficienti, per esempio, Jaccard, Dice e Pearson.

I valori di similarità scaturiti da queste valutazioni, poi, sono usati per raggruppare gerarchicamente le OTUs, generalmente per singolo valore o per media di valori (UPGMA, metodo di raggruppamento per coppia attraverso le medie aritmetiche), mediante un metodo conosciuto come metodo di clustering. Tale metodo di raggruppamento gerarchico può essere presentato sotto una forma leggibile quale il dendrogramma. Oltre il metodo gerarchico, le OTUs, possono essere elaborate in diagrammi a 2 o 3 dimensioni.

La maggioranza dei test usati nella tassonomia batterica generano dati che possono essere elaborati secondo la tassonomia numerica. Per esempio, la maggior parte dei test fenotipici devono essere elaborati come caratteri fenetici, e non come caratteri filogenetici poiché le similarità possono risultare da differenti geni aventi lo stesso genere di azione, da geni simili formati in conseguenza di un'evoluzione convergente o da autentici geni omologhi.

Nell'analisi filogenetica, lo scopo è la determinazione del modello evolutivo di ramificazione. Alla base della analisi filogenetica c'è il concetto di parsimonia: lo stato attuale di evoluzione è stato raggiunto attraverso la più corta via possibile.

I dati maggiormente disponibili per l'analisi filogenetica provengono dai metodi molecolari basati sugli acidi nucleici conosciuti come tecniche di fingerprinting del DNA, tecniche di tipizzazione molecolare sviluppate nell'ultimo decennio per l'identificazione e la classificazione dei batteri a livello di ceppo o quasi. Esempi di tali metodi sono rappresentati dall'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) di frammenti di restrizione, ribotipizzazione, RAPD e AFLP, che sono stati applicati in modo estensivo per l'identificazione intraspecifica e genotipizzazione di LAB e bifidobatteri isolati da alimenti fermentati come pure dal tratto gastrointestinale umano (McCartney, 2002). Fondamentalmente, questi metodi si basano sulla rilevazione dei polimorfismi del DNA tra specie o ceppi, e differiscono nel range di capacità discriminante tassonomica, la riproducibilità, la facilità di interpretazione e di standardizzazione.

Questi sono maggiormente usati grazie all'alto potenziale garantito dall'uso della PCR o della ibridazione ex situ od in situ con DNA, RNA, o anche di sonde costituite di sequenze di DNA, RNA o

proteine. Notoriamente, tra queste la sequenza del gene codificante per la subunità 16S dell'RNA ribosomiale (16S rRNA) può essere usata per l'analisi filogenetica a causa del suo conservatissimo e può essere collegata a data base che forniscono fino a 160.000 sequenze (Botina *et al.*, 2006). Il suo uso, è ancor di più incoraggiato grazie al fatto che il suo database è, ad ora il più completo.

Questi metodi basati sul 16S rDNA sono robusti e superiori ai metodi tradizionali basati su approcci fenotipici, che spesso sono inaffidabili e sono privi di potere risolutivo nell'analizzare la composizione microbica e l'attività delle popolazioni batteriche.

Le tecniche genetiche di fingerprinting correntemente usate per la tipizzazione dei LAB sono descritte di seguito.

### **2.3.1 La triade d'oro: DNA – DNA reassociation, %G + C e sequenza del gene 16S rRNA**

- DNA-DNA reassociation è la base ufficiale per la delimitazione di specie nell'ambito della totalità dei batteri. In qualche batterio, qualora fossero rilevati ceppi fenotipicamente identici, differenti solo per i loro valori di reassociazione, il limite del 70% potrebbe essere problematico per la sua ristrettezza (Vandamme *et al.*, 1996). Tra i metodi maggiormente usati ci sono il metodo ottico di De Ley *et al.* (1970), basato sul grado di denaturazione ed il metodo di micro diluizione di Ezaki *et al.* (1989).

- La determinazione della quantità percentuale di G + C è stato il primo metodo basato sul DNA nella tassonomia batterica, della quale è

considerato anche il metodo base. Tra i Procarioti, il contenuto di G + C varia dal 24 al 76% (Vandamme *et al.*, 1996).

I LAB normalmente hanno un contenuto di G + C al di sotto del 50%, sebbene anche questo non è un valore preciso poiché qualche *Lactobacillus* ha valori superiori al 55% (Axelsson, 2004). In generale, la variazione nel contenuto di G + C non supera il 5% nell'ambito della specie, ed il 10% nell'ambito del genere (Schleifer e Stackebrandt, 1983), ma nell'ambito del genere *Lactobacillus* anche tale limite è superato (Axelsson, 2004).

La similarità nel contenuto di DNA, può essere usata solo per escludere ceppi non rientranti in una determinata specie. Il contenuto di G + C può essere determinato nel metodo di denaturazione termica mediante il  $\Delta T_m$  (Marmur & Doty, 1962; Xu *et al.*, 2000) o direttamente dai nucleotidi degradati con il metodo HPLC (Mesbah *et al.*, 1989).

-In accordo con il report della Ad Hoc Committee for the Re-Evaluation of the Species Definition in Bacteriology, tutte le descrizioni di specie dovrebbero includere una sequenza il più possibile completa del gene codificante per il 16S rRNA. Quest'ultimo, poiché un gene conservato housekeeping (gene codificante funzioni metaboliche), può essere usato come marker filogenetico nella determinazione delle relazioni tra batteri anche lontanamente correlati. Esso può, inoltre, essere usato anche nella definizione di specie; è stato osservato che batteri con similarità DNA-DNA maggiore del 70%, usualmente, condividono più del 97% di sequenze simili nel gene codificante per il 16S rRNA (Stackebrandt & Goebel, 1994). Tuttavia, come il contenuto di G + C, la similarità del 16S può usualmente essere usata negativamente. Tra i LAB, esistono differenti specie con sequenze del 16S completamente o quasi uguali (Bjorkroth *et al.*, 2002; Cachat &



Priest, 2005; Kim *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2000) e quindi i valori di similarità possono essere usati solo come un criterio di esclusione.

Come molecola relativamente piccola, il gene codificante per il 16S rRNA può essere sequenziato direttamente dagli ampliconi della PCR, creati con primers universali del 16S, senza un laborioso clonaggio.

Nell'analisi filogenetica delle sequenze del 16S (ed altri geni o proteine), il primo step è sempre l'allineamento delle sequenze stesse. Uno dei maggiori metodi di allineamento usati è l'allineamento Globale, che tenta di combaciarle con ogni altra dalla fine alla fine: esso è basato sul concetto che le 2 sequenze sono di fondo simili lungo la loro totale lunghezza. Per la comparazione di diverse OTUs, è necessario l'allineamento multiplo (l'allineamento di numerose sequenze allo stesso tempo) al posto dell'allineamento a coppia di sequenze. Tale allineamento multiplo, può essere realizzato in diversi modi. Nel metodo di allineamento progressivo, gli allineamenti a coppia vengono inseriti in una matrice dalla quale, viene creato un iniziale albero, per mezzo dell'algoritmo (usualmente UPGMA) per guidare la successione degli allineamenti progressivi. L'attuale albero filogenetico è costruito dalla matrice di tale allineamento multiplo.

### **2.3.2 Pulse field gel electrophoresis**

L'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) del DNA batterico prevede la digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione "rare-cutting" per produrre pochi frammenti relativamente grandi. I frammenti ristretti, sono poi frazionati per taglia con la PFGE

che permette la separazione dei frammenti genomici di grandi dimensioni. L'impronta digitale dei frammenti di DNA ottenuti è caratteristica di una particolare specie o ceppo batterico dato che dipende dalla specificità dell'enzima di restrizione utilizzato e dalla sequenza del genoma batterico. Questa impronta digitale, rappresenta il genoma completo e quindi può rilevare specifici cambiamenti del DNA (delezione del DNA, inserzioni, o riarrangiamenti) di un particolare ceppo, nel corso del tempo. Il suo elevato potere discriminante, è stato segnalato per la differenziazione tra ceppi di importanti batteri, *Lb. Casei* e *Lb. rhamnosus* (Tynkkynen *et al.*, 1999), *Lb. helveticus* (Lortal *et al.*, 1997), ed altri. Più di recente, un nuovo approccio che accoppia l'RFLP con la separazione per taglia del frammento di DNA tramite la citometria di flusso è stata segnalata per l'identificazione del ceppo batterico (Larson *et al.*, 2000). La divisione per taglia del frammento di DNA attraverso la citometria di flusso è risultato essere più veloce e più sensibile del PFGE, e questa tecnica è anche automatizzabile (Amor *et al.*, 2007).

### **2.3.3 Restricion fragmetn lenght polymorphism of 16S e 23S rRNA gene (Ribotyping)**

*Grimont & Grimont*, in uno studio del 1986, hanno riportato lo sviluppo del metodo d'identificazione batterica basato sullo studio del polimorfismo di lunghezza dei segmenti ristretti del gene codificante per il 16S e 23S r RNA (RFLP), o ribotyping: tale metodica individua come target adatto per gli studi di tassonomia, i geni ribosomiali.

La ribotipizzazione è una variante della tradizionale RFLP analisi, RFLP è un marker molecolare che si basa sull'ibridazione differenziale di frammenti di DNA (impronte digitali di ciascun batterio) genomici digeriti da enzimi di restrizione, con sonda specifica diretta ai tratti di DNA codificanti per l'RNA ribosomiale del batterio in esame; il marker è specifico per la singola combinazione sonda- enzima di restrizione.

In particolare, nel Ribotyping, l'intero DNA genomico viene digerito da un enzima di restrizione in frammenti più piccoli, separati poi per elettroforesi su gel. I frammenti sono trasferiti dal gel su membrana mediante Southern Blotting, ed ibridati con una sonda universale marcata, specifica per specifici domini conservati dei geni codificanti per le sub unità dell'RNA ribosomiale, 16S e 23S. Le sonde utilizzate nella ribotipizzazione variano da sequenze parziali dei geni rDNA alle regioni intergeniche all'intero operone di rDNA (O'Sullivan,1999). Dopo l'ibridazione, il marcatore nella sonda è visualizzato di modo da evidenziare come bande colorate, i frammenti ibridati dalla sonda. Questi modelli a bande, chiamati ribotypes (impronte digitali del batterio), costituiscono le OTUs, usate per l'analisi numerica di similarità nell'ambito di un database di ceppi di riferimento e l'identificazione di isolati batterici sconosciuti.

I Ribotypes possono essere usati anche per la tipizzazione di isolati batterici per scopi epidemiologici: questo è l'uso probabilmente più comune di tale metodo.

Negli anni più recenti, il Ribotyping è stato usato anche in studi tassonomici di specie e subspecie di *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (Bjorkroth *et al.*, 2000, 2002; Fernandez *et al.*, 2004; Kostinek *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2004; Giraffa *et al.*, 2000) offrendo, la ribotipizzazione un'elevato potere discriminante nell'ambito

di specie e sottospecie piuttosto che a livello di ceppo. A tal fine, si dovrebbe accoppiare tale metodica alla PFGE, la quale si è dimostrata più discriminante nel tipizzare ceppi strettamente correlati di *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus* e *Lactobacillus johnsonii* rispetto sia alla ribotipizzazione che alla RAPD analisi (Tynkkynen *et al.*, 1999; Ventura *et al.*, 2002).

#### **2.3.4 Altri metodi basati sul profilo del DNA**

Altri metodi, basati sul profilo del DNA recentemente usati nella tassonomia dei LAB, includono la RAPD (PCR-based random amplified polymorphic DNA) (Dellaglio *et al.*, 2005; Valcheva *et al.*, 2005), repPCR (ripetitive extragenic palindromic PCR) (Ventura *et al.*, 2003), AFLP (amplified fragment length polymorphism) (Dellaglio *et al.*, 2005; Valcheva *et al.*, 2005; Vancanneyet *et al.*, 2005b), e la sua modificazione fluorescente fAFLP (Vancanneyet *et al.*, 2005a), l'ARDRA (amplified ribosomal DNA restriction analysis) (Delley e Germond, 2002) e la TAP-PCR (Cusick e O'Sullivan, 2000), basati sull'uso sia degli enzimi di restrizione che sulla PCR e dimostrando di avere un elevato potere discriminante per l'identificazione e la differenziazione dei LAB.

The Ad Hoc Committee for the Re-valuation of the Species Definition in Bacteriology (Stackebrandt *et al.*, 2002) ha considerato tutti questi metodi adatti allo scopo, sottolineando anche come tutti i metodi usati, dovrebbero essere quantitativi ed i risultati sottoposti ad un'appropriata analisi statistica.

Sebbene questi metodi di fingerprinting genetici, sono stati applicati con successo nell'identificazione e classificazione tassonomica di un numero di LAB e bifidobatteri, il risultato può essere altamente

variabile tra i laboratori. Inoltre, un limite di base nelle procedure di tipizzazione genetica è che l'organismo da tipizzare deve essere puro perché DNA da altre fonti disturba i DNA fingerprints . Considerando l'efficienza costo / tempo e l'ambiguità che ancora caratterizzano alcune di queste tecniche, i metodi basati sulla sequenza del segmento 16S dell'RNA ribosomiale (amplificazione PCR o sondaggio degli acidi nucleici) offrono una valida scelta per una rapida ed affidabile identificazione dei LAB e dei ceppi probiotici in una popolazione mista. Ancora, il DNA fingerprinting è uno strumento molto potente per la classificazione intraspecie di LAB e bifidobatteri, a condizione che i suoi metodi siano utilizzati in combinazione con altri approcci. Di conseguenza, questi metodi possono offrire un utile mezzo per assicurare la qualità di ceppi lattici starter e ceppi probiotici utilizzati nei prodotti alimentari attraverso il monitoraggio nel tempo della loro stabilità genetica ed integrità.

### **2.3.5 Randomly amplified polymorphic DNA**

L'amplificazione arbitraria, conosciuta anche come RAPD, è stata ampiamente riportata come un metodo rapido, sensibile e poco costoso per la tipizzazione genetica di diversi ceppi di LAB e bifidobatteri. Questa tecnica basata sulla PCR, fa uso di primer arbitrari in grado di unirsi ad una serie di sequenze parzialmente o perfettamente complementari a posizione non nota, nel genoma di un organismo. Se il legame dei siti avviene con una spaziatura ed orientamento che permette l'amplificazione dei frammenti di DNA, si genereranno impronte digitali specifiche per ogni ceppo (O'Sullivan, 1999). Tale tecnica è stata

applicata per la distinzione tra ceppi del gruppo *Lactobacillus acidophilus* e ceppi correlati (Gancheva *et al*, 1999;. Torriani *et al*, 1999;. Tynkkynen *et al*, 1999).

Diversi sono i fattori segnalati come influenzanti la riproducibilità ed il potere discriminante del RAPD, quali la temperatura di allineamento, la purezza e la concentrazione del filamento stampo di DNA e le combinazioni dei primer (Amor *et al.*, 2007).

### **2.3.6 Amplified fragment length polymorphism**

L'AFLP combina la potenza del RFLP con la flessibilità dei metodi basati sulla PCR legando primer-sequenze riconosciute (adattatori) al DNA digerito. Il DNA genomico totale è digerito con due enzimi di restrizione, uno con una frequenza media di taglio ed il secondo con una maggiore frequenza di taglio. I nucleotidi adattatori a doppio filamento sono, in genere, legati ai frammenti di DNA fungendo da siti di ancoraggio per i primer per l'amplificazione nella PCR.

L'uso di primer nella PCR, complementari all'adattatore ed alla sequenza dei siti di restrizione, genera modelli di amplificazione ceppo-specifici (Vos *et al.*, 1995).

### **2.3.7 Denaturing gradient gel electrophoresis**

La separazione mediante elettroforesi in gel a gradiente denaturante (DGGE) dei segmenti dei geni dell'unità 16S dell'RNA ribosomiale diversi in sequenza, amplificati con la PCR, offre uno

strumento unico e completo per la caratterizzazione di comunità batteriche. Con la DGGE, la doppia elica di DNA è denaturata in un gradiente denaturante, linearmente crescente di urea e formamide a temperature elevate. Come risultato, una miscela di prodotti amplificati della PCR, formerà, dopo colorazione, un banding pattern che riflette il diverso comportamento di fusione delle sequenze diverse. I banding patterns generati, consentono di monitorare cambiamenti nella struttura di comunità microbiche nel tempo e/od in conseguenza di trattamenti diversi. La successiva identificazione di specifici gruppi batterici o di specie presenti nel campione, può essere ottenuta sia per clonazione e sequenziamento delle bande asportate o mediante ibridazione delle stesse utilizzando sonde filogenetiche (Muyzer *et al.* 1993).

La PCR-DGGE è stata utilizzata con successo per monitorare lo sviluppo di comunità microbiche, in particolare la popolazione lattica durante la produzione e stagionatura di un formaggio artigianale siciliano da latte crudo e nel formaggio stagionato (Randazzo *et al.*, 2002). Così, la PCR-DGGE è in grado di offrire uno strumento alternativo per la rapida rilevazione ed identificazione dei batteri lattici negli alimenti

### **2.3.8 Length heterogeneity- PCR**

Metodi di fingerprinting di ceppo possono caratterizzare le popolazioni lattiche ambientali dopo l'isolamento del ceppo, permettendo la costruzione di banche dati informatizzate delle impronte digitali dei ceppi (Chan *et al.*, 2003). Il recente sviluppo dei metodi indipendenti dalla coltura offre un'ulteriore tecnica di monitoraggio delle popolazioni di LAB durante il processo di insilamento (Brusetti *et al.* 2006). Lazzi *et*

*al.*, (2004) e Santarelli *et al.*, (2008) dimostrano che la (LH)-PCR (Ritchie *et al.*, 2000) è utile per la caratterizzazione degli starter LAB del siero innesto del Grana Padano. Questo metodo ha permesso la rilevazione sia delle specie dominanti che non dominanti senza la coltivazione e si è dimostrata essere facile, veloce, affidabile e altamente riproducibile.



## 2.4 Studi genomici sui batteri lattici

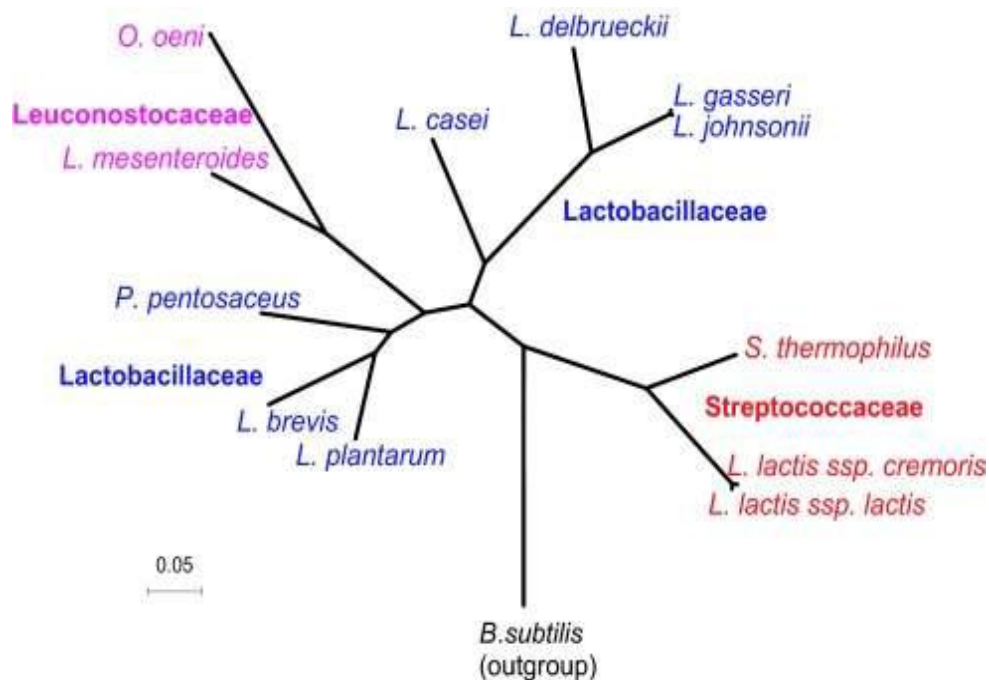
Il genoma dei LAB contiene sia DNA plasmidico che cromosomico (Broadbent, 2001). La caratterizzazione dei plasmidi nei LAB, è un campo in corso di studio negli ultimi 30 anni (Broadbent, 2001).

La caratterizzazione dei cromosomi dei LAB ha avuto inizio nei primi anni del 1970, tuttavia, gli sviluppi più interessanti nel campo della genomica dei LAB, sono ora integrati da informazioni sulla sequenza nucleotidica di genomi completi. Attualmente, la sequenza del genoma di oltre 20 LAB è conosciuta o in corso di determinazione.

Il valore della conoscenza della sequenza genomica di LAB correlati ai prodotti lattiero-caseari non può essere sopravvalutata. A causa della loro rilevanza economica, molte di queste sequenze non sono ancora disponibili per la generale comunità scientifica. Tuttavia, i dati relativi alla sequenza nucleotidica sono a disposizione del pubblico per più della metà dei ceppi di batteri lattici sequenziali (Makarova *et al.*, 2006).

Il genoma completo di tutte le maggiori branche dei *Lactobacillales*, consente una maggiore definitiva analisi delle loro relazioni evolutive.

Makarova *et al.* (2006) ha delineato alberi filogenetici a partire da sequenze di proteine concatenate, approccio che ha migliorato la risoluzione ed aumentato la robustezza delle analisi filogenetiche (Fig.n.5).



**Figura n.5** Alberi filogenetici dei *Lactobacillales* costruito sulla base di allineamenti concatenati delle proteine ribosomiali. Le specie sono colorate in base all'attuale tassonomia: *Lactobacillaceae*, blu; *Leuconostocaceae*, magenta; *Streptococcaceae* rosso.

La disponibilità di sequenze genomiche dei LAB caseari, ha dato nuova luce all'evoluzione di questi organismi nell'ambiente latte.

Il latte è un ambiente stabile e nutrizionalmente ricco, contenente lattosio come carboidrato primario e le caseine come una potenziale fonte di aminoacidi esso inoltre contiene anche la maggior parte di vitamine e minerali.

L'esame del genoma dei LAB caseari, dimostra che la perdita o l'inattivazione di geni così come la semplificazione metabolica è una componente centrale dell'evoluzione di questi organismi nel latte (Makarova *et al*, 2006;. van de Guchte *et al*,2006). Ciò è particolarmente vero per i geni coinvolti nella biosintesi degli aminoacidi. La pressione selettiva durante la crescita nel latte, ha favorito i microrganismi in grado di ottenere aminoacidi dalle caseine tramite il

loro relativamente complesso sistema di enzimi proteolitici e la perdita o l'inattivazione di geni per la biosintesi ex novo di aminoacidi.

Inoltre, è chiaro che il trasferimento genico orizzontale, processo mediante il quale un organismo trasferisce materiale genetico ad organismi diversi, ha giocato un ruolo significativo nella l'evoluzione di questi organismi. Per esempio, la capacità di utilizzare lattosio come fonte di energia, si è evoluta in modo indipendente nei diversi LAB caseari attraverso il trasferimento genico orizzontale.

La disponibilità delle sequenze genomiche dei LAB caseari, sostiene l'ipotesi che questi organismi si siano evoluti da altri LAB attraverso la perdita o l'inattivazione di geni, così come attraverso il trasferimento orizzontale di geni, rapidamente risultante in microrganismi specialisti nella crescita latte (Makarova *et al*, 2006; van de Guchte *et al*, 2006).

La sequenza del genoma ha anche permesso ai ricercatori di individuare rapidamente le potenzialità metaboliche dei ceppi sequenziati. Ad esempio, poiché la proteolisi gioca un ruolo critico nella maturazione del formaggio, il gruppo di ricerca di Steel ha dedicato più di un decennio, allo studio del sistema proteolitico di *Lb. helveticus* CNRZ32 (Christensen *et al*, 1999.; Broadbent e Steele, 2007).

Il risultato di tale studio è stata la caratterizzazione di 12 geni di tale ceppo CNRZ32, codificanti per enzimi proteolitici. Nonostante questi sforzi concertati, l'annotazione iniziale della sequenza del genoma del CNRZ32, ha rivelato un gran numero di geni addizionali nel CNRZ32 i cui prodotti si prevede contribuiscano al sistema enzimatico proteolitico di questo batterio. Da questa prospettiva, tali dati sottolineano sia il potere delle informazioni sulla sequenza genomica

applicata alla batteriologia che gli sforzi da affrontare nell'interpretare ed applicare tali informazioni.

Nonostante gli sforzi per il sequenziamento abbiano ampliato il database genetico del sistema enzimatico proteolitico del ceppo CNRZ32 di circa 5 volte, gli sforzi per confermare e caratterizzare tutte le assegnazioni di un nuovo gene, richiederà più tempo e risorse. Tuttavia, l'analisi funzionale del gene per l'endopeptidasi di recente scoperto, ha già identificato gli enzimi con un ruolo importante nell'idrolisi dei peptidi dell'amaro nel formaggio (Sridhar *et al.*, 2005).

La disponibilità di sequenze genomiche multiple, nell'ambito di una specie, permette lo studio di tratti ceppo-specifici, ad esempio, un confronto delle sequenze genomiche complete di 2 ceppi di *Lb. delbrueckii subsp.bulgaricus*, ha identificato regioni coinvolte nella batteriofago-resistenza, un tratto conosciuto variare da ceppo a ceppo.

La sequenza genomica consente anche studi che permettono di seguire la globale regolazione genica tramite DNA microarray.

Un importante punto di forza di questa tecnologia, è che fornisce una visione globale oggettiva della risposta trascrizionale di un organismo ad un ambiente di interesse. Questa visione imparziale costantemente consente osservazioni inattese che in ultima analisi, portano all'identificazione di geni con funzioni critiche nel sistema fisiologico di interesse.

L'accesso alle informazioni genomiche ha permesso ai ricercatori di affinare le vecchie ipotesi e svilupparne delle nuove su come i LAB causino la conversione del latte nella varietà di prodotti caseari fermentati, anche se testare tali ipotesi richiederà probabilmente numerosi anni. Alla fine, naturalmente, la sfida più grande consiste

nell'apprendere tali nuove conoscenze per offrire nuovi o migliori prodotti per il consumatore.

### **3. PARTE SPERIMENTALE**

### **3.1 Introduzione e scopo della tesi**

Un tempo, l'Italia agricola si presentava come un mosaico di realtà economiche, sociali e produttive estremamente frazionate e diversificate. Tecniche e produzioni differivano radicalmente sia per le diverse condizioni ambientali (climi, terreni, ecc.) sia perché in ciascuna regione, la storia, le istituzioni ed i rapporti economico-sociali avevano creato un mondo agricolo del tutto particolare, con una miriade di prodotti diversi.

Oggi l'agricoltura e i processi di trasformazione sono, per tanti aspetti, industrializzati e devono misurarsi con un mercato non solo nazionale, ma anche comunitario ed addirittura mondiale, che tende ad uniformare e standardizzare le produzioni.

Tuttavia il prodotto artigianale sopravvive, frutto di particolari tradizioni, legato a luoghi di produzione con caratteristiche del tutto peculiari: terreno e clima per la riuscita di ortaggi e frutta, pascoli e alpeggi che danno un determinato sapore a latte e formaggi, umidità e venti per la perfetta stagionatura dei salumi, esposizione o pendenza dei vigneti per la produzione di ottimi vini. I molteplici fattori che influenzano le coltivazioni e gli allevamenti sfuggono ad ogni uniformità industriale offrendoci prodotti ineguagliabili.

Strettamente intrecciate ai fattori naturali, le tecniche di lavorazione sono un altro elemento di tipicità, gli strumenti utilizzati, l'abilità e l'esperienza dell'artigiano, i tempi e i modi delle operazioni, l'aggiunta di determinati ingredienti creano, infatti, prodotti unici.

Nelle produzioni alimentari artigianali del nostro Paese, un posto di rilievo è certamente occupato dai formaggi pecorini a base di latte ovino e/o misto ovi caprino.

L'allevamento ovino ha sempre rappresentato per l'Italia un'importante attività agricola, specialmente nelle regioni nella quali la conformazione e le risorse del territorio concedono pochi spazi ad altre specie zootecniche.

Oggi, in Campania, l'allevamento delle pecore è diffuso su tutto il territorio regionale, offrendo come suo frutto, numerosi Pecorini anche con riconoscimenti comunitari, che arricchiscono il bagaglio gastronomico e culturale di questa regione. Inoltre, come in altre produzioni, esistono i cosiddetti pecorini di “nicchia”, formaggi prodotti secondo tecniche esclusivamente artigianali, frutto di tradizioni familiari secolari, che, costituiscono, pur se conosciuti e commercializzati esclusivamente nell'ambito dei mercatini settimanali del comune di produzione e/o limitrofi, una fonte di reddito importante per le numerose comunità montane della Campania. I formaggi di “nicchia” rappresentano formaggi spesso di antiche origini, preparati con latte crudo senza l'utilizzo di culture starter, per i quali il sostegno della produzione può rappresentare un'occasione per valorizzare il territorio e le razze autoctone in esso allevate, oltre che per recuperare i mestieri e le tecniche di lavorazione tradizionali.

È noto che nel processo di caseificazione intervengono fattori di ordine microbiologico, biochimico, fisico, fisico-chimico, chimico e meccanico, dalla cui diversa combinazione, scaturiscono i vari tipi di formaggio tutt'ora presenti. Tra tali fattori, certamente quelli di ordine microbiologico, peraltro i più difficili da governare, svolgono un ruolo essenziale nella produzione e maturazione dei formaggi.

Produrre pecorini a latte crudo significa trasformare un latte che non subisce trattamenti termici, né prima né durante il processo di



caseificazione, di modo che resti viva e vitale la flora lattica indigena propria del latte e dell'ambiente di produzione.

La varietà di questa popolazione microbica "favorevole" è tale da generare una serie di reazioni enzimatiche che danno, come risultato finale, una grande ricchezza aromatica e gustativa tipica ed irripetibile, che si aggiunge a quella del latte di partenza, derivante dalle erbe dei prati su cui pascolano le greggi. Si originano così formaggi con tipicità accentuata, frutto della bio-diversità che contraddistingue ogni singola entità produttiva: animali, pascoli, tecniche di lavorazione, clima e microclima dei locali di produzione e di stagionatura.

A sostegno di ciò, svariate ricerche su formaggi tipici hanno evidenziato come in tali produzioni artigianali, siano presenti microrganismi atipici o biodiversi, non riscontrabili nelle colture starter commerciali che, in fase di caseificazione, possono contribuire al processo di acidificazione, ma che soprattutto sono determinanti nella definizione delle caratteristiche sensoriali del prodotto nel corso della stagionatura. Tali caratteristiche, come ampiamente dimostrato da numerose ricerche su formaggi artigianali, sono strettamente dipendenti dalle proprietà dei ceppi che compongono le popolazioni lattiche indigene. A tale riguardo, negli ultimi anni si è assistito ad un aumento degli studi genotipici e fenotipici dei batteri lattici autoctoni isolati da formaggi artigianali, prodotti senza l'aggiunta di colture starter.

Maggiori informazioni sulle popolazioni lattiche indigene dei prodotti lattiero-caseari, sono infatti fondamentali per prevenire la perdita della biodiversità microbica dell'ampia varietà di formaggi artigianali italiani, le cui caratteristiche di "tipicità" dipendono dalle tecnologie di produzione tradizionali locali e regionali e dalla microflora lattica naturale presente nel latte crudo e selezionata nelle diverse fasi del

processo produttivo. Dunque, la conoscenza e la salvaguardia della diversità dei ceppi lattici autoctoni è necessaria per il mantenimento della tipicità dei prodotti artigianali, e costituiscono un importante strumento per la selezione di SLAB e NSLAB da reimpiegare al fine di ridurre il rischio di un appiattimento microbico ed organolettico di quei formaggi ottenuti a partire da latte trasformato.

A tale riguardo, nell'ambito di un ampio progetto di Valorizzazione, sicurezza e controllo di prodotti tipici della Provincia di Salerno, finanziato dall'Ordine dei Medici Veterinari della stessa provincia, nasce il presente progetto di tesi di Dottorato che ha avuto come oggetto lo “Studio della microflora lattica autoctona del Pecorino di Tramonti: un formaggio artigianale prodotto nel territorio del Parco Regionale dei Monti Lattari” volto, in particolare, alla valutazione della dinamica di crescita della flora lattica autoctona durante la stagionatura nonché alla sua caratterizzazione molecolare mediante Ribotyping.

### **3.2 “Tramonti” ed il “Parco Regionale dei Monti Lattari”: caratteristiche geografiche e geo-morfologiche**

“Tramonti” è un piccolo paese completamente montano, costituito da tredici frazioni, il cui territorio si sviluppa in una vallata circondata dai Monti Lattari da cui il nome "Intra Montes", terra tra i monti.

Il comprensorio impegna gran parte del versante meridionale dei Monti Lattari il cui dislivello principale si allunga da punta della Campanella al Monte San Michele (1444 slm), al Monte Candelitto (1201 slm) e al Monte Cerreto (1316 slm), ricalcando in quest'ultimo tratto il confine provinciale. Oltre il Monte Cerreto la dorsale principale descrive un arco che, delimitando la conca di Tramonti, si rivolge a Mezzogiorno toccando il Monte di Chiunzi (mt. 855), il Monte Sant' Angelo di Cava (mt. 1130) e il Monte Finestra (mt. 1140). Tali rilievi sono geologicamente classificati come sedimenti carbonatici marini di piattaforma di età mesozoica ed appartengono alla serie carbonatica della piattaforma campano - lucano. Queste formazioni hanno subito fasi tettoniche compressive nel Miocene (circa 23 - 37 milioni di anni fa) e, successivamente nel Quaternario, ulteriori dislocazioni in senso verticale. Al complesso litoido mesozoico di base, in alcuni punti, si sono sovrapposti terreni quaternari quali alluvioni, materiali piroclastici, detriti di falda e depositi di spiaggia. Le formazioni litoidi - mesozoiche si compongono di dolomie affioranti alla base, calcari - dolomitici e calcari, con netta prevalenza di questi ultimi nella parte superiore della serie. Queste formazioni sono oggetto di una intensa fratturazione presentando, specie nella parte superiore della serie, un'elevata permeabilità che finisce col costruire l'unico complesso idrogeologico e un buon serbatoio idrico. L'idrografia superficiale è caratterizzata da

numerose incisioni che impegnano in maggior numero il dislivello meridionale dove si riconoscono tra le principali quelle dei torrenti Reginna - Major, Bonea, Sambuco e Dragone. Il versante Nord defluisce invece verso il torrente Cavaiola e l'alveo comune nocerino, peraltro costituente il più esteso bacino idrografico dell'area.

### **3.2.1 Caratteristiche climatiche**

L'estrema variabilità del sistema oro-idrografico presente nel territorio comunitario e l'intrinseca diversificazione morfologica tra le diverse zone che lo compongono, determinano al suo interno la presenza di circoscritti microclimi affatto omogenei. La natura dei luoghi, generalmente molto accidentata, comporta infatti fattori di soleggiamento estremamente diversificati anche in aree contigue che, accoppiati alla variabile altimetria e, pur in presenza del mitigante influsso marittimo, determinano una notevole alternanza delle comunità vegetali dell'area. La presenza del mare e del retroterra montuoso settentrionale determina infatti inverni miti e piovosi ed estati siccitose non eccessivamente calde, ponendo la nostra area, all'interno del panorama regionale, in una situazione di privilegio peraltro ampiamente apprezzata dall'utenza turistica. Le temperature medie annue restano infatti comprese tra i 16° ed i 20° C lungo la costa e tra i 12° ed i 16° C nel versante settentrionale, con minimi nelle zone più elevate dei versanti esterni comunque attestati tra gli 8° e i 12° C. Tale situazione genera una distribuzione delle isoterme congruente con l'andamento altimetrico dei luoghi. Il regime delle precipitazioni risulta localmente condizionato anche in maniera rilevante dalla presenza di rilievi calcarei; le piogge

pertanto interessano con maggiore intensità i versanti interni (in cui si registrano valori medi annui superiori ai 1500 mm) e minore lungo la costa (in cui comunque si registrano valori medi annui superiori a 1000 mm). Tali precipitazioni si distribuiscono in media in circa 100 giorni, dando luogo a piogge di maggiore intensità nelle zone più elevate. Le precipitazioni estive rappresentano una percentuale compresa tra il 10% di quelle totali annue. Il regime dei venti, pur in presenza di numerose osservazioni di calma, vede prevalere il quadrante di libeccio.

### **3.2.3 Aspetti paesaggistici**

Il paesaggio vegetale dei Monti Lattari si può suddividere schematicamente in tre gruppi: sul mare e sui versanti meglio esposti predominano il carrubo e l'olivastro; nella fascia intermedia prevalgono il leccio, l'orniello, la roverella e arbusti come il corbezzolo e l'erica; alle alte quote abbondano il castagno e l'ontano, ma anche il carpino, il frassino e il faggio. In alcuni siti a sud si incontrano sia la tipica gariga, sia la lecceta (*Quercusilex*), sia la pineta (*Pinushalepensis*). Rigoglioso il sottobosco: sono presenti ciclamini (*Cyclamenneapolitanum*) e fragole (*Fragaria vesca*). Sui dirupi più scoscesi si incontrano la sabina (*Juniperus sabina*) e la palma nana (*Chamaerops humilis*). Inoltre il lungo e paziente lavoro dell'uomo ha impiantato agrumeti e vigneti su ogni lembo di terra coltivabile, faticosamente strappato alla pendenza mediante la realizzazione di arditi terrazzi. La zona è anche ricca di valloni e ruscelli e si osservano quindi essenze e specie legate ad ambienti umidi (come, per esempio, le felci). Nel versante amalfitano il

litorale risulta caratterizzato da falesie elevate che spesso coincidono con piani di faglia quaternari.

Tale territorio montano ben si presta alla pastorizia come testimoniato dalla presenza sul territorio di numerosi allevamenti di pecore meticce o “mosce” derivanti dall’incrocio di 2 razze, la Barbaresca e la Comisana. In questi territori, le pecore vanno in alpeggio da marzo ad ottobre mentre nei mesi invernali vengono ancora foraggiate con insilati e fogliame locale raccolto ed essiccato dagli allevatori a questo scopo, che regalano al latte e quindi al formaggio, aromi e sapori unici dovuti al particolare microclima dei Monti Lattari.

### **3.3 Il Pecorino di Tramonti**

Il pecorino di "Tramonti", uno dei numerosi formaggi a pasta cruda e dura cosiddetti di "nicchia" della Campania, non fregiati di alcun marchio di qualità Nazionale, ma di notevole valenza economico-sociale per le comunità dei territori montani di produzione, perché tangibile eredità di una cultura contadina non scritta ma complessa e ricca, propagatasi di generazione in generazione fra le pieghe di produzioni più redditizie.

Il formaggio è prodotto in piccole aziende agricole a conduzione familiare sparse nel territorio del Comune di Tramonti - frazione Cesarano e zone limitrofe, un'area della provincia Salernitana rientrante nel Parco Regionale dei Monti Lattari. Il latte crudo delle pecore di razza autoctona, allevate al pascolo, è trasformato interamente in formaggio secondo metodologie artigianali non standardizzate per cui il casaro, utilizzando esclusivamente latte crudo, caglio e sale senza l'aggiunta di colture starter, confida per l'acidificazione, la maturazione e la sicurezza del prodotto sul rispetto delle buone norme igieniche di lavorazione, sulle proprietà tecnologiche e protettive della flora lattica autoctona della materia prima e sulle modificazioni chimico-fisico del prodotto. Il particolare sapore ed aroma che rendono unici tali formaggi risiede, dunque, nella tecnica di lavorazione, diversa da casaro a casaro, nell'alimentazione del gregge a base di erbe spontanee montane fresche ed essiccate, nonché nella particolarità del clima e della microflora presente nel Parco Regionale dei Monti Lattari.

Il pecorino di Tramonti, tradizionalmente è di forma cilindrica regolare, con faccie piane e scalzo convesso ed arrotondato in seguito

alla formatura della cagliata nelle fuscelle di plastica; la superficie esterna è umida e grassa, talora ricoperta di muffe facilmente asportabili. La crosta è rilevabile fin dal primo mese di stagionatura ed assume una colorazione variabile dal bianco crema alle varie tonalità di giallo a seconda del grado di stagionatura.

All'interno del formaggio si rileva una pasta compatta, uniforme con possibili piccole occhiature a distribuzione e forma irregolare, di colore bianco e consistenza morbida nel formaggio fresco; bianco paglierino e semidura nelle forme a breve stagionatura; paglierino, consistente senza diventare mai gessata e facilmente scagliabile, nelle forme a lunga stagionatura. Il gusto del Pecorino di Tramonti è caratterizzato da sentori di latte nella forma giovane, da odore caratteristico persistente e deciso sapore non eccessivamente sapido con sentore delle tipiche essenze dei pascoli nella forma a medio-lunga stagionatura.



### 3.4 La tecnologia di produzione del “Pecorino di Tramonti”

Il “Pecorino di Tramonti” è prodotto a partire da latte ovino crudo (Fig. n. 6) di due successive mungitura manuali, una serale ed una mattutina con una media di latte lavorato giornalmente di ~ 50-60 litri.

Il latte di massa serale è conservato a temperature di refrigerazione e, dopo aver sostato nella sala di trasformazione a temperatura ambiente, viene miscelato con quello della mungitura mattutina (Fig. n. 6).



**Fig. n. 6** Latte crudo ovino

Il latte così ottenuto, dopo filtrazione con teli a maglia stretta (Fig. n.7), viene subito riscaldato a fuoco diretto in caldaia di rame avente la proprietà di mantenere uniforme la temperatura della cagliata (Fig. n. 8).

Il raggiungimento della temperatura di coagulazione di ~ 29-32°C è valutato dal casaro empiricamente in base all’esperienza nella trasformazione del prodotto.



**Fig. n. 7** Filtrazione e passaggio in  
in caldaia



**Fig. n. 8** Riscaldamento in caldaia

Segue l'aggiunta di caglio liquido, addizionato in piccole quantità al latte da trasformare (Fig. n. 9 - n. 10). Tale condizione allunga i tempi di coagulazione del latte (60-80 min) favorendo all'interno della cagliata la moltiplicazione dei batteri lattici, in particolare degli starter autoctoni del latte.



**Fig. n. 9** - Sosta del latte addizionato a caglio - **Fig. n. 10**



Avvenuta la presa della cagliata (Fig. n. 11), questa è addizionata di sale (40%) (Fig. n. 12) ed è rotta in micelle della dimensione di un seme di mais mediante energica agitazione manuale con il “ruotolo” (attrezzo tradizionale di legno a punta rotonda) (Fig. n. 13 – n. 14).



**Fig. n. 11** Presa della cagliata



**Fig. n. 12** Aggiunta del sale



**Fig. n. 13** Rottura della cagliata



**Fig. n. 14** Micelle a chicco di mais

La cagliata frantumata finemente, viene amalgamata sotto siero (Fig. n. 15) e spinta verso il fondo della caldaia con fuscelle di plastica (Fig. n.16), che a mò di setaccio, determinano l'avvicinamento delle micelle casearie disperse nel siero.



**Fig.n.15** Lavorazione della cagliata sotto siero **Fig.n.16** Compattazione della cagliata sul fondo della caldaia

A questo punto, mentre quest'ultimo è avviato alla produzione della ricotta, la cagliata viene formata pressando in modo graduale l'impasto all'interno delle fiscelle favorendo in tal modo lo spurgo e la sua compattazione (Fig. n. 17 – n. 18- n.19).



**Fig. n. 17** Allontanamento del siero **Fig. n. 18** Compattazione della cagliata



**Fig. n. 19** Disposizione della cagliata in fiscelle

Successivamente, le forme nelle fiscelle vengono trasferite su di un piano d'acciaio inclinato dove, viene eseguita un'energica pressatura della pasta, rigorosamente manuale, in modo da farle assumere la tradizionale forma circolare e da assicurare, nello stesso tempo, l'allontanamento della massima quantità di siero (Fig. n. 20).

Le forme di formaggio vengono lasciate riposare per 24-48 ore a temperatura ambiente (22-28°C a seconda delle stagioni) su tali ripiani, successivamente sono asperse manualmente sulle superfici e sullo scalzo con sale fino e lasciate nelle fiscelle scolare dal siero in eccesso ancora per altre 48 ore (Fig. n.21a- n.21b).



**Fig. n. 20** Formatura



**a**

**b**

**Fig. n. 21:** **a)** Riposo delle forme per 24-48 sui ripiani d'acciaio; **b)** Aspersione manuale del sale sulla superficie e sullo scalzo della forma con riposo delle forme nelle fiscelle per 48h

La stagionatura avviene all'interno degli stessi locali di trasformazione, come accade nelle piccole realtà produttive, aventi in ogni caso, sufficiente umidità (80-85% di umidità relativa) e buona aerazione: a tale fine le forme ben asciutte, sono adagate sopra un carrello a più ripiani forati (Fig. n. 22).



**Fig. n. 22** Carrello a tre piani forato utilizzato per la stagionatura

Durante tale fase, il Pecorino viene pulito e rigrato costantemente dato il possibile sviluppo esterno nei primi mesi di maturazione, di muffe di colore bianco-verde e grigio scuro, segno di corretta stagionatura e buona maturazione.

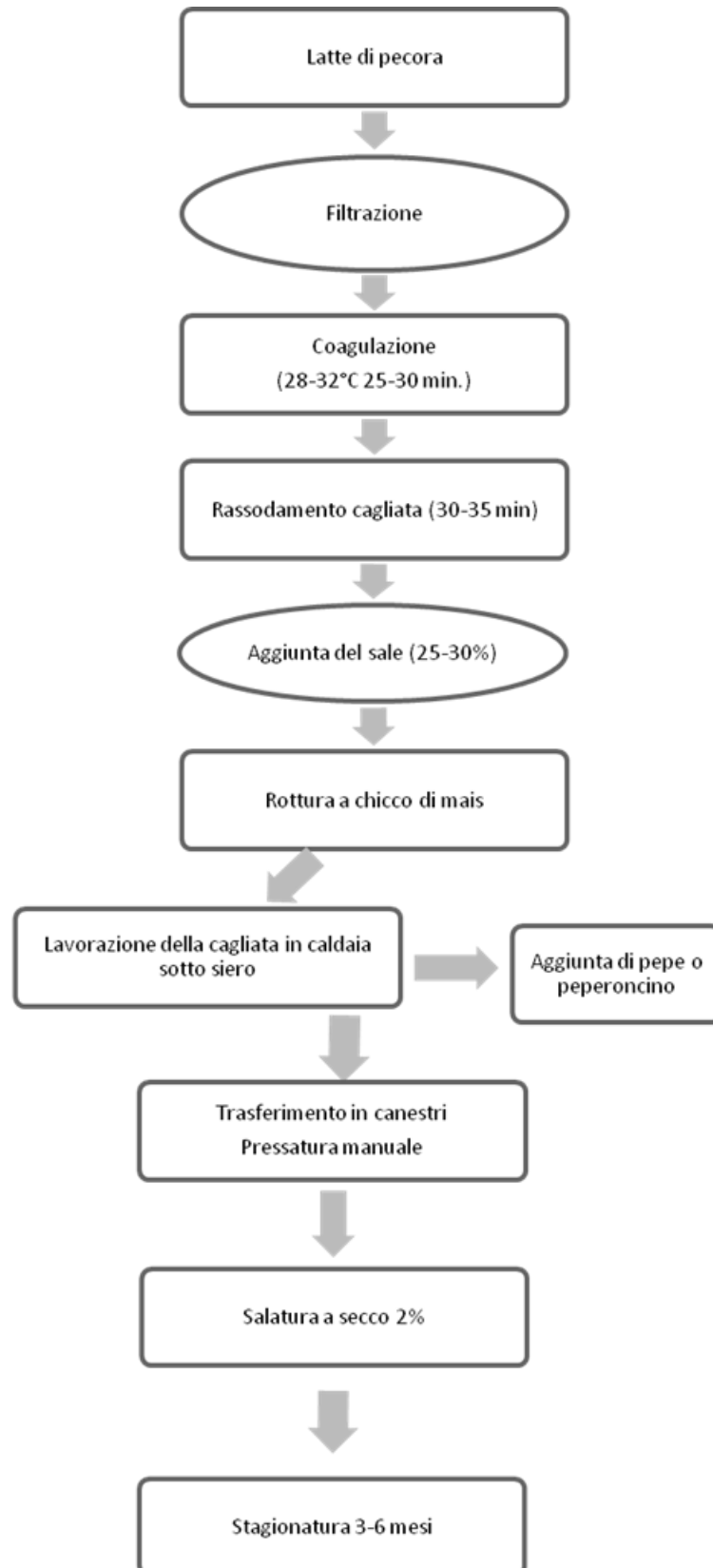
Il diagramma di flusso della tecnologia di produzione del Pecorino di Tramonti è riportato in Figura n. 23.

La fase di stagionatura ha un andamento variabile in funzione della dimensione delle forme, del periodo di produzione, delle condizioni climatiche e delle diverse possibili modalità di consumo del prodotto.

Nella piccola produzione presa in esame, il casaro identifica in 40-90 giorni come il tempo sufficiente a che le forme di formaggio da 1,5

kg raggiungano un ottimale stagionatura, perdendo una quantità di umidità tale da costituire un formaggio duplice da tavola e da grattugia, grazie ad una crosta spessa ed una pasta compatta, dura e scagliabile.

Nel caseificio esaminato, in particolare, si producono tre tipologie commerciali di pecorino: il tipo fresco, venduto a 24-48 h dalla produzione; il tipo maggiormente commercializzato semi-stagionato, a crosta appena evidente e pasta ancora fresca e tenera, venduto a 30 giorni dalla produzione; il tipo stagionato, venduto dopo un periodo di stagionatura di 40-90 giorni per forme del peso di 1.5 Kg, quando crosta ed impasto mostrano ormai uguale struttura e consistenza. Il prodotto mantiene le sue caratteristiche chimico-fisiche ed organolettiche ottimali se mantenuto a temperatura di 8/10°C con un'umidità relativa dell'80%. La commercializzazione del Pecorino di Tramonti avviene in un ambito strettamente locale e le vendite al dettaglio vengono realizzate dal produttore nei comuni della provincia e dell'agro nocerino sarnese.



**Fig. n. 23** Diagramma di flusso del Pecorino di Tramonti



## **4. Materiali e metodi**

### **4.1 Descrizione dell'azienda coinvolta nello studio**

E' stata esaminata la produzione casearia di un'azienda agricola, allocata nel comune di Tramonti a 700 metri sul livello del mare, che trasforma latte crudo di un gregge di 65 pecore, incrocio tra le razze barbaresca e comisana (61,5% in lattazione), secondo una tecnologia di lavorazione rigorosamente artigianale e tramandata da generazioni.

L'azienda, a conduzione familiare senza salariati, è gestita dal proprietario e la forza lavoro è fornita, a tempo pieno o parziale, esclusivamente dai componenti della famiglia.

L'intera produzione di pecorino ha luogo in un piccolo laboratorio di trasformazione, munito di riconoscimento comunitario. In particolare l'opificio presenta la seguente organizzazione strutturale: esso è composto da un'unica sala nel mezzo della quale sono effettuate le operazioni di riscaldamento del latte in caldaia mentre lo spurgo e la formatura avvengono su di un ripiano di acciaio inox posto in un angolo adiacente alla cella frigorifera ( 250 cm x 246 cm), che è impiegata sia per lo stoccaggio del latte che per quello dei formaggi stagionati.

Nel medesimo locale, per la stagionatura, le forme sono adagate ed ordinatamente disposte su di uno scaffale di acciaio a tre piani forati e munito di rotelle.

Questo piano, utile ai fini della maturazione, viene orientato in modo differente all'interno del locale esponendo o meno il prodotto a

ventilazione allorquando lo si avvicina o lo si allontana alla porta di ingresso o alla finestra.

## **4.2 Protocollo sperimentale**

La sperimentazione ha avuto inizio nell'ottobre 2010 e si è articolata in 2 fasi.

➤ La prima fase ha visto la produzione, in periodi differenti, di 2 lotti di pecorino, il primo lotto denominato Pecorino di Tramonti Classico (*PTC*), il secondo lotto prodotto con aggiunta di peperoncino, Pecorino Tramonti Speziato (*PTS*). In questa fase caratterizzata dalla produzione del pecorino e della sua stagionatura, le forme sono state prelevate, direttamente nei locali dell'azienda, in giorni stabiliti e sono state trasportate presso i laboratori della Sezione di Ispezione del Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli alimenti, dove sono state sottoposte ad analisi microbiologiche con particolare riferimento alla flora lattica.

➤ La seconda fase è stata effettuata presso il Dipartimento d'Igiene degli Alimenti e Salute ambientale della Facoltà di Veterinaria di Helsinki, dove si è proceduto alla caratterizzazione molecolare mediante Ribotyping della flora lattica precedentemente isolata.

#### 4.2.1 Descrizione della prima fase

##### a) Produzione del Pecorino di Tramonti Classico (PTC)

Dalla lavorazione di 80 litri di latte crudo di massa, ottenuto miscelando il latte della mungitura serale e di quella mattutina, è stato prodotto un lotto di Pecorino di Tramonti Classico (PTC) secondo la tecnologia precedentemente descritta (Fig. n. 23). La lavorazione del latte ha determinato la produzione di 8 forme di pecorino da 1.5 kg l'una con una resa del 15% circa.

Le forme, appena prodotte, sono state marchiate al fine di distinguerle dagli altri lotti (Fig. n. 24) mediante disposizione di 2 ramoscelli di ulivo disposti a formare una T sulla faccia superiore.



Fig. n. 24 Formaggio con ramoscelli di ulivo a T

A partire dal giorno di produzione, quindi, le forme sono state poste su di uno scaffale di acciaio a tre piani forati e munito di rotelle.

Questo piano, utile ai fini della maturazione, viene orientato in modo differente all'interno del locale. In questo modo, il prodotto viene esposto o meno a ventilazione avvicinandolo o allontanandolo alla porta

d' ingresso o alla finestra in maniera tale da favorire l'azione delle tipiche condizioni microclimatiche del territorio di produzione.

### **b) Produzione del Pecorino Tramonti Speziato (PTS)**

Dalla lavorazione di 45 litri di latte ovino crudo della mungitura serale miscelato con quella mattutina, è stato prodotto il secondo lotto di pecorino composto da 5 forme. La tecnologia utilizzata in questa seconda produzione è variata rispetto alla prima in quanto sono stati aggiunti 100g di peperoncino tritato del tipo commerciale. Questo è stato distribuito a pioggia dopo la rottura e la compattazione della cagliata e prima della formatura (Fig. n. 25- n. 26 ).

La modalità di stagionatura delle forme speziate è avvenuta in maniera analoga a quella descritta per il lotto di *PTC*.



**Fig. n.25** Aggiunta del peperoncino



**Fig. n.26** Peperoncino nella cagliata

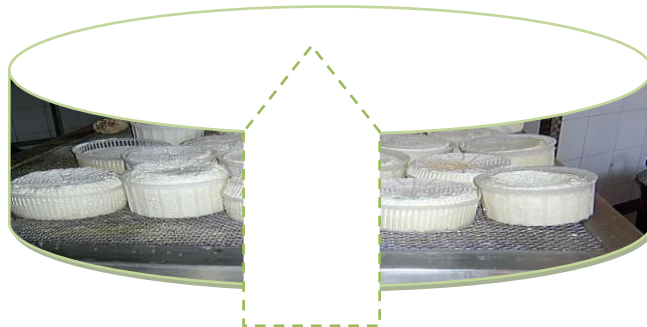
### c) Modalità di campionamento del formaggio Pecorino di Tramonti

Nel corso della sperimentazione sono state complessivamente analizzate:

\* 4 u.c. di pecorino classico (*PTC*) prelevate al giorno di produzione 0, ed al 39°, 60°, 94° giorno di stagionatura;

\* 4 u.c. di pecorino al peperoncino (*PTS*) prelevate al giorno di produzione 0, ed al 30°, 50°, 105° di stagionatura come riportato nella Tabella n. 4.

A carico della forma è stato eseguito il prelievo, mediante incisione a spicchio, che ha interessato sia la parte centrale che quella periferica, al fine di ottenere un campione omogeneo rappresentativo dell'intera forma, previa asportazione della crosta (Fig. n. 27).



**Fig. n. 27** Modalità di prelievo delle u.c. di formaggio “a spicchio”

**Tabella n.4** Unità campionarie dei 2 lotti di pecorino analizzate

Lotto di <i>PTC</i>		Lotto di <i>PTS</i>	
Fase di stagionatura	u.c. prelevata	Fase di stagionatura	u.c. prelevata
0°	1u.c.	0°	1u.c.
39°	1u.c.	30°	1u.c.
60°	1u.c.	50°	1u.c.
94°	1u.c.	105°	1u.c.
	4 u.c.		4 u.c.

#### **d) Ricerca della flora lattica**

Per ciascuna u.c. di pecorino, è stata allestita la soluzione madre ( $10^{-1}$ ) diluendo, un'aliquota di 25 g in 225 ml di una soluzione al 2% di sodio citrato (AppliChem®) ed omogeneizzando in Stomacher (Stomacher 400 circulator pbi international). Successive diluizioni decimali sono state allestite per la ricerca dei:

- **Lattobacilli termofili e mesofili**, su piastre di Man Rogosa Sharp agar (MRS, Oxoid) incubate in anaerobiosi a 42° e 32°C per 48h ± 2 h ;
- **Lattococchi termofili e mesofili**, su piastre di M17 agar addizionato di 5gr/l di lattosio (Oxoid) incubate a 42°C e 32°C per 48h ± 2 h.

Ciascuna semina è stata eseguita in doppio, la lettura è stata effettuata esclusivamente sulle piastre che hanno presentato un numero di colonie significativo (>30) e che hanno permesso una chiara lettura a vista da parte dell'operatore (< 300).

Sono state considerate riconducibili a *Lactobacillus spp.* le colonie di colore bianco, con aspetto lattiginoso e forma lenticolare ed a *Lactococcus spp.* quelle di colore bianco avorio e forma lenticolare.

Dalle suddette piastre di MRS ed LM17, sono state selezionate casualmente le colonie riconducibili a *Lactobacillus spp.* e *Lactococcus spp.* che, successivamente, sono state re-isolate mediante semina su MRS e LM17 agar ed incubazione in anaerobiosi a 37° C + 1° C per 24h ± 2h.

I ceppi, così isolati sono stati sottoposti a:

1. colorazione di Gram;
2. prova della catalasi.

I ceppi Gram positivi e catalasi negativi di forma bastoncellare o coccica, sono stati conservati a temperatura di -80° C nello stesso terreno d'isolamento, addizionato del 20% (vol/vol) di glicerolo.

Un totale di 101 e 67 presunti ceppi lattici isolati nel lotto di *PTC* e nel lotto di *PTS*, sono state inviate presso i laboratori d'igiene degli alimenti della Facoltà di Medicina Veterinaria di Helsinki.

#### **e) Determinazione del pH e dell' $a_w$**

Inoltre, nelle unità campionarie di pecorino sono stati valutati il pH utilizzando un pHmetro Metrohm 691, e l'attività dell'acqua ( $a_w$ ) utilizzando il ro-tronic Higo-lab PBI-international.

#### **4.2.2 Descrizione della seconda fase della sperimentazione: caratterizzazione molecolare dei batteri lattici mediante Rybotiping**

##### **a) Isolamento e restrizione del DNA genomico**

I ceppi, isolati come descritto precedentemente, sono stati incubati in LM17 broth per 24-48h a 25°C, si è quindi proceduto alla raccolta delle cellule microbiche mediante centrifuga (per 2 min alla massima velocità) di 1,5-2ml di tale brodo-cultura in una centrifuga Biofuge A bench (Heraeus Sephatec GmbH, Osterode am Kalkberg, FRG) per ottenere un pellet di circa 15mg (peso umido).

Da ogni brodo cultura, il DNA genomico è stato estratto secondo il metodo guanidina tiocianato di Pitcher et al. (1989) come modificato da Björkroth & Korkeala, (1996). Le cellule sono state sospese in una soluzione di TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) contenente 25mg/ml di lisozima (Sigma, St. Louis, U.S.A.) e 200 U/ml di mutano lisina (Sigma), ed incubate a 37°C per 1-2 h, a seconda della resistenza della parte cellulare. Si è poi proceduto alla restrizione del DNA genomico estratto (8µg) con l'endonucleasi HIND III come specificato dalla casa produttrice (New England BioLabs). In caso di necessità è stato usata, come



seconda endonucleasi, *ECOR I*. I frammenti di DNA ristretti sono stati separati mediante corsa elettroforetica (25V/16h) in gel di agarosio all'0.8% (SeaKem IDNA agarose, FMC, Rockland, USA) in un GNA 200 apparatus (Pharmacia, Uppsala, Sweden), usando come marker di grandezza dei segmenti di acido nucleico, il Digoxigenin labelled phage lambda DNA cleaved with *Hind III* (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Federal Republic of Germany) .

**b) Southern blotting ed ibridazione dei frammenti di DNA genomico con sonde oligonucleotidiche marcate con digoxigenina**

Alla fine della corsa elettroforetica, i frammenti di DNA genomico sono stati trasferiti dal gel di agarosio su membrane di nylon MS1 Magnagraph (MSI, Westboro, USA) mediante Southern blotting, in un VacuGene XL blotting system (Pharmacia), secondo il protocollo indicato dal produttore, e poi fissati mediante irradiazione UV in un Spectrolinker XL 1000 (Spectronics Corporation, New York, NY, USA). A questo punto, le membrane sono state ibridate, a 53°C overnight in un ibridizzatore Techne (Techne, Cambridge, United Kingdom), con un mix di 5 sonde costituite da sequenze oligonucleotidiche dell' rDNA marcate con digoxigenina in posizione 3'5' (Regnault, B. *et al.*, 1997). La preparazione delle soluzioni per l'ibridazione, il lavaggio e lo sviluppo delle membrane sono state condotte come descritto nelle istruzioni del kit per la colorazione con DIG del DNA e suo rilevamento (Boehringer Mannheim GmbH).

### **c) Analisi dei patterns**

I risultanti 16 rRNA gene *Hind*III RFLP patterns (ribopatterns) di ciascun potenziale batterio lattico, sono stati comparati con quelli di oltre 3000 isolati e circa 170 ceppi tipo e di referenza, presenti nel database d'identificazione dei LAB del Dipartimento d'Igiene degli Alimenti dell'Università di Helsinki. Per l'analisi numerica, tali ribopatterns, sono stati scannerizzati con uno scanner Hewlett-Packard ScanJet 4c/T (Boise, Idaho) ed analizzati mediante il software BioNumerics 1.0 package (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). La similarità tra tutte le coppie è stata espressa mediante il coefficiente di correlazione Dice ed è stato usato per la costruzione del dendrogramma, il metodo di raggruppamento UPMGA con una tolleranza del 1,5% per la posizione delle bande.

## **5. RISULTATI**

## 5.1 Risultati della ricerca della flora lattica nel *PTC*

Le cariche e l'andamento della flora lattobacillare e lattococcia termofila e mesofila nel lotto di Pecorino di Tramonti Classico sono riportate in Tabella n. 5 e nei Grafici n. 1, n. 2, n. 3 e n. 7.

La flora lattica termofila, da valori iniziali di  $\log_{10}$  5,2 ufc/g (lattobacilli) e  $\log_{10}$  7,5 (lattococchi), ha raggiunto alla fine della stagionatura, in media, valori di  $\log_{10}$  5,5 ufc/g (Grafici n. 2 e n. 3).

I lattobacilli ed i lattococchi mesofili hanno mostrato una carica iniziale di  $\log_{10}$  8,3 ufc/g per poi, attestarsi a fine stagionatura, su  $\log_{10}$  5,3 e 6,5 ufc/g (Grafici n. 2 e n. 3).

**Tabella n. 5** Cariche della flora lattica nel *PTC* espresse in  $\text{Log}_{10}$  ufc/g

Giorni di stagionatura	Flora lattica termofila		Flora lattica mesofila	
	Lbt	Lct	Lbm	Lcm
0°	0	7,5	8,3	8,33
39°	6,29	6,43	7,17	7,89
60°	5,92	6,12	7,94	7,6
94°	5,94	6,19	5,69	7,66

## 5.2 Risultati della ricerca della flora lattica nel *PTS*

Le cariche e l'andamento della flora lattobacillare e lattococcica termofila e mesofila isolata nel lotto di Pecorino di Tramonti Speziato sono riportati in Tabella n. 6 e nei Grafici n. 4, n. 5, n. 6 e n. 7.

I lattobacilli termofili, dal valore iniziale di  $\log_{10}$  6.00 ufc/g hanno raggiunto valori di  $\log_{10}$  7,48 ufc/g a 30 giorni di stagionatura, per poi mantenere cariche medie sempre superiori a  $\log_{10}$  6 ufc/g (Grafico n. 5).

I lattobacilli mesofili, da valori iniziali di  $\log_{10}$  7,54 ufc/g hanno raggiunto il valore massimo di  $\log_{10}$  8,35 ufc/g a 30 giorni di stagionatura, per poi mantenersi sempre su livelli superiori a  $\log_{10}$  7.00 ufc/g (Grafico n. 5).

La flora lattococcica termofila ha mostrato cariche costantemente superiori a  $\log_{10}$  6 ufc/g, con valore massimo di  $\log_{10}$  7,13 ufc/g a 30 giorni di stagionatura mentre la flora lattococcica mesofila, dopo aver raggiunto il valore massimo di  $\log_{10}$  8,42 ufc/g a 30 giorni di stagionatura, ha mostrato cariche comprese tra  $\log_{10}$  6 e 7 ufc/g durante l'intera stagionatura (Grafico n. 6).

**Tabella n. 6** Cariche della flora lattica nel *PTS* espresse in  $\text{Log}_{10}$  ufc/g

mesofila	Flora lattica termofila		Flora lattica	
	Lbt	Lct	Lbm	Lcm
<b>Giorni di stagionatura</b>				
<b>0°</b>	5,84	6,39	7,54	0
<b>30°</b>	7,48	7,13	8,35	8,42
<b>50°</b>	6,79	6,6	7,48	7,5
<b>105°</b>	6,5	6,49	7,16	6,73

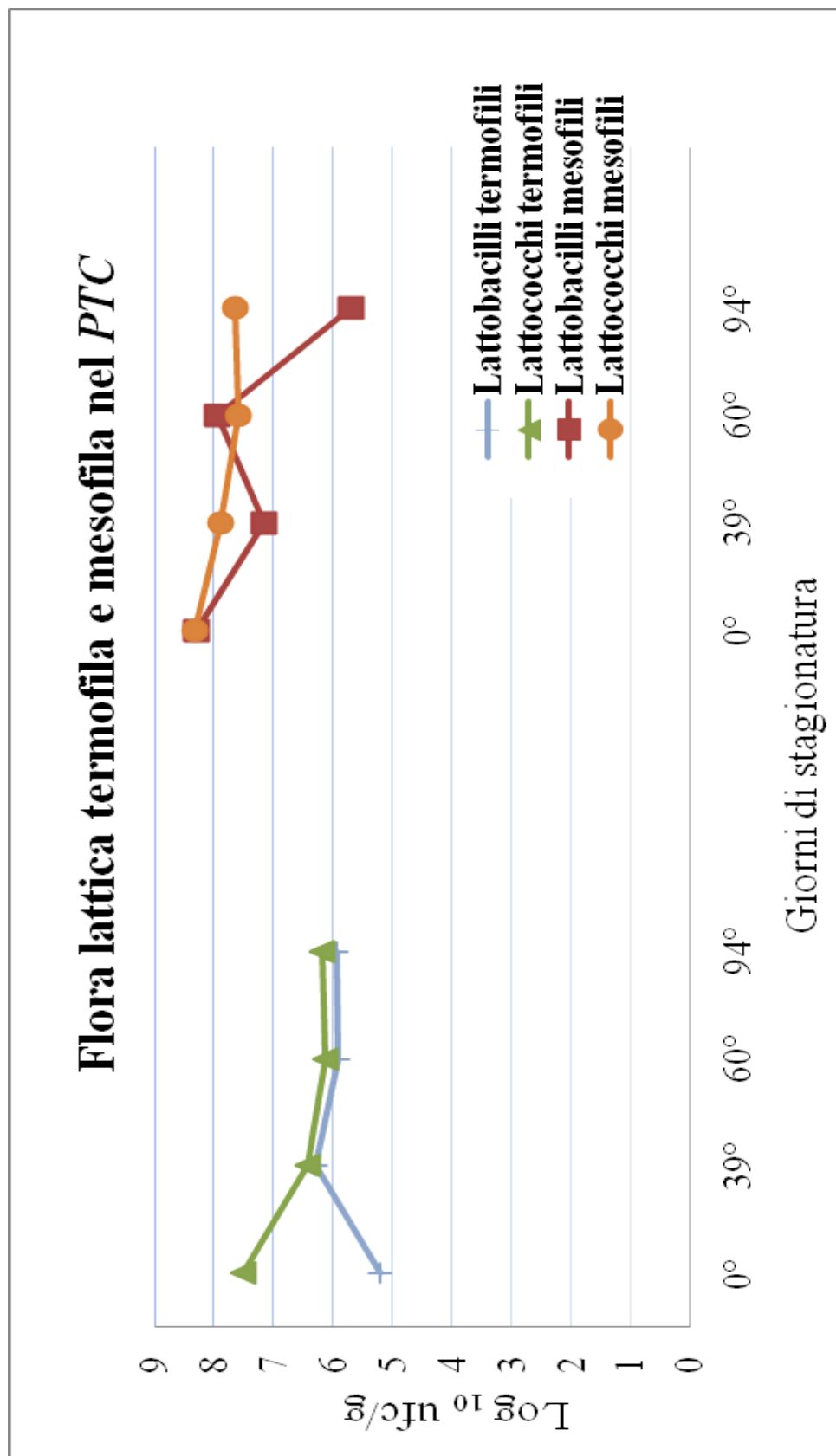
### 5.3 Risultati della determinazione di pH ed $a_w$ nel *PTC* e *PTS*

I risultati del pH e dell' $a_w$ , nel *PTC* e *PTS*, sono riportati nei Grafici n. 8 e n. 9. Il pH, nel pecorino appena prodotto, si è attestato a valori di 6.4 - 6.5 in entrambi i lotti, portandosi a valori di 5.6 – 5.7 a fine stagionatura.

In entrambi i lotti, l' $a_w$ , dal valore iniziale di 0,95 diminuisce gradualmente e costantemente durante la maturazione, per attestarsi, a fine stagionatura, sul valore di 0,88 descrivendo così una riduzione inversamente proporzionale alla stessa.

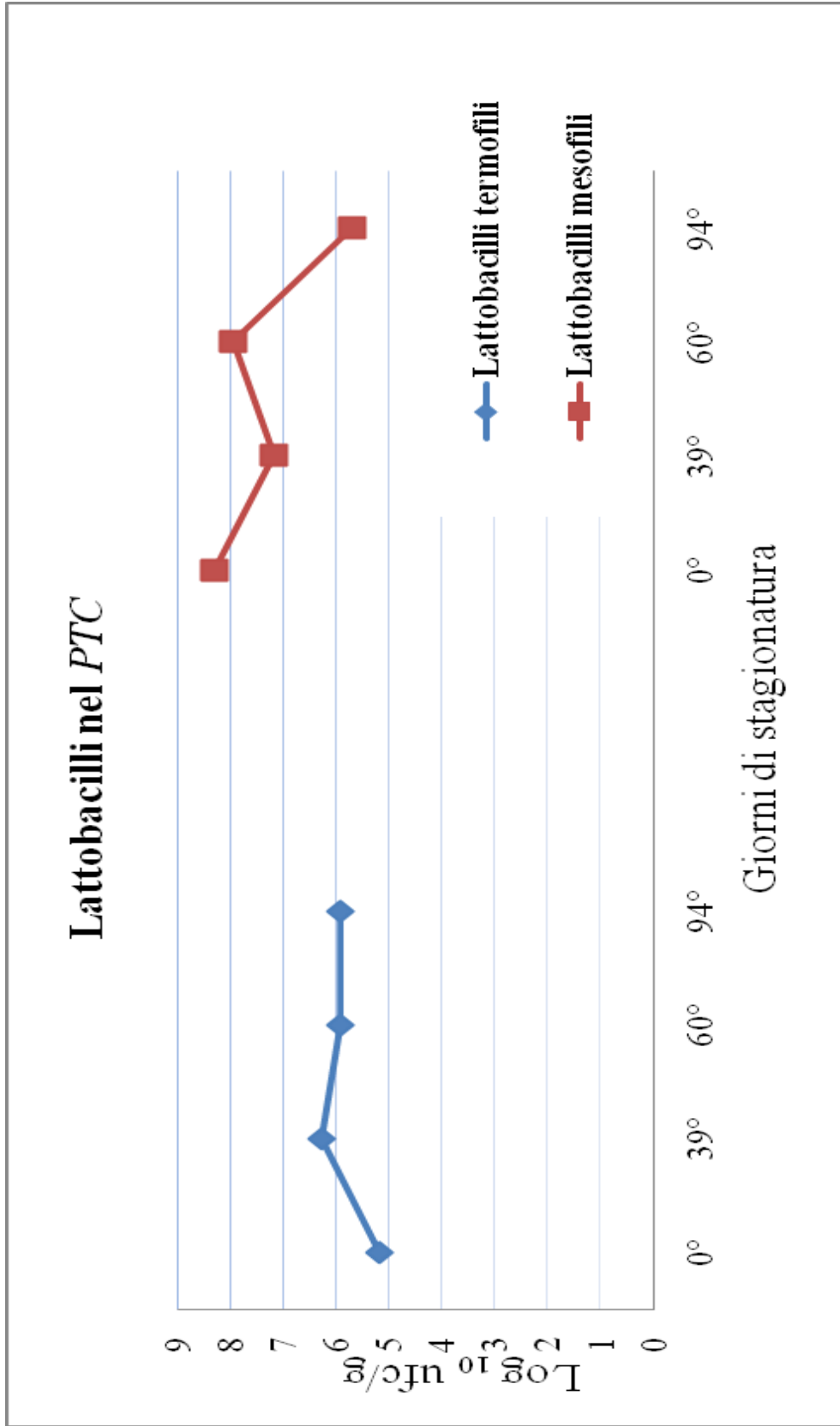
**5.6 Grafici relativi ai risultati della ricerca della flora lattica e della determinazione di pH e  $a_w$  nel *PTC* e nel *PTS***

**Grafico n.1** Andamento della flora lattica termofila e mesofila nel *PTC* in corso di stagionatura





**Grafico n.2 Andamento dei Lattobacilli nel PTC in corso di stagionatura**



**Grafico n.3** Andamento dei Lattococchi nel *PTC* in corso di stagionatura

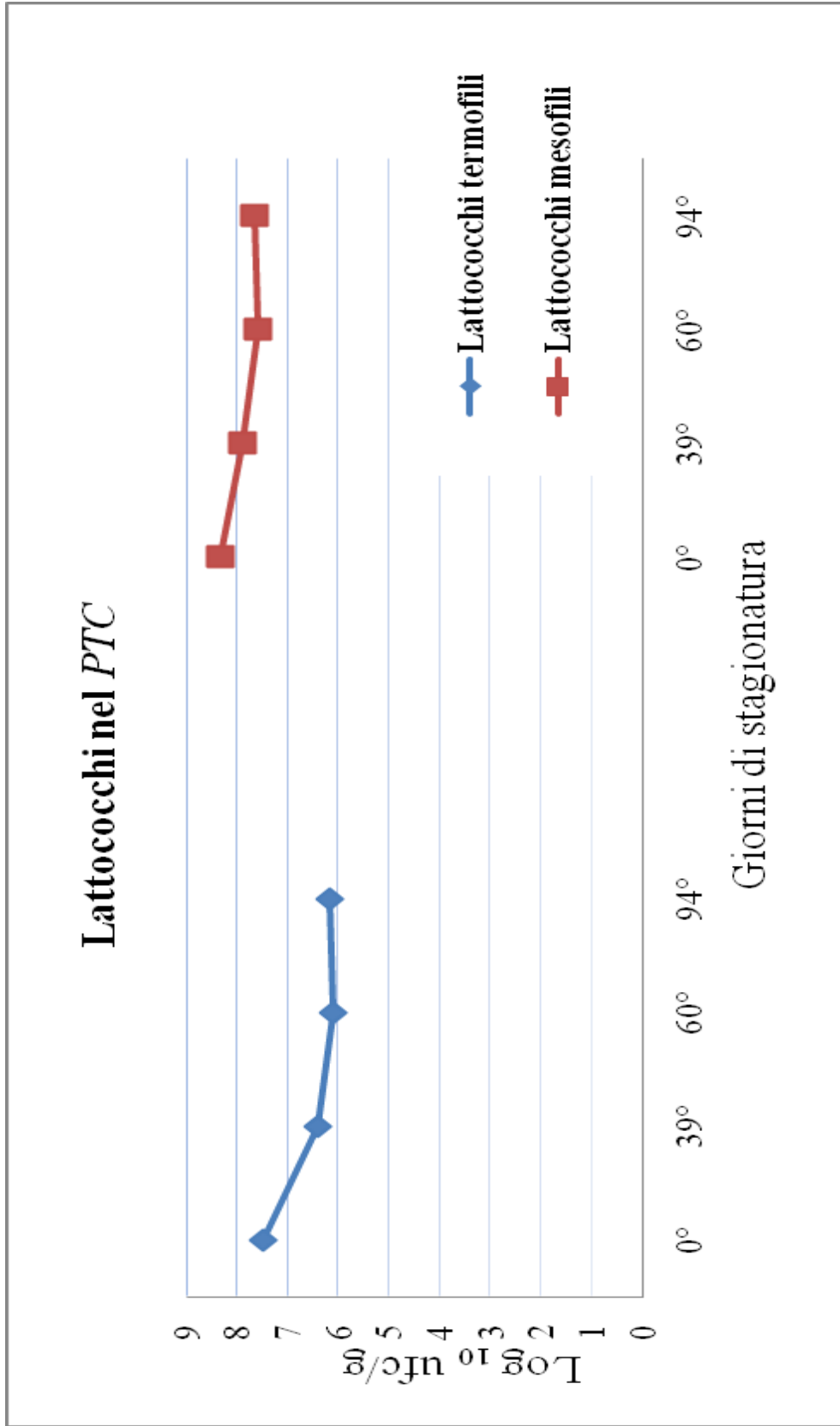
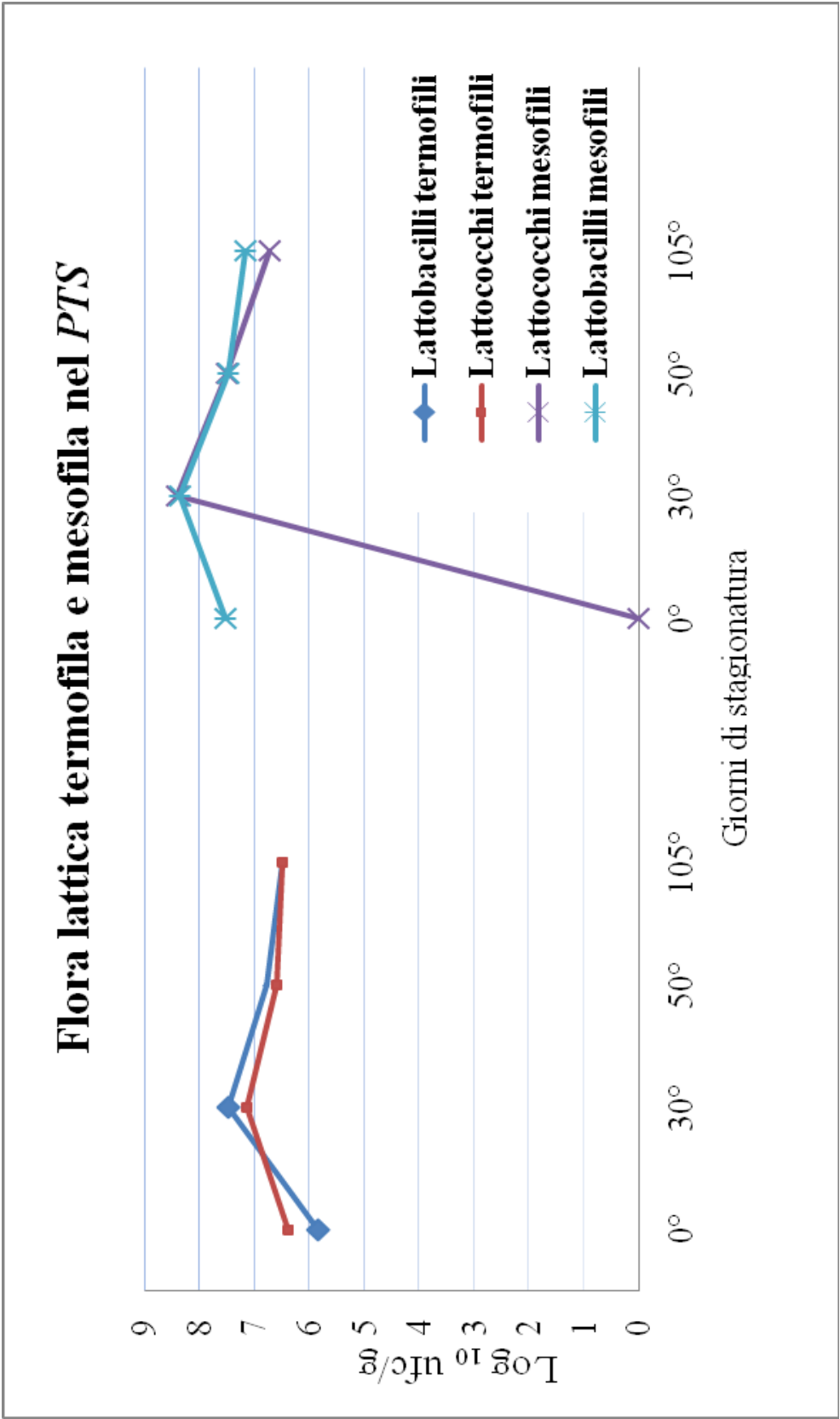
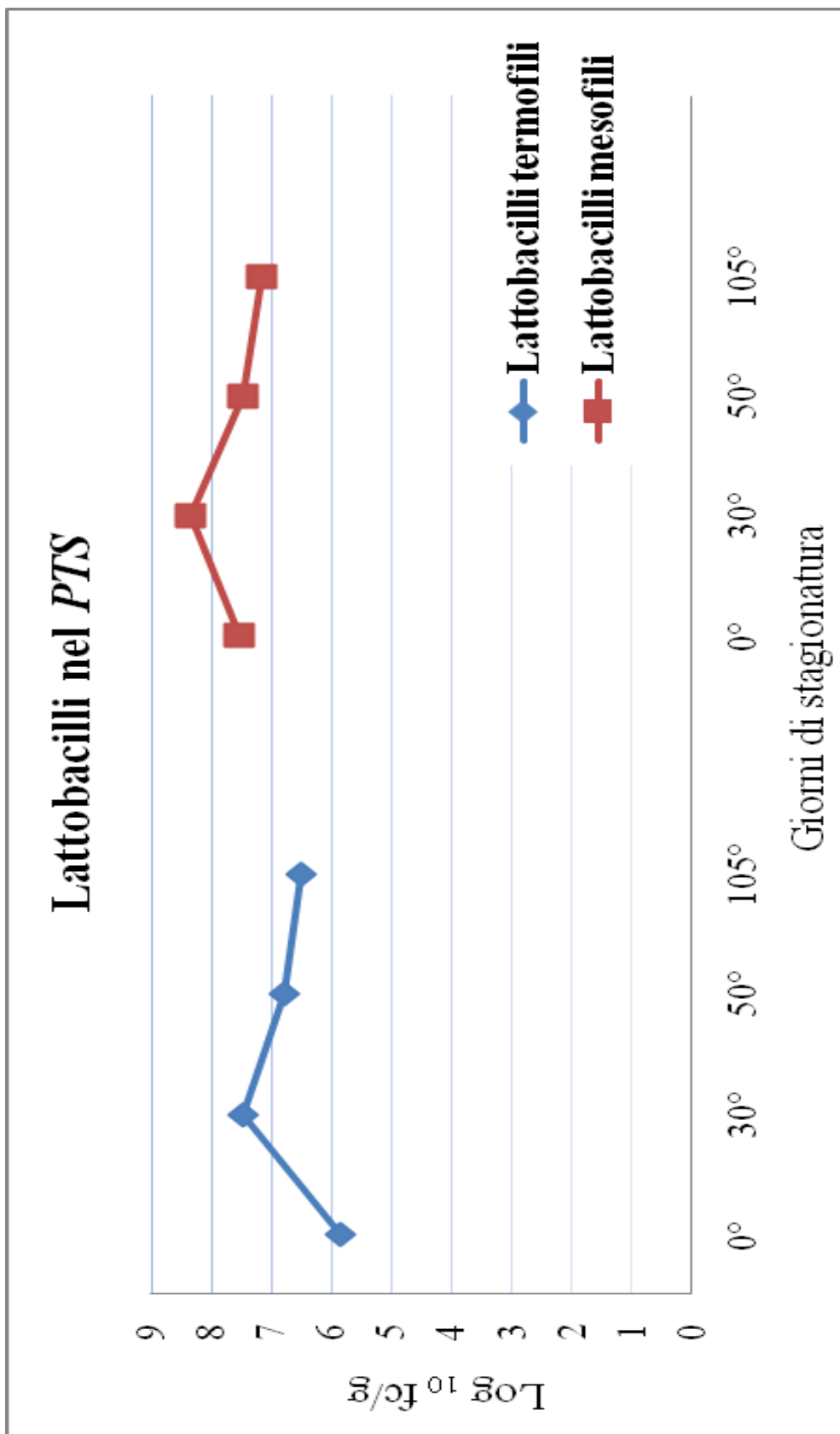


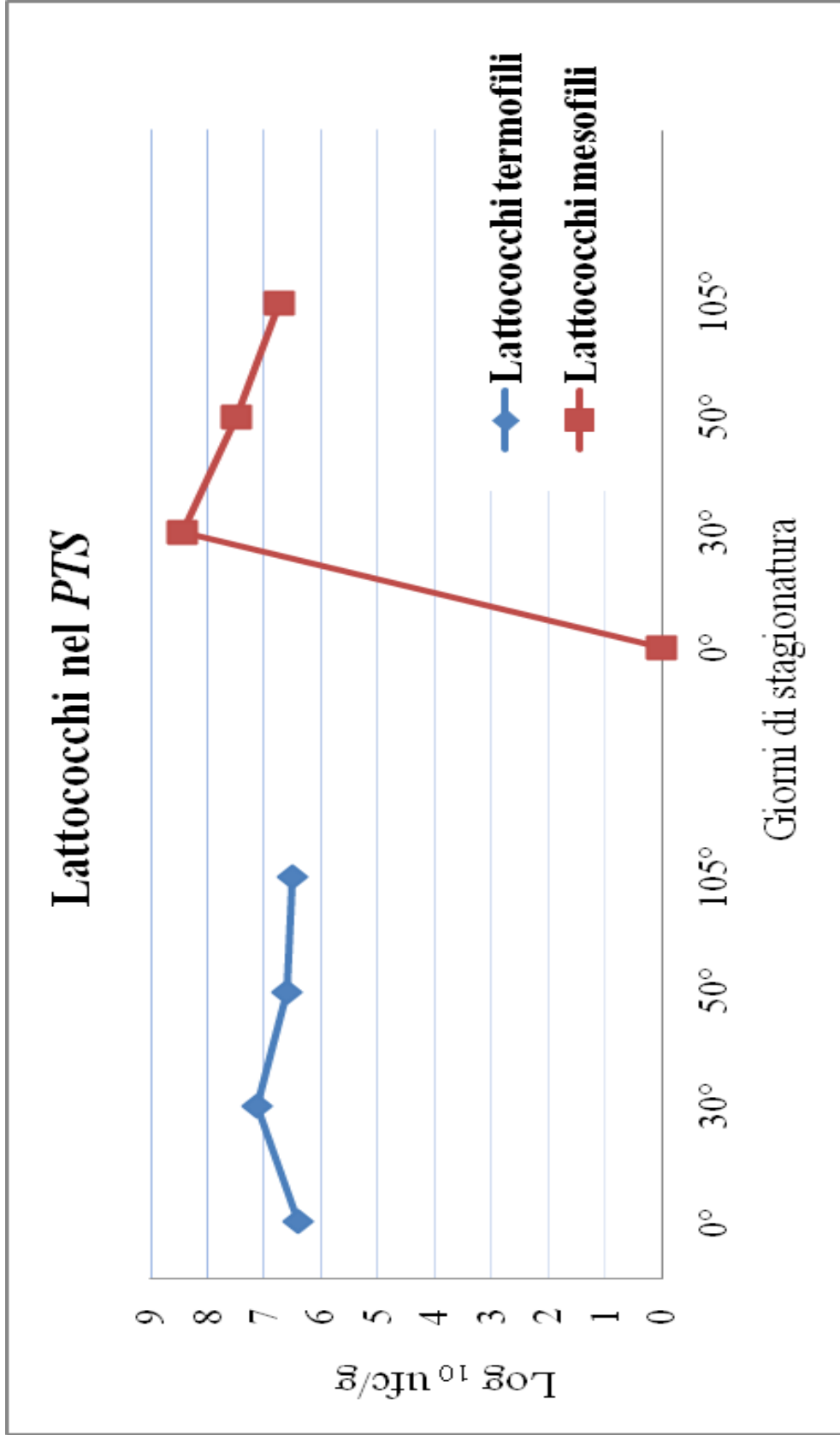
Grafico n. 4 Andamento della flora lattica termofila e mesofila nel PTS in corso di stagionatura



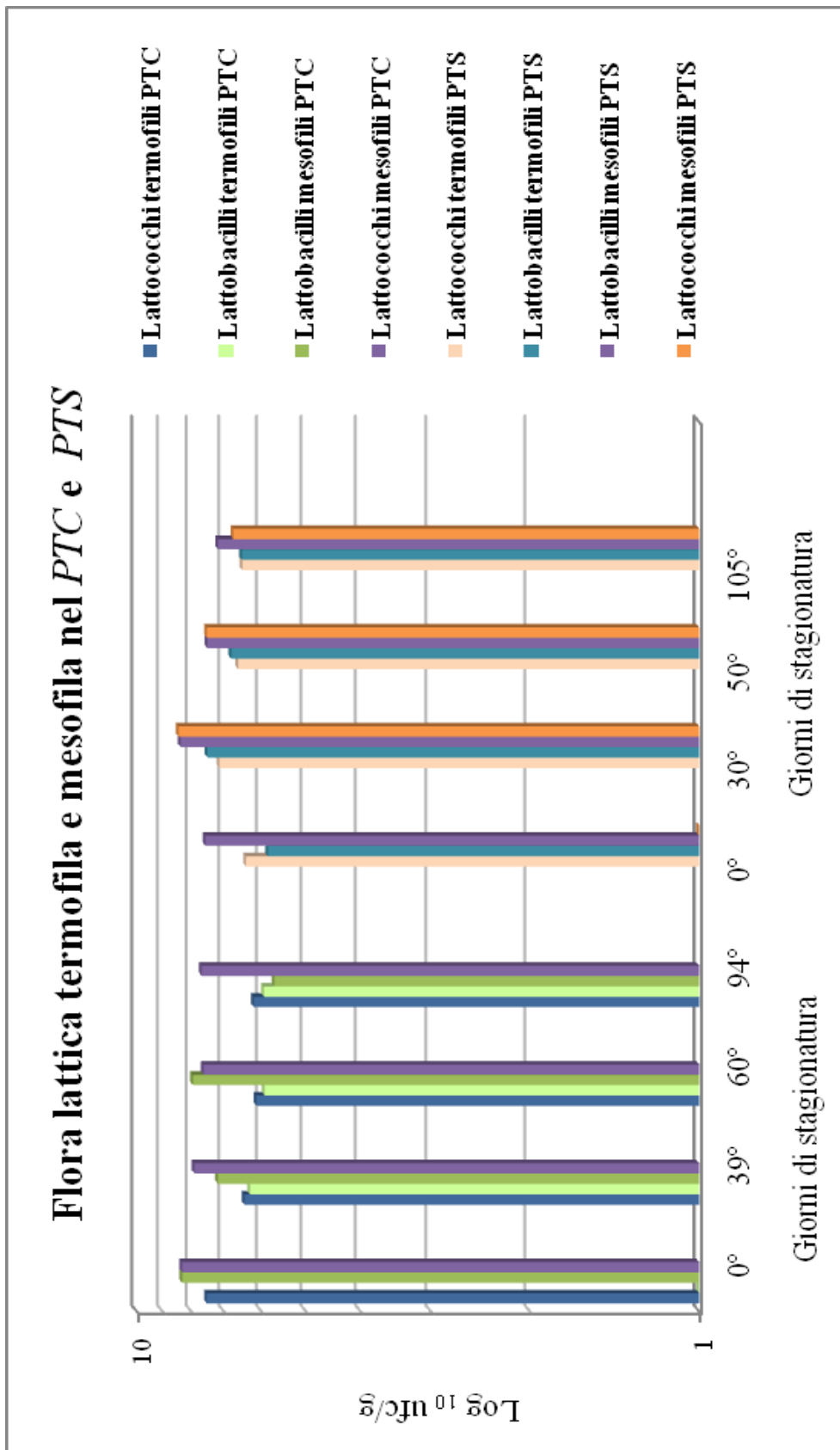
**Grafico n. 5** Andamento dei Lattobacilli nel PTS in corso di stagionatura



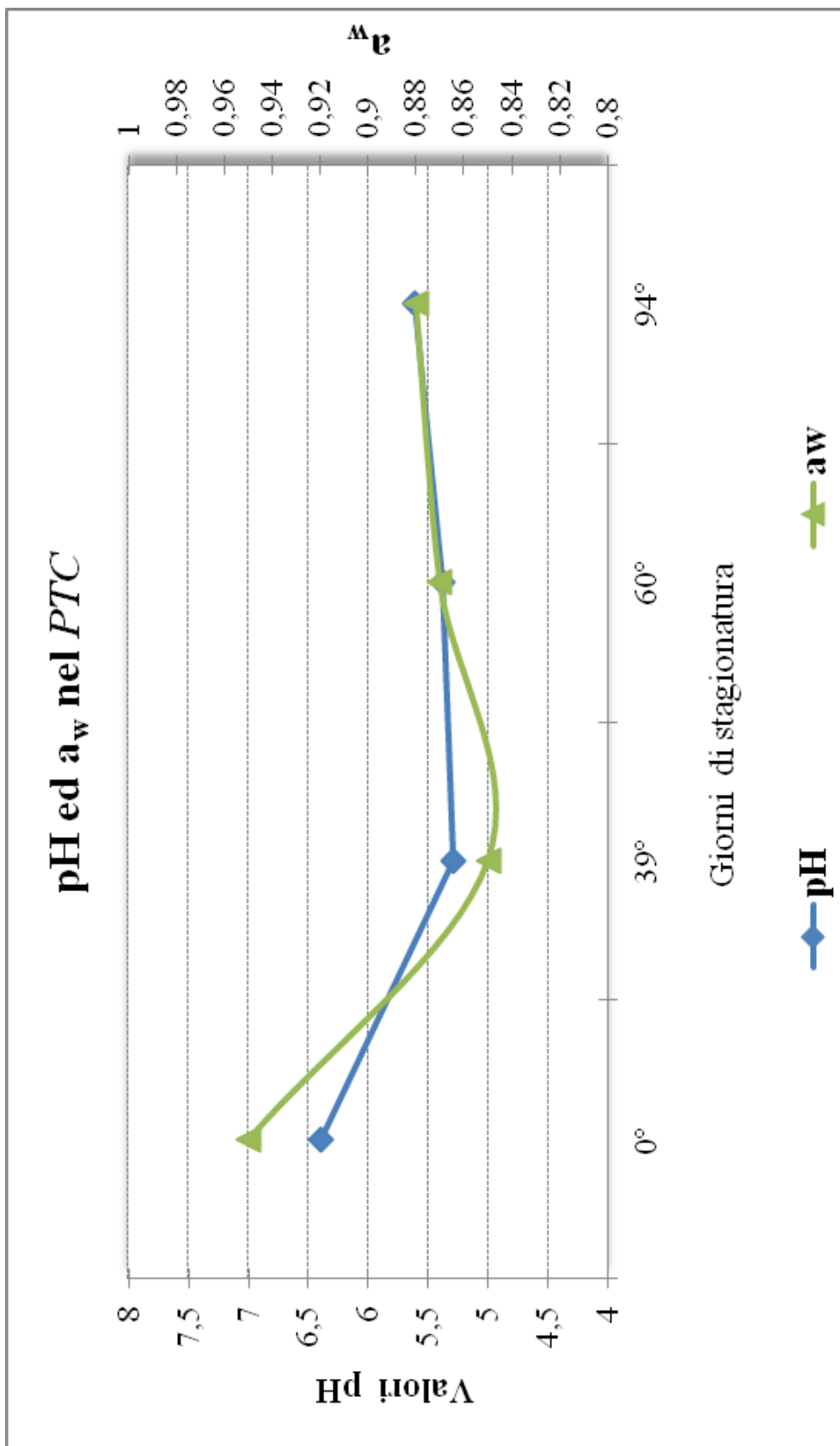
**Grafico n. 6** Andamento dei Lattococchi nel *PTS* in corso di stagionatura



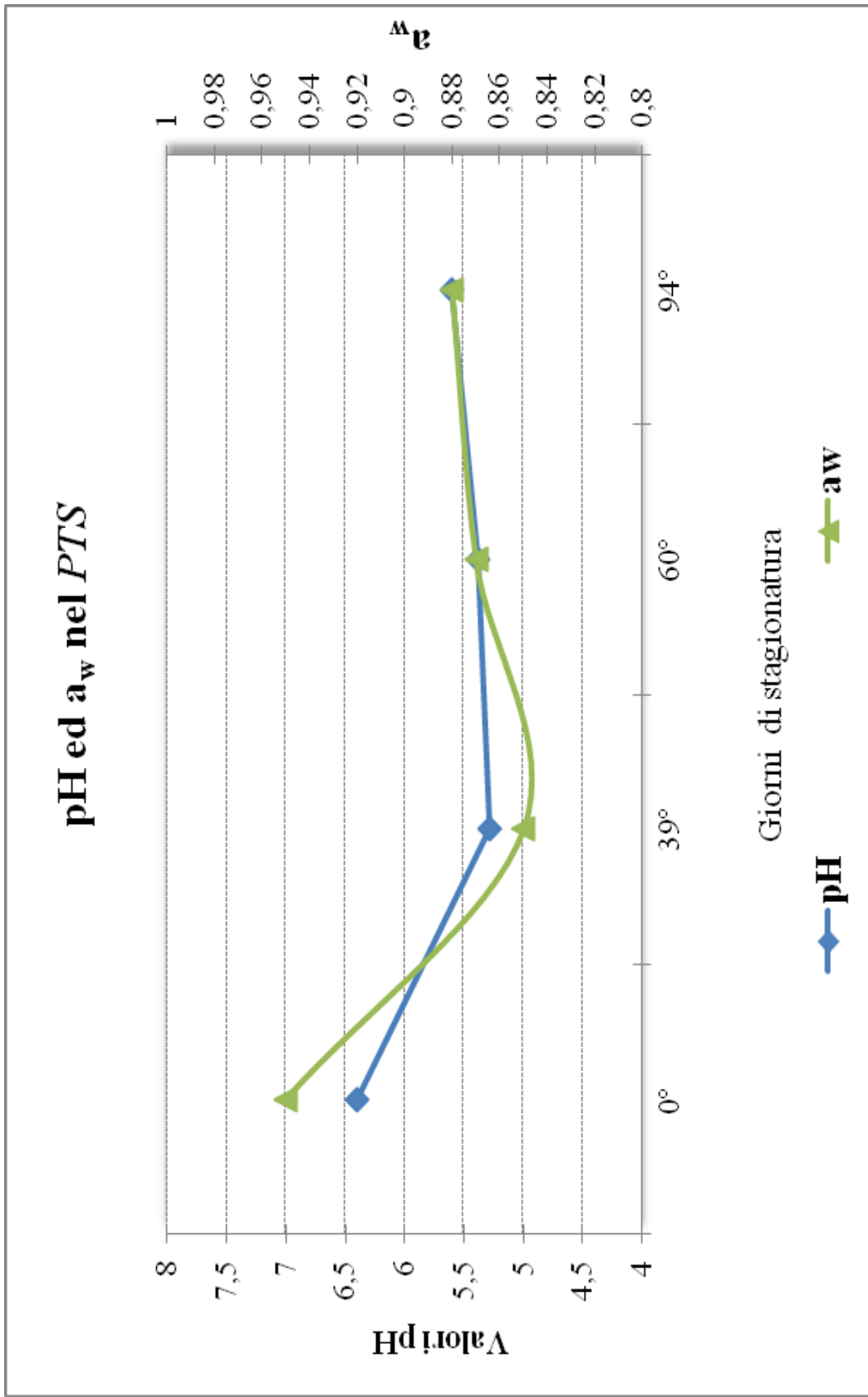
**Grafico n. 7** Andamento della flora lattica nel *PTC* e *PTS* in corso di stagionatura



**Grafico n. 8** Andamento del pH ed  $a_w$  nel PTC in corso di stagionatura



**Grafico n. 9** Andamento del pH ed  $a_w$  nel PTS in corso di stagionatura





## 5.7 Risultati della ribotipizzazione dei ceppi isolati dal PTC

La ribotipizzazione ha consentito l'identificazione a livello di specie di 101 ceppi lattici analizzati.

Il PTC è risultato caratterizzato dalla presenza di 4 specie di batteri lattici : *Lactococcus lactis spp.cremoris* , *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* ed *Enterococcus faecium* (Grafico n.10). Nelle Figure n. 28 e n. 29 sono visibili gli *Hind*III ed *Eco*I RFLP patterns ottenuti dai 101 ceppi lattici isolati dalle 4 u.c. di Pecorino di Tramonti Classico e l'analisi numerica della similarità (convertita in percentuale) degli stessi sotto forma di dendrogramma. L'identificazione delle specie di *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans*, è conseguita all'analisi comparativa tra gli rRNA *Hind*III patterns ed rRNA *Eco*RI patterns di due ceppi scelti come capostipiti dei suddetti cluster (Figura n.29).

*Enterococcus faecium* è risultata la specie lattica con la maggiore percentuale d'isolamento (70= 69,30%) seguita in ordine dal *Lactococcus lactis spp.cremoris* (19= 18,81%), *Enterococcus faecalis* (9= 8,91%) ed *Enterococcus durans* (3= 2,97 ) (Grafico n.10).

Il PTC è risultato caratterizzato durante la stagionatura da una flora lattica costituita in prevalenza dal genere *Enterococcus*. In particolare, *Enterococcus faecium* ha dominato in tutte le fasi di stagionatura tranne che nella unità campionaria analizzata al 39° giorno di stagionatura, in cui, invece, ha prevalso il *Lactococcus lactis spp.cremoris*. Quest'ultima specie lattica, seconda per isolamento, insieme a *Enterococcus durans*, è stata rilevata solo nelle u.c. di pecorino analizzate a 39/60 e a 39/94 giorni dalla produzione. Le percentuali

d'isolamento, per ciascuna specie lattica identificata durante la stagionatura del *PTC*, sono riportate nel Grafico n. 11.

## 5.8 Risultati della ribotipizzazione dei ceppi lattici isolati dal *PTS*

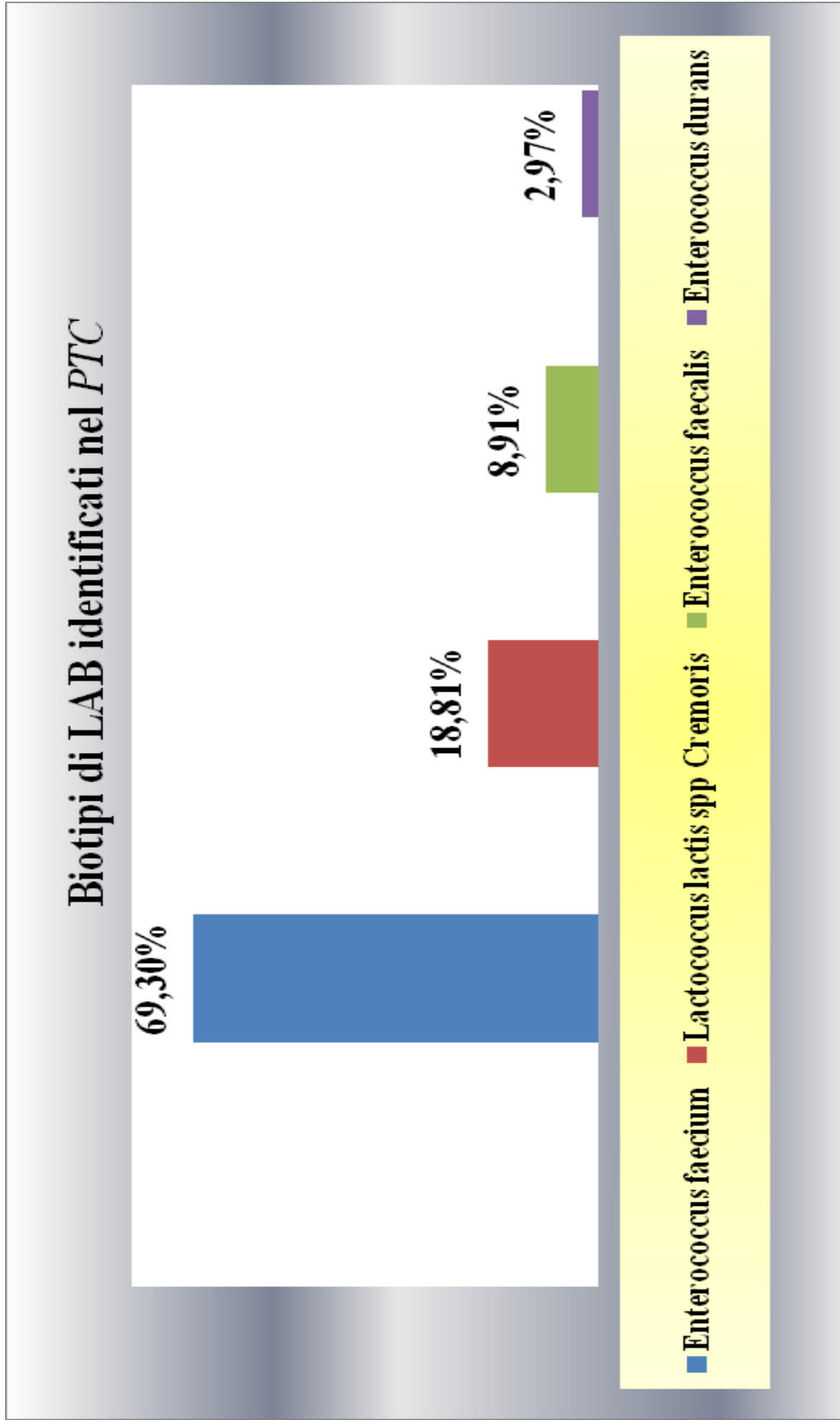
La ribotipizzazione ha consentito l'identificazione a livello di specie, di 67 presunti ceppi lattici. Nel *PTS* sono state identificate mediante rybotiping 4 specie di batteri lattici: *Lactococcus lactis* spp.cremoris, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* ed *Enterococcus faecium* (Grafico n.12). Le Figure n.30 e n.31 riportano gli *Hind*III ed *Eco*I RFLP patterns ottenuti dai 67 ceppi lattici isolati nelle 4 u.c. di Pecorino di Tramonti Speziato e l'analisi numerica della similarità (convertita in percentuale) degli stessi sotto forma di dendrogramma. L'identificazione delle specie di *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans*, è conseguita all'analisi comparativa tra gli rRNA *Hind*III patterns ed rRNA *Eco*RI patterns di due ceppi scelti come capostipiti dei suddetti cluster (Figura n.31).

Delle specie lattiche presenti nel *PTS*, *Lactococcus lactis* spp.cremoris costituisce il gruppo di starter autoctono dominante, mentre *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* ed *Enterococcus faecium* il gruppo di batteri non-starter (NSLAB). *Enterococcus faecium*, è stata la specie con la maggiore percentuale d'isolamento (43=64,17%) seguita in ordine dal *Lactococcus lactis* spp.cremoris (17= 25,37%), *Enterococcus faecalis* (4= 5,97%) ed *Enterococcus durans* (3= 4,47%) (Grafico n.11). Le 2 specie lattiche dominanti, *Enterococcus faecium* e *Lactococcus lactis* spp cremoris, hanno mostrato un comportamento

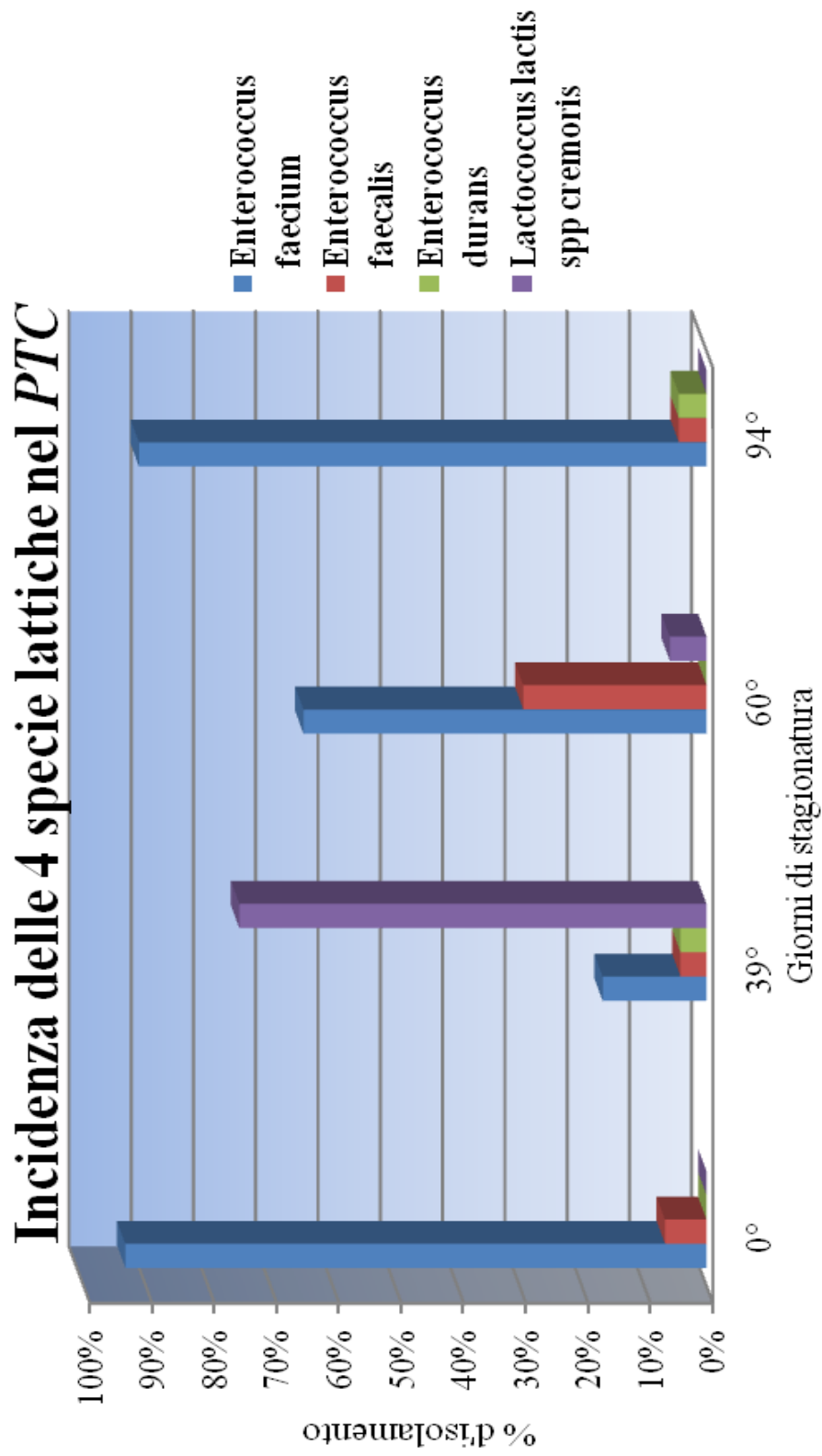
diverso: *Enterococcus faecium* è prevalso dall'inizio alla fine della stagionatura. *Lactococcus lactis spp. cremoris*, seconda specie lattica per isolamento nel *PTS*, è stata rilevata fino a 50 giorni di stagionatura. Delle altre specie del genere *Enterococcus* identificate con la ribotipizzazione, *Enterococcus durans* è stato rilevato a 0, 30 e 105 giorni di stagionatura mentre *Enterococcus faecalis* è risultata presente solo nelle 2 u.c. di pecorino analizzate a 30 e 105 giorni di stagionatura. Le percentuali d'isolamento, per ciascuna specie lattica identificata durante la stagionatura del *PTS*, è riportata nel Grafico n.13.

## **5.9 Grafici e Dendrogrammi relativi ai risultati della ribotipizzazione dei ceppi isolati dal *PTC* e *PTS***

**Grafico n. 10** Biotipi di LAB identificati e loro percentuale d'isolamento nel PTC

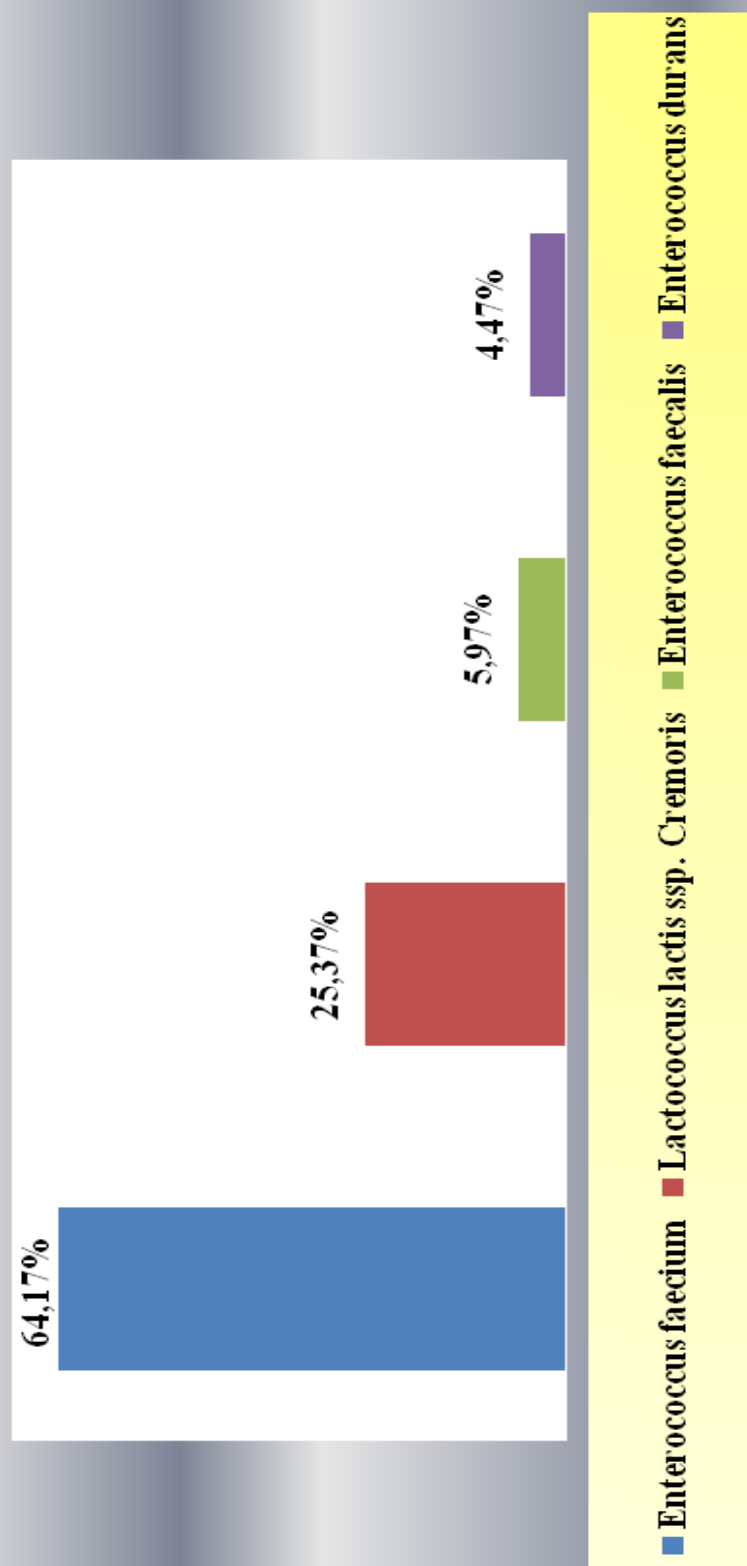


**Grafico n. 11** Incidenza delle 4 specie lattiche identificate nel *PTC* in corso di stagionatura

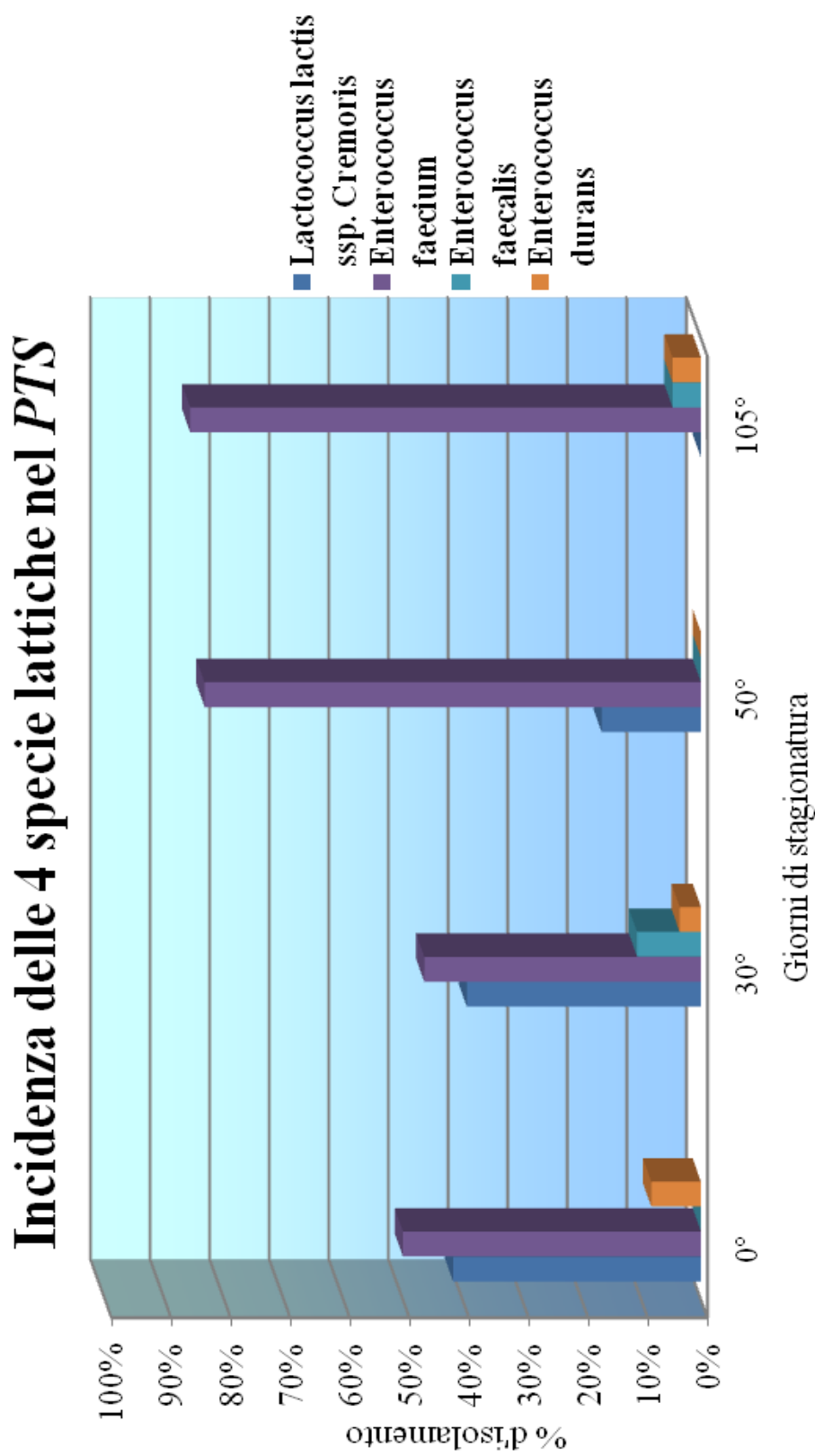


**Grafico n. 12** Biotipi di LAB identificati e loro percentuale d'isolamento nel *PTS*

### Biotipi di LAB identificati nel *PTS*

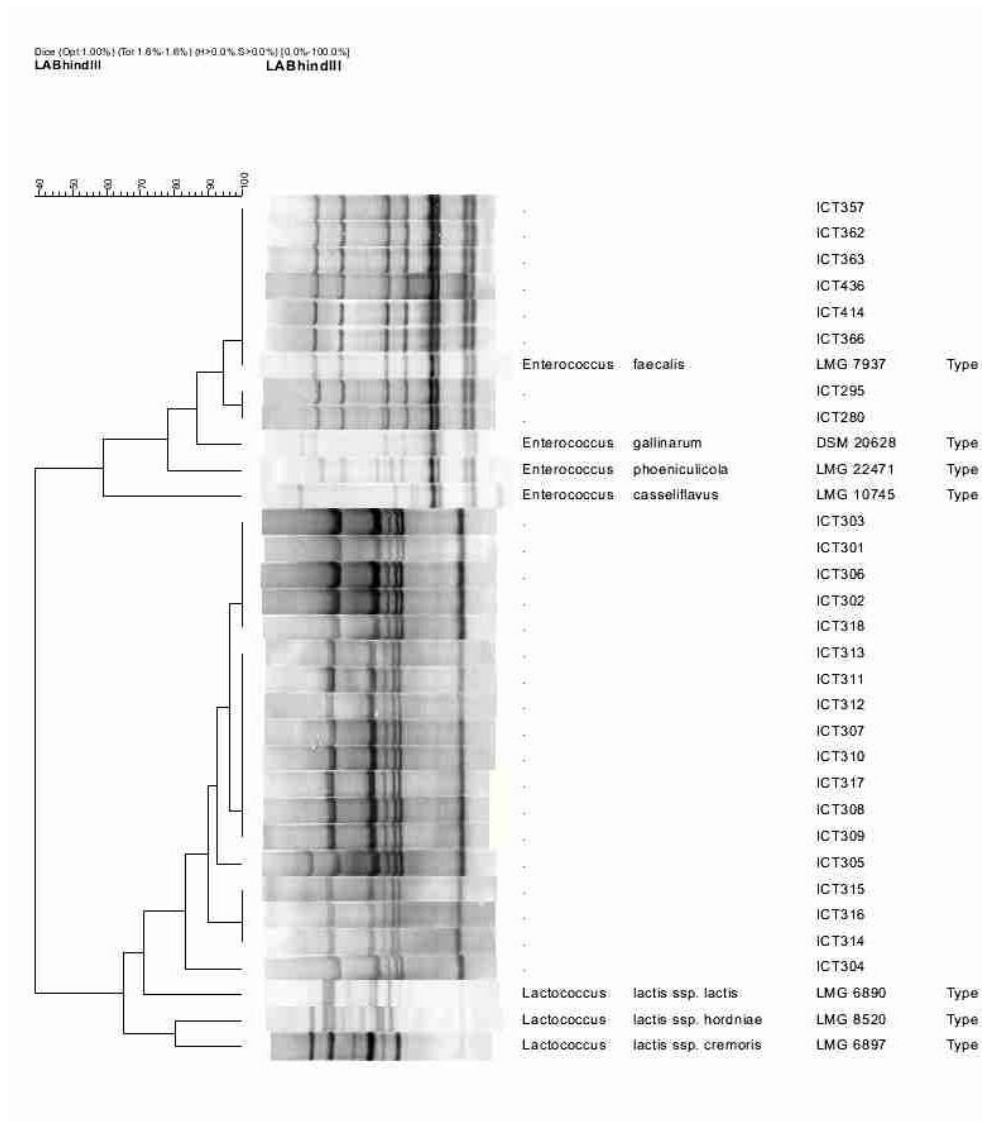


**Grafico n. 13** Incidenza delle 4 specie lattiche identificate nel *PTS* in corso di stagionatura

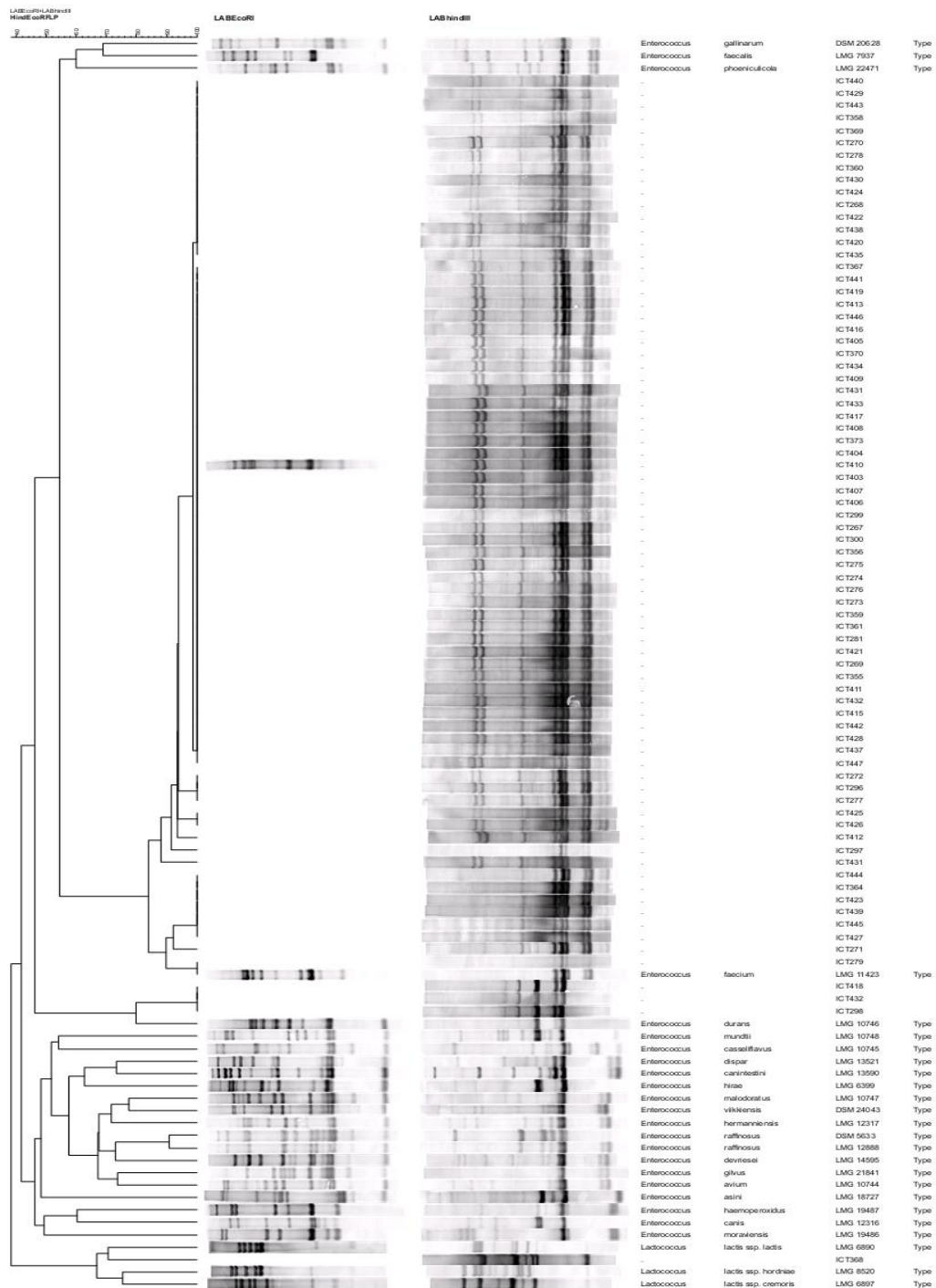




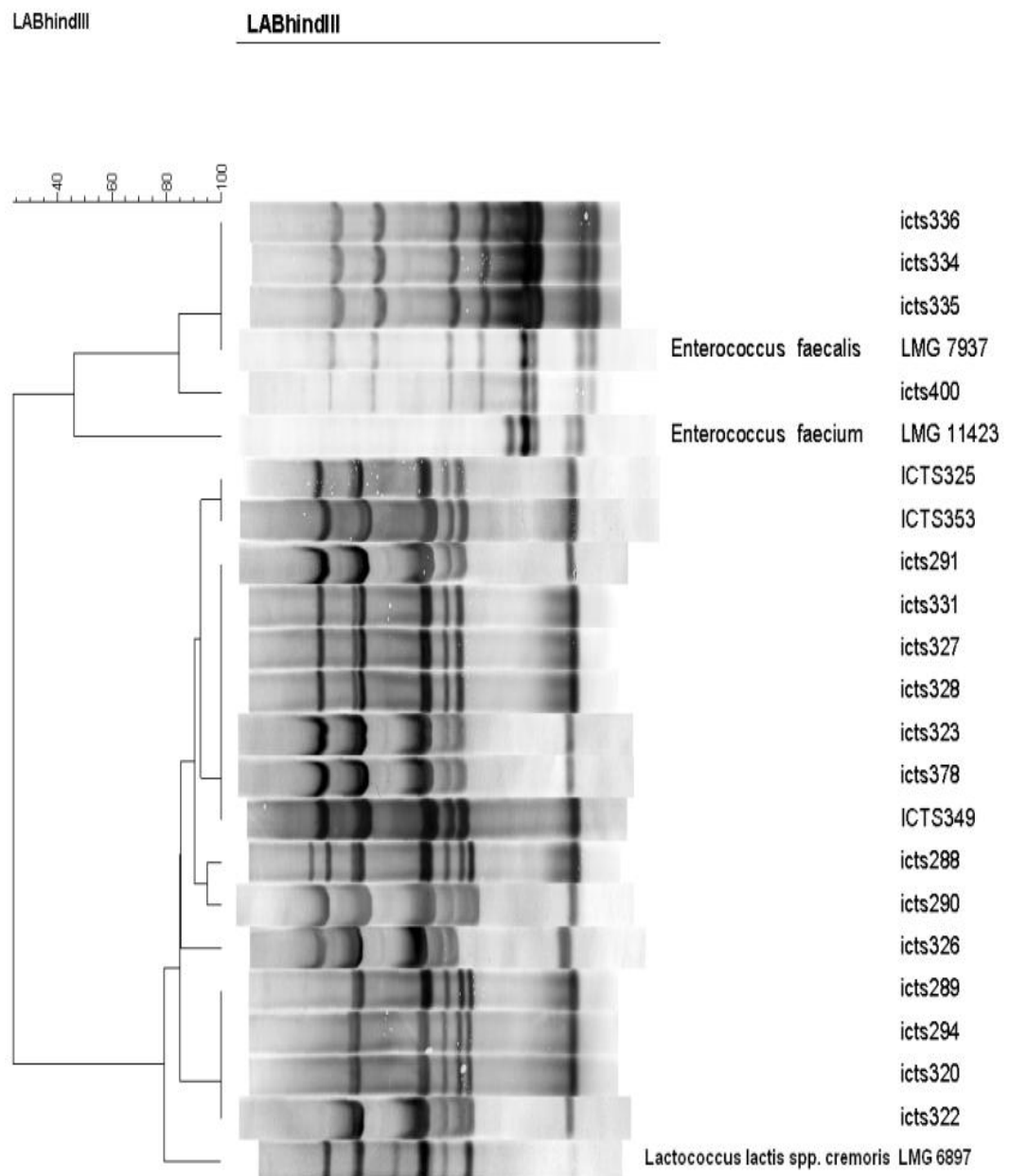
**Fig. n. 28 Dendrogramma ottenuto con i rRNA *Hind*III restriction patterns raffigurante i cluster di *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* e di *Enterococcus faecalis* nel PTC**



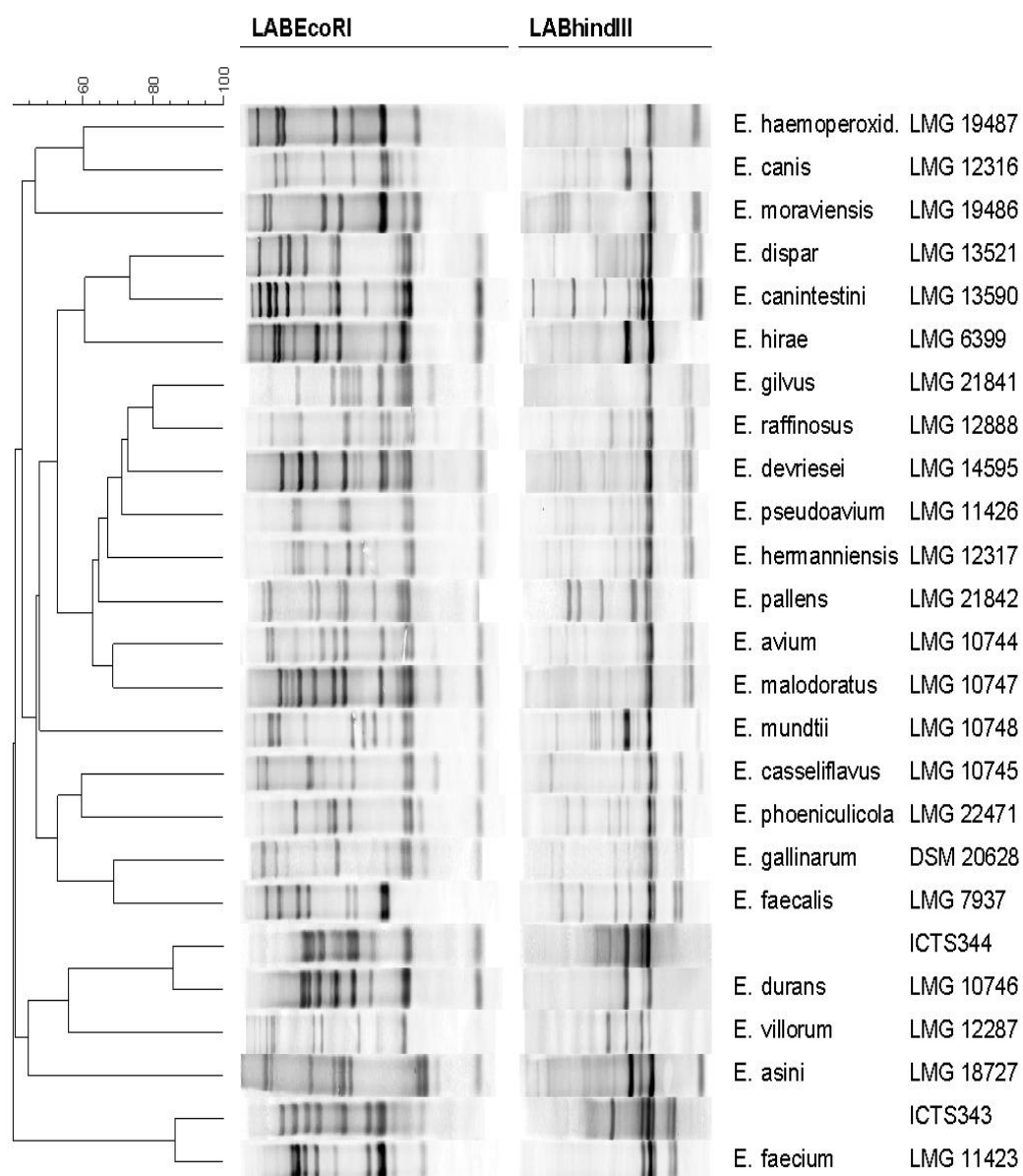
**Fig. n. 29 Dendrogramma ottenuto dalla comparazione dei rRNA *Hind*III e *Eco*RI restriction patterns dei 2 ceppi isolati dal *PTC*, scelti a rappresentare i cluster di *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans***



**Fig. n. 30** Dendrogramma ottenuto con i rRNA *Hind*III restriction patterns raffigurante i cluster di *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* e di *Enterococcus faecalis* nel PTS



**Fig. n. 31 Dendrogramma ottenuto dalla comparazione dei rRNA *Hind*III e *Eco*RI restriction patterns dei 2 ceppi isolati dal *PTS*, scelti a rappresentare i cluster di *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans***



## **6. CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI**

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi sulla flora lattica dei prodotti lattiero caseari sia tipici che artigianali piuttosto che industriali.

Innumerevoli sono i protagonisti che concorrono alla determinazione dell'unicità dei formaggi artigianali come la natura della materia prima, il territorio di produzione, la tecnologia di lavorazione e le interazioni microbiche che si sviluppano in tali prodotti.

Come sottolineato da diversi Autori, i formaggi a latte crudo devono la loro tipicità alla tipologia ed allo sviluppo di batteri starter e non starter LAB autoctoni che già presenti nel latte crudo (Buffa *et al.*, 2001; Chaves-Lòpez C. *et al.*, 2006; Neviani *et al.*, 2006; Coda R. *et al.*, 2006) continuano a svilupparsi durante le fasi di maturazione e stagionatura dei formaggi (Chaves-Lòpez *et al.*, 2006).

I risultati del presente lavoro 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 di Tramonti Classico ed del Pecorino di Tramonti Speziato.

Le curve di crescita della microflora lattica, mai prima esaminate, assimilabili nei 2 lotti di Pecorino di Tramonti, sono state caratterizzate da cariche di lattobacilli e lattococchi

sempre superiori a  $\log_{10} 5$  ufc/g, analogamente a quanto riscontrato da altri autori in formaggi tradizionali (Giraffa, G. (2003; Murru N., *et al.*, 2009; Scatassa, M.L., *et al.*, 2005).

I lattobacilli hanno mantenuto valori relativamente alti a partire dal giorno 0 fino al 60° giorno di stagionatura in entrambi i lotti, mentre i lattococchi hanno mostrato il valore più elevato fino al primo mese di stagionatura, contribuendo all'acidificazione del formaggio.

Entrambi i lotti di Pecorino di Tramonti sono stati dominati, durante l'intero periodo di stagionatura, dalla flora lattica mesofila. In particolare, i lattococchi mesofili hanno presentato cariche elevate (tra  $\log_{10} 7$  e  $8$  ufc/g) nel primo di stagionatura esplicando un'attività da starter acidificante, come comprovato dall'andamento del pH, che da valori iniziali di 6.5 della forma al giorno 0 scende a valori di 5.2 al primo mese di stagionatura (Grafici n. 8 e n. 9).

Certamente, i lattococchi e lattobacilli termofili hanno esplicato un'azione di supporto nell'acidificazione della cagliata, mostrando infatti cariche massime comprese tra  $\log_{10} 6$  e  $7$  ufc/g nei primi 30 giorni di stagionatura (Grafico n. 7 ). Con il progredire della stagionatura, si è assistito ad un aumento del pH in entrambi i lotti di pecorino, relazionabile alle alte cariche dei lattobacilli mesofili, come riportato anche da Capobianco *et al.*, 2005. Questi hanno mantenuto cariche elevate tra  $\log_{10} 6$  e

7 ufc/g fino alla fine della stagionatura, come rilevato per altri formaggi pecorini italiani (Coda R., *et al.*, 2006). L'andamento della flora lattica del *PTC* e *PTS*, esaminata nel presente lavoro, testimonia l'avvicinarsi di comunità batteriche a cui si assiste frequentemente durante la stagionatura di un formaggio. Mentre una larga parte ( $\geq 8.0 \log_{10}$  cfu/g) di starter declina durante la stagionatura, i NSLAB aumentano approssimativamente di  $\log_{10}$  3,00 ufc/g, rispetto al valore enumerabile in un latte crudo prodotto nel rispetto delle norme igieniche, raggiungendo circa  $\log_{10}$  6 ufc/g nel formaggio stagionato (Berthier *et al.*, 2001). Infatti, costituiscono microorganismi che crescono alle basse temperature; sono acido tolleranti; tollerano la carenza di carboidrati fermentescibili, bassi valori di pH, di  $a_w$  e la presenza di batteriocine che rendono le condizioni ambientali molto ostili durante la stagionatura. I NSLAB trovano alcuni componenti per la crescita durante la stagionatura del formaggio (es. lattato, citrato, glicerolo, zuccheri, aminoacidi ed altri metaboliti (Peterson and Marshall, 1990; Wouters *et al.*, 2002).

La maggior parte dei Pecorini Italiani ha una carica di NSLAB pari a  $\log_{10}$  6.0 cfu/g a fine stagionatura, fanno eccezione il Pecorino Umbro ed il Pecorino di Pienza, ottenuti da latte pastorizzato. Studi recenti hanno dimostrato come la principale fonte di NSLAB sia il latte (Buffa *et al.*, 2001) per cui anche se alcuni ceppi di lattobacilli possono sopravvivere al



trattamento termico, (Jordan and Cogan, 1999), la maggioranza è inattivata dalla pastorizzazione (Turner *et al.*, 1986). Di fatto, l'utilizzo, nell'intera tecnologia di produzione dei 2 lotti di Pecorino di Tramonti, di temperature sempre inferiori ai 40°C preserva la popolazione di NSLAB presente nel latte crudo usato per la caseificazione, come dimostra d'altronde il recupero al giorno 0 di elevate cariche di NSLAB ( $\log_{10}$  8,3 ufc/g e  $\log_{10}$  7,54 ufc/g nel *PTC* e *PTS*).

Quale metodo di caratterizzazione molecolare dei ceppi lattici isolati è stato selezionato il Ribotyping per il suo ampio utilizzo nella tipizzazione genetica di diverse specie batteriche inclusi i batteri lattici (González, L., *et al.*, 2007; Köhler, G., *et al.*, 1991; Rodtong, S., *et al.*, 1993). A dimostrazione di ciò, nel nostro studio, tutti i 101 ceppi, nel *PTC*, e 66 nel *PTS*, sono stati tipizzati 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 d'identificazione dei LAB del Dipartimento d'Igiene degli Alimenti dell'Università di Helsinki.

Lo studio molecolare della flora lattica isolata dai 2 lotti di Pecorino di Tramonti ha permesso di rilevare la presenza di 2 soli generi di LAB: *Lactococcus* ed *Enterococcus*, come

evidenziato in precedenti studi su formaggi artigianali a latte crudo (Barile M. *et al.*, 2009; Cogan, T.M., *et al.*, 1997).

*Lactococcus lactis spp. cremoris* è risultata l'unica specie del genere *Lactococcus* presente nei 2 lotti di Pecorino di Tramonti: questa ha dominato fino al primo mese di stagionatura, esplicando un'essenziale attività starter coadiuvata certamente da quella dei batteri del genere *Enterococcus*, che hanno, infatti, anche una buona attività acidificante (Cogan, T.M., *et al.*, 1997).

Di fatto, la prevalenza di generi omofermentanti quali *Lactococcus* ed *Enterococcus* nella primissima fase della stagionatura, ha sicuramente avuto un ruolo determinante nell'acidificazione della cagliata (Dellaglio, *et al.*, 1995).

Il loro metabolismo, infatti, provoca una diminuzione del pH tale da demineralizzare la caseina, primo importante passo verso la caseificazione. Questo ha condotto ad un buon processo di acidificazione dei 2 lotti di Pecorino di Tramonti, raggiungendo a 30-39 giorni di stagionatura, valori di pH di 5.29.

Il genere *Enterococcus* ha caratterizzato tutte le fasi di stagionatura nei 2 lotti di Pecorino di Tramonti, in accordo con studi precedenti (Giraffa, G. 2003).

In particolare, *Enterococcus faecium* ha prevalso sulle altre 2 specie di *Enterococcus* identificate, ed è risultata la specie lattica in assoluto dominante dai 30-40 giorni di stagionatura in poi, in entrambi i lotti.

Questi microrganismi, essendo diffusi anche negli ambienti di lavorazione, sono sovente isolati da produzioni casearie artigianali (Rossi *et al.*, 1994; Macedo *et al.*, 1995; Pedonese *et al.*, 2002). La presenza e la permanenza di tali germi, nel corso della stagionatura, potrebbe essere associata ad una contaminazione durante le fasi di lavorazione ed alla capacità di tali microrganismi di crescere ad elevate concentrazioni saline, ad alte temperature e bassi valori di pH (Gelsomino, R., *et al.*, 2002; Giraffa, G. 2003).

D'altro canto, questi microrganismi non possono però essere considerati dei meri contaminanti tanto che, alcuni Autori riconoscono loro un ruolo filo-caseario e li impiegano, come starter, per la produzione di formaggi diversi (Cenci Goga *et al.*, 1995). Di fatto, *Enterococcus*, ha sicuramente ricoperto, nei primi 30-40 giorni di stagionatura dei 2 lotti di Pecorino di Tramonti, un ruolo di supporto a quello di starter principale di *Lactococcus lactis spp. cremoris*, per poi affermarsi come specie NSLAB dominante esplicando una funzione significativa nella maturazione in relazione al loro potere proteolitico (Cogan, T.M., *et al.*, 1997).

Giraffa, Carmonati e Neviani (1997) sottolineano il loro importante ruolo nello sviluppo del flavour durante la maturazione dei formaggi, ricordando che in alcuni casi possono agire come alteranti degli stessi prodotti.

Concludendo possiamo affermare che, la flora lattica studiata in questa ricerca dimostra un ruolo ben preciso durante la caseificazione e la stagionatura dei 2 lotti di Pecorino di Tramonti a latte crudo senza aggiunta di starter.

I lattococchi, probabilmente assieme agli Enterococchi, avviano l'acidificazione della cagliata e, quindi, il processo di caseificazione. Durante la maturazione del formaggio, gli stessi lattococchi, svolgono un'iniziale attività proteolitica di supporto alla principale svolta dagli Enterococchi, contribuendo a conferire sapore al prodotto.

Lo studio effettuato ha consentito di individuare, nei 2 lotti di Pecorino 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 (Barile M., *et al.*,

2009). 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.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

**Adda J, Gripon JC, Vassal L** (1982) The chemistry of flavour and texture generation in cheese. *Food Chem.* 9:115–129.

**Almeida, K., Tamime, A., Oliveira, M.** (2008) Acidification rates of probiotic bacteria in Minas frescal cheese whey. *LWT Food Sci. Technol.* 41, p. 311-316.

**Alting AC, Engels WJM, Van Schalkwijk S, Exterkate FA** (1995) Purification and characterization of cystathionine beta-lyase from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B78 and its possible role in flavor development in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4037–4042.

**Amann R, Fuchs BM, Behrens S** (2001) The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation. *Curr Opin Biotechnol.* 12:231–236.

**Amor KB, Vaughan EE, de Vos W** (2007) Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria. *J. Nutrition.* 137:741- 747.

**Andrighetto C, De Dea P, Lombardi A** (1998) Molecular Identification and Cluster Analysis of Homofermentative Thermophilic Lactobacilli Isolated from Dairy Products. *Res. Microbiol.* 149:631–643.

**Antonsson, M., Molin, G., Ardö, Y.** (2003) Lactobacillus strains isolated from Danbo cheese as adjunct cultures in a cheese model system. *Int J Food Microbiol* 85, p. 159- 169.

**Aston J. W., Dulley J. R.** (1982) Cheddar cheese flavour. *Australian Journal of Dairy Technology*, 37: 59-64.

**Axelsson L** (1998) Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A (eds) Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, New York, pp 1– 72.

**Ayad EHE, Verheul A, de Jong C, Wouters JTM, Smit G** (1999) Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin, *Int. Dairy J.* 9:725–735.

**Ayad EHE, Verheul A, Wouters JTM, Smit G** (2000) Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *Int. Dairy J.* 10:169–179.

**Banks, J.M., Williams, A.G.** (2004) The role of the nonstarter lactic acid-bacteria in Cheddar cheese ripening. *Int J Dairy Technol* 57, p.145-152.

**Banks, J.M., Williams, A.G.** (2004) The role of the nonstarter lactic acid-bacteria in Cheddar cheese ripening. *Int J Dairy Technol* 57, p.145-152.

**Barile M., Murru N., Mormile A., Ceres C., Cortesi M.L.** (2009) 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. Girona, Catalunya, Spain.

**Battistotti, B., Bottazzi, V.** Microbiologia e tecnologia dei lattii fermentati. ITEMS *I lattii fermentati*. Istituto Danone Milano. p. 35-72.

**Bautista-Garfias, C.R., Ixta-Rodriguez, O., Martinez-Gomez, F.** (2001) Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite*; 8 (supplement 2), S226- S228.

**Beresford T. P., Fitzsimons N. A., Brennan N. L., Cogan T. M.** (2001) Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy Journal* , 11: 259-274.

**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, Krieg, N.R. and Holt, J.G., Eds., Baltimore: *Williams and Wilkins*, 1984, vol. 2.

**Berthier, F., E. Beuvier, A. Dasen, and R. Grappin.** (2001) Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte`cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *Int. Dairy J.* 11:293–305.

**Berthier, F., E. Beuvier, A. Dasen, and R. Grappin.** (2001) Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte`cheese, as revealed by PCR with repetitive and species-specific primers. *Int. Dairy J.* 11:293–305.

**Berthier, F., E. Beuvier, A. Dasen, and R. Grappin.** (2001) Origin and diversity of mesophilic lactobacilli in Comte` cheese, as revealed by

PCR with repetitive and species-specific primers. *Int. Dairy J.* 11:293–305.

**Beuchat, L. R., & Golden, D. A.** (1989) Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43(1), 134–142.

**Bhownik T, Marth EH** (1990) Esterases of *Micrococcus* and *Pediococcus* species in cheese ripening: a review, *J. Dairy Sci.* 73:879–886.

**Bills D. D., Morgan M. E., Libbey L. M., Day E. A.** (1965) Identification of compounds responsible for fruity flower defect of experimental Cheddar cheeses. *J. Dairy Sci.* , 48: 1168-1173.

**Bolotin AB, Quinquis P, Renault A, Sorokin SD, Ehrlich S, Kulakauskas A, Lapidus E, Goltsman M, Mazur GD, Pusch M, Fonstein R, Overbeek N, Kyprides B, Purnelle D, Prozzi K, Ngui D, Masuy F, Hancy S, Burteau M, Boutry J, Delcour A, Goffeau, Hols P** (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22:1554–1558.

**Botina SG, Tsygankov YD, Sukhodolets VV** (2006) Identification of industrial strains of lactic acid bacteria by methods of molecular genetics typing. *Russian J. Gen.* 42:1367-1379.

**Bottazzi V.** (1993) *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia*. Edagricole , Bologna.

**Briggiler Marcò, M., Capra, M.L., Quiberoni, A., Vinderola, C.G., Reinheimer, J.A. , Hynes, E.** (2007) Non starter Lactobacillus strains as adjunct cultures for cheese making : In vitro characterisation and performance in two model cheeses. *J Dairy Sci* 90, p. 4532-4542.

**Broadbent JR** (2001) Genetics of lactic acid bacteria. Pages 243– 299 in *Applied Dairy Microbiology*. 2nd ed. J. L. Steele and E. H. Marth, ed. Marcel Dekker Inc., New York, NY.

**Broadbent JR, Steele JL** (2005) Cheese flavour and the genomics of lactic acid bacteria. *ASM News*. 71:121-128.

**Broadbent JR, Steele JL** (2007) Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria and their influence on bitterness in bacterial-ripened cheeses. *In Flavor of Dairy Products*.

**Broome, M. C., Krause, D. A., & Hickey, M. W.** (1990) The isolation and characterization of lactobacilli from Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 45, 60–66.

**Broome, M.C., Powell, I.B., Limsowtin, G.K.Y.** (2003) Starter cultures : *Specific properties*. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*. H. Roginski, J.W. Fuquay, e P.F. Fox. London : Academic Press. Vol. 1, p. 269-275.

**Brown, A. D.** (1976) Microbial water stress. *Bacteriology Reviews*, 40, 803–846.

**Bruno M.E.C., Montville T.J.** (1993) Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 59(9): 3003-3010.

**Brusetti L, Borin S, Mora D, Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, Daffonchio D** (2006) Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:154-164.

**Brüssow, H.** (2001) Phage of dairy bacteria. *Annu Rev Microbiol* 55, p. 283-303.

**Brüssow, H., Hendrix, R.W.** (2002) Phage genomics : *Small is beautiful*. *Cell* 108, p. 13-16.

**Bude Ugarte, M., Guglielmotti, D., Giraffa, G., Reinheimer, J., Hynes, E.** (2006) Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses : Genetic characterization and resistance to biological barriers. *J Food Prot* 69, p. 2983-2991.

**Buffa M., B. Guamis,C.Royo and A. J.Trujillo** (2001) Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. *Food Microbiology* Volume 18, Issue 1, 45-51.

**Buffa M., B. Guamis,C.Royo and A. J.Trujillo** (2001) Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized

and high-pressure-treated milk. *Food Microbiology* Volume 18, Issue 1, 45-51

**C. Chaves-Lo'pez, M. De Angelis, M. Martuscelli, A. Serio, A. Paparella and G. Suzzi** (2006) Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J Appl Microbiol.* 101(2):353-60

**Caira S, Feranti P, Gatti M, Fornasari ME, Barone F, Lilla S, Mucchetti G, Picariello G, Chianese L, Neviani E, Addeo F** (2003) Synthetic peptides as substrate for assaying the proteolytic activity of *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Res.* 70:315-325.

**Caldwall K. R., Drake M. A., and McGorin R. J., ed. Am. Chem. Soc., Washington, DC. Brusetti L, Borin S, Mora D, Rizzi A, Raddadi N, Sorlini C, Daffonchio D** (2006) Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56:154-164.

**Candioti, M., Hynes, E., Quiberoni, A., Palma, S., Sabbag, N., Zalazar, C.** (2002) Reggianito Argentina cheese : Influence of *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey cultures on chesse making and ripening processes. *Int Dairy J* 12, p. 923-931

**Caplan, M.S., Miller-Catchpole, R., Kaup, S.** (1999) Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology*; 117, p. 577-583.

**Capobianco F, Pacifico S, Panfili G, Salimei E, Coppola R** (2005) Aspetti tecnologici e microbiologici del Pecorino Carmasciano. *Industrie Alimentari* XLIV:150–155.

**Capobianco F, Pacifico S, Panfili G, Salimei E, Coppola R** (2005) Aspetti tecnologici e microbiologici del Pecorino Carmasciano. *Industrie Alimentari* XLIV:150–155.

**Capra, M. L., Quiberoni, A., Reinheimer, J.A.** (2006) Phages of *Lactobacillus casei/paracasei* : Response to environmental factors and interaction with collection and commercial strains. *J Appl Microbiol* 100, p. 334-342.

**Carminati, D., Giraffa, G., Neviani, E., Muchetti, G.** (1985) Contributo allo studio della microflora di formaggi di Valle Camònica : proposta per l'utilizzo di uno starter. *Ind Latte* 21, p. 258-266.

**Cenci Goga, B.T.; Di Antonio, E.,** (1995) Behaviour of lactic and non lactic microflora during the production and ripening of farm-manufactured Pecorino cheese (Umbria). *Annali di Microbiologia ed Enzimologia*.

**Chamba, J.F., Irlinger, F.** (2004) Secondary and adjunct cultures. In *Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1 General Aspects, ed. P.F. Fox, P. McSweeney, T.M. Cogan, e T.P. Guinee. Elsevier Academic Press Inc. London, UK. p. 191-206.

**Chan RK, Wortman CR, Smiley BK, Hendrick CA** (2003) Construction and use of a computerized DNA fingerprint database for lactic acid bacteria from silage. *J. Microbiol. Meth.* 55:565-574.

**Charbonnel P, Lamarque M, Piard J, Gilbert C, Juillard V, Atlan D** (2003) Diversity of oligopeptide transport specificity in *Lactococcus lactis* species – A tool to unravel the role of OppA in uptake specificity, *J. Biol. Chem.* 278:14832–14840.

**Chaves-Lopez C., De Angelis M., Martuscelli M., Serio A., Paparella A. and Suzzi G.** (2006) Characterization of the *Enterobacteriaceae* isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *J Appl Microbiol.* 101(2):353-60.

**Chen YS, Christensen JE, Strickland M, Steele JL** (2003) Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1276–1282.

**Chick JF, Marchesseau K, Gripon JC** (1997) Intracellular esterase from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: purification and characterization. *Int. Dairy J.* 7:169–174.

**Chopin A** (1993) Organization and regulation of genes form amino acid biosynthesis in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 1221–38.

**Christensen JE, Dudley EG, Pederson JA, Steele JL** (1999) Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:217–246.

**Christensson C, Bratt H, Collins LJ, Coolbear T, Holland R, Lubbers MW, O'Toole PW, Reid JR** (2002) Cloning and expression of an oligopeptidase, PepO, with novel specificity from *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20). *Appl. Environ. Microbiol.* 68:254–262.

**Cocaign-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, Lindley ND, Loubiere P** (1995) Rational development of a simple synthetic medium for sustained growth of *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Bacteriol.* 79:108–116.

**Cocconcelli P. S.** (1995). Toma cheese. In T. M. Cogan & M. C. Rea (Eds.), *Artisanal European Cheeses* (pp. 45-48). Brussels: European Commission, DG XII.

**Coda R., E. Brechany, M. De Angelis, S. De Candia, R. Di Cagno and M. Gobbetti** (2006) Comparison of the compositional, microbiological, biochemical, and volatile profile characteristics of nine Italian ewes' milk cheeses. *J Dairy Sci.* 89(11):4126-43.

**Coda R., E. Brechany, M. De Angelis, S. De Candia, R. Di Cagno and M. Gobbetti** (2006) Comparison of the compositional, microbiological, biochemical, and volatile profile characteristics of nine Italian ewes' milk cheeses. *J Dairy Sci.* 89(11):4126-43.



**Coffey, A., Ross, R.P.** (2002) Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains : Molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, p. 303-321.

**Cogan TM, Beresford TP, Steele J, Broadbent J, Shah NP, Ustunol Z** (2006) Advances in Starter Cultures and Cultured Foods. *J. Dairy Sci.* 90:4005-4021.

**Cogan, T. M.** (2000) Cheese microbiology. In P. F. Fox, T. Guinee, T. M. Cogan, & P. L. H. McSweeney (Eds.), *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers.

**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.

**Coppola R, Nanni M, Iorizzo M, Sorrentino A, Sorrentino E, Chiavari C, Grazia L** (2000) Microbiological characteristics of Parmigiano Reggiano cheese during the cheesemaking and the first months of the ripening. *Le Lait*. 80:479-490.

**Coppola R, Nanni M, Iorizzo M, Sorrentino A, Sorrentino E, Grazia L** (1997) Survey of lactic acid bacteria isolated during the advance stages of the ripening of Parmigiano Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* 64:305-310.

**Corsetti, A., Gobbetti, M., De Marco, B., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., Rossi, J.** (2000) Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *J Agric Food Chem.* Jul; 48(7). p. 3044-3051.

**Cotter PD, Hill C, Ross RP** (2005) Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:777-788.

**Crow V, Curry B, Hayes M** (2001) The ecology of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *Int. Dairy J.* 11:275-283.

**Crow V. L., Coolbear T., Gopal P. K., Martley F. G., McKay L. L., Riepe H.** (1995) The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal* , 5: 855-875.

**Cusick SM, O'Sullivan DJ** (2000) Use of a single, triplicate arbitrarily primed-PCR procedure for molecular fingerprinting of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 66:2227–2231.

**Davey HM, Kell DB** (1996) Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev.* 60:641–696.

**De Angelis, M., de Candia, S., Calasso, M., Faccia, M., Guinee, T., Simonetti, M., Gobbetti, M.** (2008) Selection and use of autochthonous multiple strain cultures for the manufacture of high-moisture traditional Mozzarella cheese. *Int J Food Microbiol* 125, p. 123-132.

**De Candia, S., De Angelis, M., Dunlea, E., Minervini, F., McSweeney, P., Faccia, M., Gobbetti, M.** (2007) Molecular identification and typing of natural whey starters cultures and microbiological and compositional properties of related traditional Mozzarella cheese. *Int J Food Microbiol* 119, p. 182-191.

**De Moreno, A., Perdighò, G.** (2005) Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med Sci Monit* 10, BR96-BR96- BR104.

**De Vos WM** (2001) Advances in genomics for microbial food fermentations and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:493–498.

**De Vrese, M., Stegelmann, A., Richter, B.** 2001. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *American Journal of clinical Nutrition* ; 73 (supplement 2), p. 4215-4295.

**De Vries, M., Vaughan, E., Kleerebezem, M., de Vos, W.** 2006. *Lactobacillus plantarum* : Survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J* 16, p. 1018-1028.

**Deguchi Y, Morishita T** (1992) Nutritional requirements in multiple auxotrophic lactic acid bacteria; genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways in *Lactococcus lactis*, *Enteriococcus faecalis* and *Pediococcus acidilactici*. *Biosc. Biotechn. Biochem.* 56:913–918.

**Dellaglio F, Felis GE, Castioni A** (2005) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* subsp. nov., Isolated from Indian Dairy Products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:401–404.

**Dellaglio F., Torriani S., Pattarini F., Ricci C., Di Bucchiarico R.,** (1995) “Identificazione e caratterizzazione tecnologica della microflora lattica naturale del formaggio Pecorino d’Abruzzo”. *Scienza e tecnica lattiero casearia* 46: 82-97

**Delley M, Germond JE** (2002) Differentiation of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*, subsp *lactis*, and subsp *delbrueckii* using physiological and genetic tools and reclassification of some strains from the ATCC collection. *Syst Appl Microbiol.* 25:228–231.

**Detmers FJ, Kunji ER, Lanfermeijer FC, Poolman B, Konings WN** (1998) Kinetics and specificity of peptide uptake by the oligopeptide transport system of *Lactococcus lactis*. *Biochemistry* 37:16671–16679.

**Di Cagno, R., Quinto, M., Corsetti, A., Minervini, F., Gobbetti, M.** (2006) Assessing the proteolytic and lipolytic activities of single strains of mesophilic lactobacilli as adjunct cultures using a Caciotta cheese model system. *Int Dairy J* 16, p. 119-130.

**Dias B, Weimer B** (1998) Conversion of methionine to thiols by lactococci, lactobacilli, and brevibacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3320–3326.

**Diaz-Muñiz I, Banavara DS, Budinich MF, Rankin SA, Dudley EG, Steele JL** (2006) Lactobacillus casei metabolic potential to utilize citrate as an energy source in ripening cheese: a bioinformatics approach. *J. Appl. Microbiol.* 101:872-882.

**Diggin, M. B., Waldron, D. S., McGoldrick, M. A., Cogan, T. M., & Fox, P. F.** (1999) Growth substrates for mesophilic non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Irish Journal of Agriculture and Food Research*, 38, 183.

**Dirinck P., De Winne A.** (1999) Flavour characterization of cheeses by gas chromatographic-mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*, 847: 203- 208.

**Duan, Y., Tan, Z., Wang, Y., Li, Z., Qin, G., Huo, Y., Cai, Y.** (2008) Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from Tibetan Qula cheese. *J Gen Appl Microbiol* 54, p. 51.60.

**Dufossé L., Latrassé A., Spinnler H. E.** (1994) Importance des lactones dans les arômes alimentaires: Structures, distribution, propriétés sensorielles et biosynthèse. *Science Alimentaire* , 14: 17-50.

**Dunny GM, Cleary PP** (1991) Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci, and enterococci. *American Society for Microbiology*, Washington, DC.

**Ehrlich F** (1907) Über die Bedingungen der Fuselolbindungen und über ihnen Zusammenhang mit dem Eiweissaufbau der Hefe. Ber. Deutsch. Chem. Gesells. 40.

**El Soda, M., Desmazeaud, M. J., Aboudonia, S., & Kamal, N.** (1981) Acceleration of cheese ripening by the addition of whole cells or cell free extracts from *Lactobacillus casei* to the cheese curd. *Milchwissenschaft*, 36, 140–142.

**Ercolini, D., Hill, P., Dodd, C.** (2003) Bacterial community structure and location in Stilton cheese. *Appl Environ Microbiol* 69, p. 3540-3548.

**Esteban M. A., Marcos A.** (1989) Chemical prediction of water activity in processed cheese. *Journal of Dairy Research*, 56: 665-668.

**Facklam R, Hollis D, Collins MD** (1989) Identification of Gram-Positive Coccal and Cocobacillary Vancomycin-Resistant Bacteria. *J. Clin. Microbiol.* 27:724–730.

**FAO/WHO.** (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada.

**Fenster KM, Parkin KL, Steele JL** (1997) Characterization of a thiol-dependent endopeptidase from *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *J Bacteriol* 179:2529–2533.

**Fitzsimons, N. A., Cogan, T. M., Condon, S., & Beresford, T.** (2001) Spatial and temporal distribution of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Journal of Applied Microbiology*, 90, 600–608.

**Forsman, P., Tanskanen, J., Alatossava, T.** (1993) Structural similarity and genetic homology between *Lactobacillus casei* bacteriophages isolated in Japan and in Finland. *Biosci Biotechnol Biochem* 57, p. 2043-2048.

**Foucaud C, Kunji ER, Hagting A, Richard J, Konings WN, Desmazeaud M, Poolman B** (1995) Specificity of peptide transport systems in *Lactococcus lactis*: evidence for a third system which transports hydrophobic di- and tripeptides. *J Bacteriol.* 177:4652–4657.

**Fox PF, Lucey JA, Cogan TM** (1990) Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 29:237–253.

Fox PF, McSweeney PLH (2004) Cheese: An overview. Pages 1– 18 in *Cheese: Chemistry, Physics, and Microbiology*. 3rd ed. Elsevier Academic Press, Oxford, UK.

**Fox PF, Singh TK, McSweeney PLH** (1993) Biogenesis of flavour compounds in cheese, in: Malin E.L., Tunick M.H. (Eds.), *Chemistry of Structure/Function Relationships in Cheese*, *Plenum Press*. New York, pp. 59–98.

**Fox PF, Wallace JM** (1997) Formation of flavour compounds, *Adv. Appl. Microbiol.* 45:17–85.

**Fox, P. F., McSweeney, P. L. H., & Lynch, C. M.** (1998). Significance of non-starter lactic acid bacteria in Cheddar cheese. *Australian Journal of Dairy Technology*, 53, 83–89.

**Frohlich-Wyder MT, Bachmann HP, Casey MG** (2002) Interaction between propionibacteria and starter/nonstarter lactic acid bacteria in Swiss-type cheeses. *Le Lait* 82:1-15.

**Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H.** (1998) Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *International Journal of Food Microbiology*; 42, p. 39-44.

**Gagnaire V, Piot M, Camier B, Vissers JP, Jan G, Leonil J** (2004) Survey of bacterial proteins released in cheese: a proteomic approach. *Int. J. Food Microbiol.* 94:185–201.

**Gancheva A, Pot B, Vanhonacker K, Hoste B, Kersters K** (1999) A polyphasic approach towards the identification of strains belonging to *Lactobacillus acidophilus* and related species. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:573–585.

**Garault P, Le Bars D, Besset C, Monnet V** (2002) Three oligopeptide-binding proteins are involved in the oligopeptide transport of *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 277:32–39.

**Gatti M, Bernini V, Lazzi C, Neviani E** (2006) Fluorescence microscopy for studying the viability of micro-organisms in natural whey starters. *Lett. Appl. Microbiol.* 42:338-343.



**Gatti M, Lazzi C, Rossetti L, Mucchetti G, Neviani E** (2003) Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano cheese. *J. Appl. Microbiol.* 95:463-470.

**Gatti M, Travisano C, Fabrizi E, Neviani E, Gardini F** (2004) Biodiversity within *Lactobacillus helveticus* isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:182-190.

**Gatti, M., Olivari, G., Neviani, E., Carini, S.** (1993) Prove di caseificazione a Provolone con lattoinnesto selezionato. *Ind Latte* 29, p. 19-31.

**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.

**Giraffa G, Andrighetto C, Antonello C** (2004) Genotypic and Phenotypic Diversity of *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* Strains of Dairy Origin. *Int. J. Food Microbiol.* 91:129–139.

**Giraffa G, Gatti M, Rossetti L, Senini L, Neviani E** (2000) Molecular diversity within *Lactobacillus helveticus* as revealed by genotypic characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1259–1265.

**Giraffa G., Carminati, Domenico, Neviani, Erasmo** (1997) Enterococci Isolated from Dairy Products: A Review of Risks and

Potential Technological Use. *Journal of Food Protection*®, Volume 60, Number 6.

**Giraffa, G.** (2003) Functionality of enterococci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 215-222.

**Gitton C, Meyrand M, Wang J, Caron C, Trubuil A, Guillot A, Mistou MY** (2005) Proteomic signature of *Lactococcus lactis* NCDO763 cultivated in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7152–7163.

**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.

**Goodfellow M, Minnikin DE** (1985) Introduction to Chemosystematics, *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Goodfellow, M. and Minnikin, D.E., Eds., London: Academic, pp. 1–16.

**Grattepanche, F., Miescher-Schwenninger, S., Meile, L., Lacroix, C.** (2008) Recent development in cheese cultures with protective and probiotic functionales. *Dairy Sci Technol* 88, p. 421-444.

**Guarner, F., Perdigòn, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., Morelli, L.** (2005) Should yoghurt cultures be considered probiotic. *Br J Nutr* 93, p. 783-786.

**Guglielmotti, D., Briggiler marcò, M., Golowczyc, M., Reinheimer, J., Quiberoni, A.** (2007) Probiotic potential of *Lactobacillus delbrueckii* strains and their phage resistant mutants. *Int Dairy J* 17, p. 916-925.

**Guglielmotti, D.M., Reinheimer, J.A., Binetti, A.G., Giraffa, G., Carminati, D., Quiberoni, A.** (2006) Characterization of spontaneous phage-resistant derivatives of *Lactobacillus delbrueckii* commercial strains. *Int J Food Microbiol* 111, p. 126-133.

**Hagting A, Kunji E, Leenhouts K, Poolman B, Konings W** (1994) The di- and tripeptide transport protein of *Lactococcus lactis*. A new type of bacterial peptide transporter. *J. Biol. Chem.* 269:11391– 11399.

**Haller, D., Bode, C., Hammes, W.P.** (2000) Non – pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut*; 47, p. 79-87.

**Hammes, W.P.** (1991) The production of Yoghurt with Probiotic Bacteria Isolated from infants in Jordan. *Intern. J. of Food* 45.p. 89-99.

**Herreros, M.A., Arenas, R., Sandoval, M.H., Castro, J.M., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E.** (2007) Effect of addition of native cultures on characteristics of Armada cheese manufactured with pastourized milk: A preliminary study. *Int Dairy J* 17, p. 328-335.

**Higgins CF** (1992) ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 67-113.

**Holm C, Jespersen L** (2003) A flow-cytometric gram-staining technique for milk-associated bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:2857–63.

**Holzappel, W.H., Schillinger, U.** (1991) The genus *Leuconostoc*. In *The Prokaryotes*. A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder & K.-H. Schleifer. Springer. New York. II Edizione, vol. 2, 1508-1534.

**Hugenholtz J, Starrenburg M, Boels I, Sybesma W, Chaves AC, Mertens A, Kleerebezem M** (2000) Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the improvement of fermented dairy products; animating the Cellular Map. In: J.L. Snoep, Editor, Proceedings of BTK 2000, Stellenbosch University Press, Stellenbosch, South Africa, pp. 3009– 3013.

**Hynes, E., Ogier, J.C., Delacroix-Buchet, A.** (2003) Influence of starter and adjunct lactobacilli culture on ripening of miniature washed-curd cheeses. *Lait* 83, p. 17-29.

**Ichikawa, H., Kuroiwa, T., Inagaki, A.** (1999) Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat. *Digestive Diseases and Sciences*, 44, p. 2119-2123.

**Irigoyen, A., Ortigosa, M., Juansaras, I., Oneca, M., Torre, P.** (2007) Influence of an adjunct culture of *Lactobacillus* on the free amino acids and volatile compounds in a Roncal-type ewe's-milk cheese. *Food Chem* 100, p. 71-80.

**Isolauri, E., Majamaa, H., Arvola, T.** (1993) *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology*; 105, p. 1643-1650.

**Jimeno, J., Lazaro, M. J., & Sollberger, H.** (1995a) Antagonistic interactions between propionic acid bacteria and non-starter lactic acid bacteria. *Lait*, 75, 401–413.

.

**Jimeno, J., Sollberger, H., & Lazaro, M. J.** (1995b) Inhibition of Swiss-type microflora by facultatively heterofermentative lactobacilli. Proceedings of the second plenary meeting, FLORA (pp. 137–147). Vitoria, Spain.

**Jin, L.Z., Marquardt, R.R., Zhao, X.** (2000) A strain of *Enterococcus faecium* (18c23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *E.coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Applied Environmental Microbiology* 66, p. 4200-4204.

**Johansson, M.L., Molin, G., Jeppson, B., Nobaek, S., Ahrnè, S., Bengmark, S.** (1993) Administration of different *Lactobacillus* strains in fermented oatmeal soup. In vivo colonization of human intestinal mucosa and effect on the indigenous flora. *App. Environ. Microbiol* 59, p. 15-20.

**Johnson, J. A. C., Etzel, M. R., Chen, C. M., & Johnson, M. E.** (1995) Accelerated ripening of reduced-fat Cheddar cheese using four attenuated *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 adjuncts. *Journal of Dairy Science*, 78, 769–776.

**Jordan, K. N., & Cogan, T. M.** (1993) Identification and growth of non-starter lactic acid bacteria in Irish Cheddar cheese. *Irish Journal of Agriculture and Food Research*, 32, 47–55.

**Jordan, K. N., and T. M. Cogan.** (1999). Heat resistance of *Lactobacillus spp.* isolated from Cheddar cheese. *Lett. Appl. Microbiol.* 29:136–140.

**Juillard V, Guillot A, Le Bars D, Gripon JC** (1998) Specificity of milk peptide utilization by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1230–1236.

**Kandler, O., Weiss, N.** (1986) Genus *Lactobacillus*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. G. Williams and Wilkins, Baltimore. Vol 2. p. 1063-1065.

**Khalid NM and Marth EH** (1990) Lactobacilli – their enzymes and role in ripening and spoilage of cheese: a review. *J. Dairy Sci.* 73:2669–2684.

**Klein J, Dick A, Schick J, Matern H, Henrich B, Plapp R** (1995) Molecular cloning and DNA sequence analysis of pepL, a leucyl aminopeptidase gene from *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis* DSM7290. *Eur. J. Biochem.* 228:570–578.

**Köhler, G., Ludwig, W., & Schleifer, K. H.** (1991) Differentiation of lactococci by rRNA gene restriction analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 68(3), 307-312.

**Konings WN, Poolman B, Driesen AJM** (1989) Bioenergetics and solute transport in lactococci. *Rev. Microbiol.* 16:419–476.

**Korhonen H, Pihlanto A** (2003) Food-derived bioactive peptides—opportunities for designing future foods. *Curr. Pharm. Des.* 9:1297–1308.

**Kubickova J., Grosch W.** (1997) Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *International Dairy Journal* , 7: 65-70.

**Kunji ERS, Mierau I, Hagting A, Poolman B, Konings WN** (1996) The proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70:187–221.

**Lane, C. N., & Fox, P. F.** (1996) Contribution of starter and adjunct lactobacilli to proteolysis in Cheddar cheese during ripening . *International Dairy Journal*, 6, 715–728.

**Larson EJ, Hakovirta JR, Cai H, Jett JH, Burde S, Keller RA, Marrone BL** (2000) Rapid DNA fingerprinting of pathogens by flow cytometry. *Cytometry.* 41:203–208.

**Lawrence R. C.** (1967) The possible role of milk fat in the formation of Cheddar cheese flavour. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 2: 55-57.

**Lawrence, R. C., & Gilles, J.** (1987) Cheddar cheese and related dry-salted varieties. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Vol. 2 (pp. 1–44)*. London: Elsevier Applied Science.

**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. *J. Appl. Microbiol.* 94:481-490.

**Lemieux, L., Puchades, R., & Simard, R. E.** (1989) Size-exclusion HPLC separation of bitter and astringent fractions from Cheddar cheese made with added *Lactobacillus* strains to accelerate ripening. *Journal of Food Science*, 54, 1234–1237.

**Leuschner RG, Kurihara R, Hammes WP** (1998) Effect of enhanced proteolysis on formation of biogenic amines by lactobacilli during Gouda cheese ripening. *Int. J. Food Microbiol.* 44:15–20.

**Limsowtin, G.K.Y., Powell, I.B. and Parente, E.** (1996) Types of starters, in *Dairy Starter Cultures*, Cogan, T.M. and Accolas, J.-P., eds, VCH Publishers, New York. pp.101-129.

**Lombardi A., Cattelan A., Martina A., Basso A.** (1995) Preliminary data on microbiological characterisation of Montasio and Asiago cheeses. Proceedings of the second plenary meeting, FLORA pp. 149-159. Spain.



**Lortal S, Rouault A, Guezenec S, Gautier M** (1997) *Lactobacillus helveticus*: Strain typing and genomic size estimation by pulsed field gel electrophoresis. *Curr. Microbiol.* 34:180–185.

**Lynch, C. M., McSweeney, P. L. H., Fox, P. F., Cogan, T. M., & Drinan, F. D.** (1996) Manufacture of Cheddar cheese with and without adjunct lactobacilli under controlled microbiological conditions. *International Dairy Journal*, 6, 851–867.

**Macedo A.C., Malcata F.X. and Hogg T.A.** (1995) Microbiological profile in Serra ewes' cheese. *Journal of Applied Microbiology* Volume 79, Issue 1.

**Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, Pavlov A, Pavlova N, Karamychev V, Polouchine N, Shakhova V, Grigoriev I, Lou Y, Rohksar D, Lucas S, Huang K, Goodstein DM, Hawkins T, Plengvidhya V, Welker D, Hughes J, Goh T, Benson A, Baldwin K, Lee J-H, Díaz-Muñiz I, Dosti B, Smeianov V, Wechter W, Barabote B, Lorca G, Altermann E, Barrangou R, Ganesan B, Xie Y, Rawsthorne H, Tamir D, Parker C, McKay L, Breidt F, Broadbent J, Hutkins R, O'Sullivan D, Steele J, Unlu G, Saier M, Klaenhammer T, Richardson P, Kozyavkin S, Weimer B, Mills D** (2006) Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:15611–15616.

**Marino, M., Maifreni, M., and G. Rondinini** (2003) Microbiological characterization of artisanal Montasio cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 229, 133-140.

**Martley, F. G., & Crow, V. L.** (1993) Interactions between non-starter microorganisms during cheese manufacture and ripening. *International Dairy Journal*, 3, 461–483.

**McCartney A.** (2002) Application of molecular biological methods for studying probiotics and the gut flora. *Br. J. Nutr.* 88:29–37.

**McSweeney PLH, Nursten HE, Urbach G** (1997) Flavours and off-flavours in milk and dairy products, in: Fox P.F. (Ed.), *Advanced Dairy Chemistry*, Chapman and Hall, London, UK, 2nd ed., vol. 3, pp. 403–468.

**McSweeney PLH, Sousa MJ** (2000) Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review, *Lait* 80:293–324.

**McSweeney, P. L. H., Walsh, E. M., Fox, P. F., Cogan, T. M., Drinan, F. D., & Castelo-Gonzalez, M.** (1994) A procedure for the manufacture of Cheddar cheese under controlled bacteriological conditions and the effect of adjunct lactobacilli on cheese quality. *Irish Journal of Agriculture and Food Research*, 33, 183–192.

**Meinhart E, Schreier P** (1986) Study of flavour compounds from Parmagiano Reggiano cheese. *Milchwissenschaft* 41:689–691.

**Molimard P, Spinnler HE** (1996) Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: Origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79:169–184.

**Monnet V, Nardi M, Chopin A, Chopin MC, Gripon JC** (1994) Biochemical and genetic characterization of PepF, an oligopeptidase from *Lactococcus lactis*. *J. Biol. Chem.* 269:32070–32076.

**Mucchetti e Neviani** (2006) *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza.*

**Murru N., Barile M., Mormile A., Ceres C., Cortesi M.L.** (2009) Microbiological characterization during ripening of “Carmasciano” A sheep’s raw milk cheese. Second SAFE Consortium International Congress on Food Safety: Novel Technologies and Food Quality, Safety and Health. Girona, Catalunya, Spain.

**Muyzer G, de Waal E, Uitterlinden A** (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695–700.

**Nardi M, Renault P, Monnet F** (1997) Duplication of the pepF gene and shuffling of DNA fragments on the lactose plasmid of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol.* 179:4164–4171.

**Neeter R., de Jong C., Teisman H. G. J., Ellen G.** (1996) Determination of volatile components in cheese using dynamic headspace techniques. In *A. J. Taylor & D. S. Montrom, F lavour Science : recent developments* (pp. 293-296).

**Neviani Erasmo e Germano Mucchetti** (2006) Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza.

**Nierop Groot MN, De Bont JAM** (1998) Conversion of phenylalanine to benzaldehyde initiated by an aminotransferase in *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3009–3013.

**O’Keefe P. W., Libbey L. M., Lindsay R. C.** (1969) Lactones in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, 52: 888.

**Oku H, Kaneda T** (1988) Biosynthesis of branched-chain fatty acids in *Bacillus subtilis*. A decarboxylase is essential for branched-chain fatty acid synthetase. *J. Biol. Chem.* 263:18386–18396.

**O’Sullivan DJ** (1999) Methods for analysis of the intestinal microflora. In: *Tannock GW, editor. Probiotics: a critical review.* Norfolk (UK): Horizon Scientific Press.

**Ott A, Germond J, Chaintreau A** (2000) Origin of acetaldehyde during milk fermentation using <sup>13</sup>C-labeled precursors. *J. Agric. Food Chem.* 48:1512–1517.

**Parente, E., Cogan, T.M.** (2004) Starter cultures: general aspects. Chap. 6 In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Vol. 1, Elsevier, London. Pp 123-148.

**Pedonese, F., Innocenti, E., Nuvoloni, R., D'Ascenzi, C., Rindi, S., Cerri, D., Giraffa, G., Neviani, E** (2002) Characterization of autochthonous microflora of the traditional ovine cheese Pecorino del Parco di Migliarino - San Rossore [Tuscany] ). *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*.

**Peltoniemi K, Vesanto E, Palva A** (2002) Genetic characterization of an oligopeptide transport system from *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*. *Arch. Microbiol.* 177:457–467.

**Peterson, S. D., and R. T. Marshall.** (1990) Non-starter lactobacilli in Cheddar cheese: A review. *J. Dairy Sci.* 73:1395–1410.

**Puchades, R., Lemieux, L., Simard, R. E.** (1989) Evolution of free amino acids during the ripening of Cheddar cheese containing added lactobacilli strains. *Journal of Food Science*, 54, 885–888, 946.

**Randazzo CL, Torriani S, Akkermans ADL, de Vos WM, Vaughan EE** (2002) Diversity, dynamics, and activity of bacterial communities during production of an artisanal sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1882– 1892.

**Raya RR, Manca de Nadra MC, Pesce de Ruiz Holgado P, Oliver G** (1986) Threonine aldolase in *Lactobacillus bulgaricus* ATCC 11842 and YOP12. *Milchwissenschaft* 41:630–631.

**Reinheimer, J.A., Binetti, A., Quiberoni, A., Bailo, N., Rubiolo, A., and Giraffa, G.** (1997) Natural milk cultures for the production of Argentinian cheeses. *J Food Prot* 60, 59-63.

**Reiter B, Oram JD** (1962) Nutritional studies on cheese starters. *J. Dairy Res.* 29:63–77.

**Ritchie NJ, Schutter ME, Dick RP, Myrold DD** (2000) Use of Length Heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:1668-1675.

**Rodriguez-Angeles, G.** (2002) Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex.* 44. p. 464-475.

**Rodtong, S., & Tannock, G. W.** (1993) Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59(10), 3480-3484.

**Rossi J., Durant C., Gobetti M.** (1994) Indagine preliminare sull'impiego di enterococchi nella produzione di formaggio Pecorino umbro. *L'industria del latte*, 30, pp. 41–53.

**Rychlik M, Warmke R, Grosch W** (1997) Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei subsp. casei*. III. Analysis of characterer impact flavour compounds. *Lebensm. Wiss. u. Technol.* 30:471–478.

**Santarelli M, Gatti M, Lazzi C, Bernini V, Zapparoli GA, Neviani E** (2008) Whey Starter for Grana Padano Cheese: Effect of Technological Parameters on Viability and Composition of the Microbial Community. *J. Dairy Sci.*, in press.

**Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P** (2006) Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 71:394-406.

**Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos W** (2005) Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16:204–211.

**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.

**Schlegel, HG.** (1976) Microbiologia. Ed. Zanichelli, Bologna.

**Schleifer, K H.**(1986) Gram positive-cocci. *Bergey's manual of systematic bacteriology.* Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 2. p. 1208-1234.

**Smid E** (1991) Physiological implications of peptide transport in lactococci. *Ph.D. Thesis*, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

**Smit BA, Engels WJM, Alewijn M, Lommerse GTCA, Kippersluijs E, Wouters JTM, Smit G** (2004b) Chemical conversion of alpha-keto acids in relation to flavor formation in fermented foods. *J. Agric. Food Chem.* 52:1263–1268.

**Smit BA, Engels WJM, Bruinsma J, Van Hylckama Vlieg JET, Wouters JTM, Smit G** (2004a) Development of a High Throughputscreening method to test flavour-forming capability of anaerobic microorganisms. *J. Appl. Microbiol.* 97:306–313.

**Smit G, Smit BA, Engels WJM** (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:591-610.

**Smith G., Verheul A., van Kranenburg R., Ayad E., Siezen R., Engels W** (2000) Cheese flavour development by enzymatic conversion of peptides and amino acids. *Food Research International* , 33: 153-160.

**Sridhar VR, Hughes JE, Welker DL, Broadbent JR, Steele JL** (2005) Identification and functional analysis of endopeptidase genes from the genomic sequence of *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:3025–3032.

**Stackebrandt, E., Teuber, M.** (1988) Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, Mar 70(3), p. 317-24.



**Steffen C** (1971) Konzentration und Konfiguration des milchsäure im reifenden Emmentalerkäse, Diss. 4630, Eidgen. Tech. Hochschule, Zürich.

**Steffen C, Glättli H, Steiger G, Flückiger E, Bühlmann C, Lavanchy P, Nick B** (1980) Vergleichende Untersuchungen von Greyerzerkäsen mit und ohne Nachgarung. I Bakteriologische, biochemische, chemische und rheologische Untersuchungen, Schweiz. Milchwirtsch. Forsch. 9:9–27.

**Steffen, C., Eberhard, P., Bosset, J. O., R.uegg, M.** (1993) Swiss-type varieties. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 2 (pp. 83–110). London: Elsevier Applied Science.

**Stepanenko PP** (1999) Mikrobiologiya moloka i molochnykh produktov (Microbiology of Milk and Milk Products), Sergiev Posad: Vse dlya Vas—Podmoskov'e.

**Tanous, C, Kieronczyk, A, Helinck, S, Chambellon, E. Yvon, M. Antonie Van Leeuwenhoek** (2002) Glutamate dehydrogenase activity: a major criterion for the selection of flavour-producing lactic acid bacteria strains. *Antonie van Leeuwenhoek* Volume 82, Numbers 1-4, 271-278.

**Teuber, M. et al** (1993) Lactic acid bacteria. In *Biotechnology Biological fundamentals*. Vol.1. p. 325-366.

**Thomas TD** (1986) Oxidative activity of bacteria from Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 21:37–47.

**Thomas TD** (1987) Acetate production from lactate and citrate by non-starter bacteria in Cheddar cheese. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 22: 25–38.

**Thomas, T. D.** (1987) Cannibalism among bacteria found in cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 22, 215–219.

**Thomas, T. D., & Batt, R. D.** (1969) Degradation of cell wall constituents by starved *Streptococcus lactis* in relation to survival. *Journal of General Microbiology*, 58, 347–362.

**Thomas, T. D., & Crow, V. L.** (1983) Mechanism of D(-)-lactic acid formation in Cheddar cheese. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 18, 131–141.

**Torriani S, Zapparoli G, Dellaglio F** (1999) Use of PCR-based methods for rapid differentiation of *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *L. delbrueckii subsp. lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4351–4356.

**Trepanier, G., Simard, R. E., & Lee, B. H.** (1991) Effect of added lactobacilli on composition and texture of Cheddar cheese during accelerated maturation. *Journal of Food Science*, 56, 696–700.

**Tuomola E, Crittenden R, Playne M, Isolauri E, Salminen S** (2001) Quality assurance criteria for probiotic bacteria. *Am. J. Clin. Nutr.* 73:393–398.

**Turner, K. W., & Thomas, T. D.** (1980) Lactose fermentation in Cheddar cheese and the effect of salt. *New Zealand Journal of Dairy Science and Technology*, 15, 265–276.

**Turner, K. W., R. C. Lawrence, and J. Lelievre.** (1986) A microbiological specification for milk for aseptic cheese-making. *N. Z. J. Dairy Sci. Technol.* 15:249–254.

**Tynkkynen S, Satokari R, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Saxelin M** (1999) Comparison of ribotyping, randomly amplified polymorphic DNA Analysis, and pulsed-field gel electrophoresis in typing of *Lactobacillus rhamnosus* and *L. casei* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3908–3914.

**Van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, Robert C, Oztas S, Mangenot S, Couloux A, Loux V, Dervyn R, Bossy R, Bolotin A, Batto J-M, Walunas T, Gibrat J-F, Bessieres P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Maguin E** (2006) The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:9274– 9279.

**Van Kranenburg R, Kleerebezem M, van Hylckama Vlieg JET, Ursing BM, Boekhorst J, Smit BA, Ayad EHE, Smit G, Siezen RJ** (2002) Flavour formation from amino acids by lactic acid bacteria: Predictions from genome sequence analysis. *Int. Dairy J.* 12:111–121.

**Vedamuthu ER** (1994) The dairy *Leuconostoc*: use in dairy products. *J. Dairy Sci.* 77:2725–2737.

**Ventura M, Meylan V, Zink R** (2003) Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:4296–4301.

**Ventura M, Zink R** (2002) Specific identification and molecular typing analysis of *Lactobacillus johnsonii* by using PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* 217:141–154.

**Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407–4414.

**Vse dlya Vas—Podmoskov'e. Suzuki M, Rappè MS, Giovannoni SJ** (1998) Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurement of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:2517-2522.

**Walstra (1993) Walstra, P.** (1993) The Synersis of curd. In P. F. Fox (Ed.), *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*, Vol. 1 (pp. 141–191). London: Elsevier Applied Science.

**Weber F., Ramet J. P.** (1987) Comparative technology of the ripening methods of different types of cheese. In A. Eck (Ed.), *Cheesemaking, science and technology*, pp.293-309, New York: Lavoiser Publishing.

**Williams AG, Withers SE, Banks JM** (2000) Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *Int. Dairy J.*10:17-23.

**Wong N. P., Ellis R., LaCroix D. E.** (1975) Quantitative determination of lactones in Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science* , 58: 1437-1441.

**Wood BJB, Holzapfel WH** (1995) The genera of lactic acid bacteria, 1st ed. Blackie Academic and Professional, Glasgow, United Kingdom.

**Wood BJB, Warner PJ** (2003) Genetics of lactic acid bacteria. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY.

**Wouters, T. M., Ayad E. H. E., Hugenholtz J., and Smith. G.** (2002) Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 12:91–109.

**Yvonne F. C., McSweeney P. L. H., Wilkinson M. G.** (2003) Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy Journal* , 13: 841-866.