

La valorizzazione economica dei prodotti lattiero caseari con riferimento all'autoctonia degli innesti

Zecca F<sup>1</sup>, Santoro B<sup>2</sup>.....301-308

<sup>1</sup> Dirigente POSR IV-Ricerca e Sperimentazione, Ministero politiche agricole alimentari e forestali.

<sup>2</sup> Collaboratore CRA, Istituto Sperimentale per la Zootecnia.

Economic exploitation of dairy products with reference to the autochthonous starters.

Zecca et Santoro (2006) Sci Tecn Latt-Cas, 57 (5), 301-308

## Isolamento e caratterizzazione di microrganismi da formaggi tradizionali del Triveneto

Andrighetto C<sup>1\*</sup>, Marcazzan G<sup>1</sup>, Cariolato D<sup>1</sup>, Storti A<sup>1</sup>, Cattelan A<sup>1</sup>, Lombardi A<sup>1</sup> .....309-318

\* Corrispondenza ed estratti: cristian.andrighetto@venetoagricoltura.org

<sup>1</sup> Veneto Agricoltura – Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari. Via San Gaetano 74, 36016, Thiene (VI).

**RIASSUNTO** – In questo lavoro è stata valutata la composizione ed evoluzione della microflora lattica nel corso della maturazione dei formaggi “Spessa delle Giudicarie”, “Casatella Trevigiana” e “Morlacco del Grappa” tradizionalmente prodotti in Triveneto da latte vaccino. A tal fine, sono stati studiati e caratterizzati con metodi fenotipici circa 870 isolati, tra cui cocchi e lattobacilli termofili, enterococchi e batteri lattici non-starter (NSLAB); un numero ridotto di questi isolati (320) è stato inoltre tipizzato mediante RAPD-PCR. Dopo identificazione, i cocchi termofili sono risultati per la maggior parte appartenere alle specie *Streptococcus thermophilus* e *Streptococcus macedonicus*, mentre fra i lattobacilli termofili sono risultate dominanti le specie *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactobacillus fermentum*. *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus plantarum* sono risultate le specie più presenti tra i NSLAB, mentre tra gli enterococchi è risultata particolarmente frequente la specie *Enterococcus faecalis*. Non sono stati isolati enterococchi resistenti alla vancomicina. L’analisi RAPD-PCR ha consentito di evidenziare una diffusa biodiversità all’interno dei gruppi microbici presenti nei differenti formaggi. Su un ridotto numero di isolati di *S. thermophilus* e *S. macedonicus* sono state indagate le proprietà tecnologiche, con particolare riguardo alla capacità acidificante in latte. **Parole chiave:** formaggi tradizionali, microflora lattica, caratterizzazione microbica, batteri lattici non-starter

**ABSTRACT** – *Isolation and characterization of microorganisms from traditional Triveneto cheeses.* – In this research the composition and the evolution of lactic microflora of “Spessa delle Giudicarie”, “Casatella Trevigiana” and “Morlacco del Grappa”, typical cheeses produced in Triveneto geographical area from cow milk, were evaluated during ripening. About 870 microbial isolates belonging to the thermophilic cocci and lactobacilli, enterococci and non starter lactic acid bacteria (NSLAB) groups, were studied by phenotypic methods; a reduced number of isolates (320) were also characterized by means of RAPD-PCR analysis. *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus macedonicus* were dominant among thermophilic cocci, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactobacillus fermentum* among thermophilic lactobacilli, while *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus plantarum* among NSLAB. *Enterococcus faecalis* was the most common enterococcal species; however vancomycin-resistant isolates were not detected. Furthermore, RAPD-PCR allowed to detect an high biodiversity within the microbial groups isolated from the different cheeses. Regarding technological properties, a representative number of isolates identified as *S. thermophilus* and *S. macedonicus* was studied for the acidification behaviour in milk.

**Keywords:** traditional cheeses, dairy microflora, microbial characterization, nonstarter lactic acid bacteria

## Caratterizzazione fenotipica e genotipica di batteri lattici isolati da formaggio Pecorino Marchigiano

Aquilanti L<sup>1</sup>, Silvestri G<sup>1</sup>, Santarelli S<sup>1</sup>, Zannini E<sup>1</sup>, Osimani A<sup>1</sup>, Musciano G<sup>1</sup>, Bruglieri D<sup>1</sup>, Clementi F<sup>1\*</sup>....319-329

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

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università Politecnica delle Marche. Via Brecce Bianche, 60131 Ancona.

**RIASSUNTO** – Trecentosessantasei isolati ceppi di batteri lattici ottenuti da formaggio Pecorino prodotto nella regione Marche sono stati identificati e raggruppati in base alla similarità fenotipica. Alla caratterizzazione preliminare degli isolati, condotta mediante saggi morfologici e biochimici, è seguita l'applicazione della metodica ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) e del sequenziamento di una porzione (360 basi) del gene 16S rRNA. L'applicazione dell'analisi RAPD, seguita da cluster analysis mediante UPGMA, hanno consentito di stimare la variabilità genotipica infraspecifica; su un numero ridotto di isolati, inoltre, è stata valutata l'attività acidificante, proteolitica e autolitica. L'approccio polifasico utilizzato ha indicato che la fermentazione e maturazione delle produzioni di Pecorino analizzate sono condotte da una popolazione microbica eterogenea, composta da enterococchi, *Streptococcus thermophilus* e numerose specie ascritte ai generi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* e *Carnobacterium*. Inoltre, la caratterizzazione genotipica e tecnologica di un pool selezionato di isolati ha evidenziato una notevole diversità microbica.

**Parole chiave:** maturazione formaggio, Pecorino Marchigiano, batteri lattici, caratterizzazione tecnologica

**ABSTRACT** – *Phenotypic and genotypic characterisation of lactic acid bacteria isolated from Pecorino Marchigiano cheese.* – Three hundred and sixty-six isolates from Pecorino cheese produced in the Marche region were identified and grouped according to their phenotypic similarity. A preliminary characterization of these isolates was conducted by means of both morphological and biochemical assays, but the restriction analysis of the amplified rDNA (ARDRA) and the sequencing of a 360-bp portion of the 16S rRNA gene were requested for their unequivocal identification. RAPD fingerprinting and UPGMA cluster analysis enabled genotypic intraspecific variation to be estimated, while acidification, proteolysis and autolysis were assessed for a selected subset of isolates. The polyphasic approach utilized showed that the fermentation and ripening of the Pecorino cheese is carried out by a heterogeneous microbial population, consisting of enterococci, *Streptococcus thermophilus* and several *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Weissella* and *Carnobacterium* species. Moreover, both the genotypic typing and the technological characterization of a selected pool of isolates allowed a remarkable biodiversity to be highlighted.

**Keywords:** cheese ripening, Pecorino Marchigiano cheese, lactic acid bacteria, technological characterization

## Isolamento e studio della microflora autoctona caratteristica di alcune produzioni casearie lombarde

Brasca M<sup>1\*</sup>, Lodi R<sup>1</sup>, Morandi S<sup>1</sup>, Todesco R<sup>1</sup> .....331-343

\* Corrispondenza ed estratti: milena.brasca@ispa.cnr.it

<sup>1</sup> CNR - ISPA, Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari. Via Celoria 2, 20133 Milano.

**RIASSUNTO** – La specificità e le particolari caratteristiche organolettiche dei formaggi tradizionali sono collegate rigorosamente all'elevata biodiversità della microflora autoctona. Nel corso dei secoli le tecnologie di produzione di questi formaggi hanno favorito la selezione di complessi ecosistemi microbici. Nel presente studio sono stati isolati 120 ceppi da 13 formaggi a latte crudo provenienti dal nordovest dell'Italia. I ceppi sono stati caratterizzati per la loro morfologia e per la presenza di proprietà biochimiche importanti tecnologicamente, quali l'attività acidificante, il potenziale redox, e le attività lipolitiche e proteolitiche in latte. Tutti i ceppi sono stati identificati a livello di specie tramite una identificazione fenotipica basata sul profilo di fermentazione dei carboidrati. Differenze nelle proprietà tecnologiche sono state trovate fra specie diverse ed anche all'interno della stessa specie. La pressione selettiva determinata dall'ambiente (la maggior parte degli isolati selezionati per questa ricerca provenivano da produzioni di montagna), la metodologia d'allevamento e la tecnologia di produzione (formaggi principalmente a latte crudo, a pasta cotta o semicotta ed a lunga maturazione) sono gli elementi che hanno determinato l'accumulo di biotipi con caratteristiche differenti.

**Parole chiave:** biodiversità, microflora autoctona, caratteristiche tecnologiche

**ABSTRACT** – *Studies on indigenous microflora isolated from some characteristics dairy production of Lombardy region.* – Specificity and peculiar sensory characteristics of traditional cheeses are strictly related to the high level of biodiversity of the indigenous microflora. Over the centuries the technologies of these cheeses have selected complex bacterial ecosystems. In the present study 120 strains were isolated from 13 raw milk cheeses of north-west Italy. The strains were characterized for their morphology and for the presence of technologically relevant biochemical properties such as acid production and redox activity, lipolytic and proteolytic activities in milk. All the strains were identified at species level by phenotypic identification based on carbohydrate fermentation profile galleries. Differences in technological properties were found between and also inside the species. Selective pressure carried out by the environment (most of the selected isolates for this investigation were coming from mountain productions), the breeding methodology and the technology (cheeses were mostly raw milk, cooked or semi-cooked and long ripening cheeses) lead to build-up biotypes with different characteristics.

**Keywords:** biodiversity, indigenous microflora, technological properties

## Studio del microbiota di formaggi tradizionali a latte crudo

Cocconcelli PS<sup>1,2\*</sup>, Cappa F<sup>1,2</sup> .....345-355

\* Corrispondenza ed estratti: pier.cocconcelli@unicatt.it

<sup>1</sup> Istituto di Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore. Via Emilia Parmense 84, 29100 Piacenza.

<sup>2</sup> Centro Ricerche Biotecnologiche. Via Milano 24, 26100 Cremona.

**RIASSUNTO** – Lo scopo di questo lavoro è stato lo studio dell'ecosistema microbico di formaggi prodotti nell'area alpina con latte crudo e senza aggiunta di innesto. In questi prodotti, il contributo al processo fermentativo è da ascrivere ai microrganismi naturalmente presenti nel latte o provenienti dall'ambiente di trasformazione. In particolare sono stati considerati i seguenti formaggi: Fromadzo di Valle d'Aosta; Bättelmatt di Val Formazza (Piemonte); Spressa, Puzzone di Moena, Nostrano di Primiero e Vezzena, prodotti in Trentino. Per valutare il microbiota associato a questi prodotti sono state applicate tecniche molecolari (analisi DGGE, sequenziamento del gene 16S rDNA; DNA fingerprinting), che hanno consentito l'identificazione di un ampio numero di specie e ceppi, confermando l'importanza e la ricchezza della diversità microbica associata ai formaggi alpini studiati. Tale approccio ha inoltre permesso di studiare le dinamiche di popolazione nel corso del processo di fermentazione e maturazione dei prodotti

*Parole chiave:* formaggi tradizionali, microbiota, latte crudo.

**ABSTRACT** – *Study on the microbiota of traditional, raw milk cheeses.* - The aim of this study was the microbiological characterization of cheeses produced in different alpine area made by raw milk without any addition of starter cultures. Therefore the microorganisms naturally present in raw milk coming from dairy environment are responsible of the fermentation process of the considered cheeses. The cheeses analyzed were: Fromadzo from Valle d'Aosta, Bättelmatt from Val Formazza (Piemonte), Spressa, Puzzone di Moena, Nostrano di Primiero, Vezzena from Trentino. Molecular techniques has been utilized to identify and characterize the microbiota and the fingerprinting techniques associated with DGGE analysis and sequencing of 16S rDNA allowed the identification of great number of strains. Moreover these techniques has been a useful tool to understand the population dynamics responsible of fermentation process and cheese ripening. As expected a great number of strains and species very different for every considered cheese has been isolated; these results underline the relevance and richness of the microbial biodiversity in the alpine cheeses.

*Keywords:* traditional cheese, microbiota, raw milk.

Cocconcelli *et* Cappa (2006) *Sci Tecn Latt-Cas*, 57 (5), 345-355

## Diversità microbica in alcuni formaggi tipici della Campania.

Coppola S<sup>1\*</sup>, Fusco V<sup>1</sup>, Aponte M<sup>1</sup>, Andolfi R<sup>1</sup> .....357-370

\* Corrispondenza ed estratti: sacoppol@unina.it

<sup>1</sup> Università degli Studi di Napoli Federico II, Dipartimento di Scienza degli Alimenti. 80055 Portici.

**RIASSUNTO** – In questa ricerca è stata valutata la diversità microbica in alcuni formaggi a pasta filata tipici della Campania, come la Mozzarella di Bufala Campana DOP, il Fior di Latte di Agerola ed il Provolone del Monaco. Utilizzando metodi di analisi classici e tecniche molecolari sia coltura-dipendenti che coltura-indipendenti è stata riscontrata un'ampia diversità microbica nei diversi prodotti. In particolare, nella Mozzarella di Bufala Campana, la composizione in specie riflette quella delle colture naturali in siero utilizzate per la sua fabbricazione, con dominanza di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* e *Streptococcus thermophilus*. Nel Fior di Latte di Agerola, la minore selettività delle varie fasi tecnologiche determina una ancora più ricca diversità microbica, con dominanza di *L. lactis* subsp. *lactis*, *S. thermophilus*, *L. helveticus* ed *Enterococcus faecalis* e ampia variabilità in biotipi di lattococchi e *L. helveticus*. Infine nel Provolone del Monaco, le più selettive fasi tecnologiche determinano una netta prevalenza di termofili quali *S. thermophilus*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus paracasei*, che persistono anche nel corso della stagionatura.

**Parole chiave:** formaggi tipici, Regione Campania, diversità microbica

**ABSTRACT** – *Microbial diversity of some typical cheeses from Campania region.* – The microbial diversity of the lactic acid bacteria (LAB) community associated with Mozzarella di Bufala Campana DOP, Fior di Latte di Agerola, and Provolone del Monaco, which are three typical pasta filata cheeses produced in Campania region, was evaluated using both classical and molecular (both culture-dependent and culture-independent) methods. A wide microbial diversity was highlighted: in particular, the microbial composition of Mozzarella di Bufala Campana cheese seemed related to that of the natural whey starter cultures used for the manufacture of this cheese, with a dominance of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus* and *Streptococcus thermophilus*. The less selective technological conditions applied to produce Fior di latte di Agerola cheese led to a wider LAB diversity in this product, with dominance of *L. lactis* subsp. *lactis*, *S. thermophilus*, *L. helveticus* and *Enterococcus faecalis* and a marked strain heterogeneity within the lactococcal and *L. helveticus* populations. Conversely, the more selective technological pressures applied to produce the Provolone del Monaco cheese led to a prevalence in this cheese of the thermophilic LAB microflora, which belonged to *S. thermophilus*, *Streptococcus macedonicus*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Lactobacillus paracasei*.

**Keywords:** typical cheese, Campania Region, microbial diversity

Tipizzazione genotipica e fenotipica delle popolazioni microbiche  
caratteristiche del formaggio “Toma Piemontese”

Fortina MG<sup>1</sup>\*, Ricci G<sup>1</sup>, Parini C<sup>1</sup>, Mora D<sup>1</sup>, Manachini PL<sup>1</sup>.....371-381

\* *Corrispondenza ed estratti:* grazia.fortina@unimi.it

<sup>1</sup> Dipartimento Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche - Sezione di Microbiologia Industriale, Università degli Studi di Milano. Via Celoria 2, 20133 Milano.

**RIASSUNTO** – E’ stata studiata la microflora del formaggio Toma Piemontese a denominazione di origine protetta (DOP) per ottenere informazioni sui batteri lattici coinvolti nella produzione di questo formaggio tradizionale. L’uso combinato di PCR 16S-23S dello spaziatore del rDNA, di sonde specie-specifiche, del sequenziamento del rDNA 16S e dell’ibridazione DNA/DNA ha permesso di identificare 116 cocchi e 11 lattobacilli mesofili. Fra i lattococchi, che costituivano il 67% dei cocchi isolati, sono stati identificati *Lactococcus lactis* e *Lactococcus garvieae*, con un’incidenza di quest’ultima specie superiore al previsto. In mancanza di dati in letteratura, sulle proprietà fisiologiche di ceppi di *L. garvieae* di origine casearia, sono state studiate caratteristiche fenotipiche e genetiche, allo scopo di ottenere una distinzione dei biotipi riguardo l’origine e per comprendere l’importanza funzionale ed ecologica della loro presenza nei prodotti lattiero caseari. Sono stati inoltre isolati enterococchi (16% dei cocchi), insieme a ceppi di *Streptococcus macedonicus* e *Streptococcus thermophilus*, quest’ultimo in quantità minore. Fra gli enterococchi isolati sono stati studiati 7 ceppi atipici. Uno studio polifasico, basato su sequenziamento del 16S rDNA, ibridazione DNA-DNA, analisi ITS e proprietà fenotipiche, ha dimostrato che questi enterococchi appartengono ad una nuova specie, per la quale è stato proposto il nome di *Enterococcus italicus*, con DSM 15952T (=LMG 22039T) come ceppo tipo. Per questa nuova specie è stata sviluppata una PCR specie-specifica usando primers disegnati sul gene 16S del rRNA.  
*Parole chiave:* *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, formaggi DOP

**ABSTRACT** – *Phenotypic and genetic study of characteristic microbial populations from Toma Piemontese cheese.* – We studied the natural bacterial population of the artisanal protected denomination origin (PDO) Toma Piemontese cheese in order to obtain information on the lactic acid bacteria involved in the traditional fermentation of this cheese. A total of 116 coccal isolates and 11 mesophilic lactobacilli were identified by the combined use of PCR 16S–23S rDNA spacer analyses, species-specific probes, 16S rDNA sequencing and DNA/DNA hybridization. Lactococci, that constituted 67% of the coccal isolates, were identified as *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae*, with an incidence of this latter species higher than expected. Since in literature no data on physiological properties of *L. garvieae* strains of dairy origin are available, we carried out a phenotypic and genetic study, with the aim of obtaining a discrimination of biotypes with respect to their source and an understanding of the functional and ecological significance of their presence in dairy products. Enterococci were also isolated (16% of the coccal isolates), together with strains of *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus*, the latter in a lower amount. Within enteroccal isolates seven atypical strains were investigated in a polyphasic study. By using 16S rDNA sequencing, DNA-DNA hybridization and ITS analysis, as well as by examining the phenotypic properties, the new isolates were shown to constitute a novel enterococcal species, for which the name *Enterococcus italicus* has been proposed, with DSM 15952T (=LMG 22039T) as the type strain. For this new species we developed a species-specific PCR assay with primers targeted to 16S rRNA gene.

*Keywords:* *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, PDO cheeses

## Caratterizzazione della microflora del formaggio Caprino Lombardo.

Foschino R<sup>1\*</sup>, Picozzi C<sup>1</sup>, Borghi M<sup>1</sup> ..... 383-392

\* *Corrispondenza ed estratti:* roberto.foschino@unimi.it

<sup>1</sup> Dipartimento Scienze e Tecnologie Alimentari e Microbiologiche, Università degli Studi di Milano. Via Celoria 2, 20133 Milano.

**RIASSUNTO** – Il Caprino Lombardo è un formaggio di capra fresco a pasta molle, fabbricato tradizionalmente con colture naturali in siero che permettono di ottenere una coagulazione acida senza uso di additivi. Per studiare la microflora presente nel Caprino Lombardo, sono stati analizzati campioni di latte, colture in siero e formaggio (fresco e dopo 15 giorni di maturazione) di sette caseifici situati in zone differenti della Lombardia. Nelle colture in siero sono risultati dominanti i lattococchi con valori medi di 9,19 log UFC/mL, mentre enterococchi e lieviti sono risultati presenti con valori medi rispettivamente di 3,42 log UFC/mL e 4,20 log UFC/mL. Nei formaggi di 1 e 15 giorni sono stati ritrovati rispettivamente: lattococchi, 9,27 e 8,58 log UFC/g; lieviti, 5,95 e 7,21 log UFC/g; enterococchi, 4,41 e 4,07 log UFC/g. Settantasei isolati sono stati identificati con metodi fenotipici e genotipici (RSA, PCR specifiche, e parziale sequenziamento del rDNA 16S). I ceppi sono stati tipizzati con RAPD-PCR, BOX-PCR e REP-PCR. *L. lactis* subsp. *lactis* è risultata la specie dominante (85%), mentre in numero minore erano presenti *L. garvieae* (10%), *S. thermophilus* (4%) e *L. raffinolactis* (1%). Sono state identificate anche 51 colonie di lieviti con metodi fenotipici, RAPD-PCR e parziale sequenziamento del rDNA 18S-26S. Le specie più rappresentate nei campioni di formaggio sono risultate *Galactomyces geotrichum* (35%), *Kluyveromyces lactis* (35%) e *Yarrowia lypolitica* (16%). Non sono state rilevate correlazioni fra le specie prevalenti nei formaggi, il periodo di isolamento e l'origine geografica. Alcuni ceppi sono risultati correlati all'azienda di produzione.

**Parole chiave:** formaggio Caprino, formaggi di capra, batteri lattici

**ABSTRACT** – *Characterization of the microflora of Caprino Lombardo cheese.* – Caprino Lombardo cheese is a fresh and soft Italian cheese traditionally made with raw goat milk and artisan whey cultures, that allow an acidic curdling of the milk, without using preservatives. Samples of milk, whey culture and cheese (fresh and ripened at 15 days) from seven farms located in different areas of Lombardy were analysed to investigate the microflora present in the productive chain of Caprino Lombardo. Lactococci predominated in the artisan whey cultures with a mean log count of 9.19 CFU/mL, whereas for enterococci and yeasts the mean log is respectively 3.42 CFU/mL and 4.20 CFU/mL. The 1-day old and 15-day old cheese samples showed, respectively, the mean log counts: 9.27 and 8.58 CFU/g for lactococci; 5.95 and 7.21 CFU/g for yeasts; 4.41 and 4.07 CFU/g for enterococci. Seventysix bacterial isolates were identified throughout phenotypic and genotypic analysis (RSA, specific-PCR and partial 16S rDNA region sequencing). Strain typing was carried out by RAPD PCR, BOX-PCR and REP-PCR. *L. lactis* subsp. *lactis* (85%) was the predominant species in cheese, followed by *L. garvieae* (10%), whereas *S. thermophilus* (4%) and *L. raffinolactis* (1%) were present as minor components. 51 yeast colonies were identified by fenotipic analysis, RAPD-PCR and partial 18S-26S rDNA region sequencing. The most detected yeast species in cheese samples were *Galactomyces geotrichum* (35%), *Kluyveromyces lactis* (35%) and *Yarrowia lypolitica* (16%). No relationship between the prevalence of species in cheeses and the period of isolation or territory was observed, however some strains appeared to be related to the farm.

**Keywords:** Caprino cheese, goat cheeses, lactic acid bacteria

Tecniche di classificazione per lo studio del DNA fingerprinting di batteri lattici di origine casearia

Gardini F<sup>1\*</sup>, Gatti M<sup>2</sup>, Trevisano C<sup>3</sup>, Fabrizi E<sup>3</sup>, Neviani E<sup>2</sup> .....393-406

\* *Corrispondenza ed estratti:* fgardini@kaiser.alma.unibo.it

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Bologna. Piazza Goidanich 60, 47023 Cesena.

<sup>2</sup> Dipartimento di Genetica Antropologia Evoluzione, Università degli Studi di Parma. Via Parco Area delle Scienze 14, 43100 Parma.

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Statistiche, Università degli Studi di Bologna. Via Belle Arti 41, 40126 Bologna.

**RIASSUNTO** – In questo lavoro è stata condotta l’analisi RFLP di 119 ceppi di *Lactobacillus helveticus* isolati da sieroinnesti di diversi formaggi (Grana Padano, Parmigiano-Reggiano, Provolone). I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando diversi approcci statistici con lo scopo di focalizzare gli aspetti positivi e negativi di ciascuno di essi. In particolare sono state utilizzate le procedure “unsupervised” comunemente impiegate nell’esplorazione dei dati molecolari (tecniche di clustering). Inoltre gli stessi dati sono stati analizzati con tecniche “supervised” come gli alberi di classificazione, le reti neurali, l’analisi discriminante lineare e la regressione logistica.

**Parole chiave:** *Lactobacillus helveticus*, biodiversità, RFLP, sieroinnesto

**ABSTRACT** – *Classification techniques for the evaluation of DNA fingerprinting of lactic acid bacteria of dairy origin.* – In this work, restriction fragment length polymorphism (RFLP) of 119 *Lactobacillus helveticus* strains isolated from natural whey starter for different cheeses has been carried out. The data obtained were analyzed by using different statistical approaches with the aim to highlight the positive and negative aspects of each one. In particular, unsupervised procedures have been adopted, using the traditional approach to the statistical exploitation of molecular data (clustering techniques). The data were also analyzed with supervised techniques, such as classification trees, neural network, linear analysis, and logistic regression.

**Keywords:** *Lactobacillus helveticus*, biodiversity, RFLP, natural whey starter

Un sistema modello per prevedere l'attività aminopeptidasica dei batteri lattici durante la maturazione del Parmigiano-Reggiano.

Gatti M<sup>1</sup>, Lazzi C<sup>1</sup>, Bernini V<sup>1</sup>, De Dea Lindner J<sup>1</sup>, Bottari B<sup>1</sup>, Santarelli M<sup>1</sup>,  
Turroni F<sup>1</sup>, Mucchetti G<sup>2</sup>, Neviani E<sup>1\*</sup>.....407-419

\* *Corrispondenza ed estratti:* erasmo.neviani@unipr.it

<sup>1</sup> Dipartimento Genetica, Biologia dei Microrganismi, Antropologia Evoluzione, Università di Parma. Via Parco Area delle Scienze 11/A, 43100 Parma.

<sup>2</sup> Dipartimento Ingegneria Industriale. Viale GP Usberti 181/A, 43100 Parma.

**RIASSUNTO** - Scopo del presente lavoro è valutare in quali fasi della produzione e della maturazione del formaggio Parmigiano-Reggiano, due attività aminopeptidasiche dei batteri lattici (LAB) possano essere coinvolte nella degradazione della caseina. Sono stati studiati gli effetti della concentrazione di NaCl, del pH e della temperatura sulla caseificazione a Parmigiano-Reggiano ed in che modo le aminopeptidasi possono idrolizzare i substrati Lys- $\beta$ -naftilammina e Leu- $\beta$ -naftilammina. Al fine di ottenere modelli matematici che permettessero di predire l'attività potenziale di ciascuna peptidasi lungo un periodo di 12 mesi, in tre diverse zone del formaggio, è stato utilizzato un disegno sperimentale. I modelli predittivi elaborati variando pH, temperatura e concentrazione salina sono stati utili per comprendere quando l'aminopeptidasi Pep-N e la leucil-aminopeptidasi Pep-L siano coinvolte nella proteolisi del formaggio e quando siano indotte o inibite dalle condizioni di maturazione e dalle dimensioni del formaggio per tutti i valori delle variabili studiate all'interno del range considerato nel disegno sperimentale.

**Parole chiave:** attività aminopeptidasiche LAB, modelli predittivi, Parmigiano-Reggiano

**ABSTRACT** – *A model system to predict the aminopeptidase activity of LAB during ripening of Parmigiano-Reggiano cheese.* – The aim of this work is to investigate in which phases of production and ripening of Parmigiano-Reggiano cheese, two LAB aminopeptidase activities could be involved in casein breakdown. We studied the effect of NaCl concentration, pH and temperature on the Parmigiano-Reggiano cheese production, and how the aminopeptidases can hydrolyze Lys- $\beta$ -naphthylamine and Leu- $\beta$ -naphthylamine substrates. An experimental design was used to obtain mathematical models allowing the prediction of the potential activity of each peptidase over a period of 12 months, in three different zones of the cheese. The predictive models elaborated varying pH, temperature and salt concentration were useful to understand when the aminopeptidase Pep-N and leucil-aminopeptidase Pep-L participate to cheese proteolysis and are induced or inhibited by the ripening conditions and by the cheese dimension for all the values of the studied variables within the ranges considered in the experimental design.

**Keywords:** LAB aminopeptidase activities, predictive models, Parmigiano-Reggiano cheese

Caratterizzazione della microflora filo-casearia del Canestrato  
Pugliese e sua utilizzazione in forma di starter aggiunti.

Gobbetti M<sup>1\*</sup>, Di Cagno R<sup>1</sup>, De Angelis M<sup>1</sup>.....421-431

\* *Corrispondenza ed estratti:* gobbetti@agr.uniba.it

<sup>1</sup> Università di Bari, Dipartimento di Produzione delle Piante e Microbiologia Applicata. Via Amendola 165/A, 70126 Bari.

**RIASSUNTO** – Questo lavoro riporta la sintesi di tre articoli pubblicati nel corso del progetto finalizzato triennale “Valorizzazione della microflora autoctona caratteristica delle produzioni casearie italiane”. Si riportano i dati più significativi relativi alla caratterizzazione microbiologica e biochimica del formaggio Canestrato Pugliese, un formaggio a Denominazione di Origine Protetta (DOP) prodotto con latte di pecora. Le principali specie di batteri lattici (LAB), individuate mediante amplificazione e sequenziamento del gene 16S rRNA degli isolati, sono state *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus reuteri*. Le caratteristiche sensoriali e il profilo aromatico volatile del Canestrato Pugliese sono state poste a confronto con altri due formaggi di pecora, il Fiore Sardo e il Pecorino Romano. Sono stati identificati 62 componenti volatili; il profilo aromatico volatile e le caratteristiche sensoriali dei tre formaggi differivano significativamente. I LAB identificati dal Canestrato Pugliese sono stati testati individualmente quali colture “aggiuntive” o complementari allo starter acidificante in Caciotte modello, allo scopo di valutarne l’impatto sulla proteolisi e lipolisi nel corso della maturazione.

**Parole chiave:** microflora casearia, formaggio Canestrato Pugliese, starter lattici

**ABSTRACT** – *Characterization of dairy microflora associated with Canestrato Pugliese cheese and its use as adjunct starter.* – This work represents the synthesis of three published papers during the three-years project on “Valorizzazione della microflora autoctona caratteristica delle produzioni casearie italiane”. Microbiological, compositional and biochemical characterization of the Protected Designation of Origin (PDO) Canestrato Pugliese ewe’s milk cheese was reported. *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus reuteri* were the main lactic acid bacteria (LAB) species identified by amplification and sequencing of 16S rRNA genes. Canestrato Pugliese was compared for volatile profile and sensory characteristics to other two Italian ewes’ milk cheeses, Fiore Sardo and Pecorino Romano. Sixtytwo volatile components were identified and the volatile profile of the three cheeses differed significantly such as the sensory characteristics. LAB identified from Canestrato Pugliese were used individually as adjunct cultures to assess the proteolytic and lipolytic activities during ripening of model Caciotta cheese.

**Keywords:** dairy microflora, Canestrato Pugliese cheese, lactic starters

Caratterizzazione della flora indigena di batteri lattici isolati da formaggio Montasio.

Maifreni M<sup>1</sup>, Marino M<sup>1</sup>, Bartolomeoli I<sup>1</sup>, Rondinini G<sup>1</sup>.....433-444

\* *Corrispondenza ed estratti:* michela.maifreni@uniud.it

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine. Via Marangoni 97, 33100 Udine.

**RIASSUNTO** – Scopo di questo studio è stato di studiare le dinamiche della microflora durante la maturazione del formaggio Montasio, con riferimento specifico ad alcune caratteristiche di interesse biotecnologico. Sono state analizzate 9 lavorazioni di Montasio prodotto in diversi caseifici. *Streptococcus thermophilus* è risultata la specie dominante durante l'intero periodo di maturazione del Montasio. Anche gli enterococchi erano frequentemente presenti. Questo gruppo microbico deriva dal latte e la proporzione diminuiva velocemente durante la maturazione. Sono stati isolati 100 ceppi di *S. thermophilus* ed è stata verificata la loro attività acidificante in latte a 42°C. Il pH è stato misurato ad intervalli di 5 min nel corso di 24 h di incubazione. Al termine della fermentazione sono stati valutati vari parametri cinetici, elaborati usando l'analisi dei clusters, per classificare le colture in categorie definite sulla base delle capacità acidificanti. I parametri di acidificazione hanno permesso di raggruppare le colture in 3 gruppi, ben correlati sulla base delle prestazioni scarse, medie e buone.

*Parole chiave:* formaggio Montasio; batteri lattici; proprietà tecnologiche

**ABSTRACT** – *Characterization of indigenous lactic acid bacteria isolated from Montasio cheese.* –The aim of this study was to investigate the dynamics of the microflora during Montasio cheese ripening, with specific reference to some characteristics of biotechnological interest. Nine batches of Montasio cheese produced in different plants were analysed. *Streptococcus thermophilus* was the predominant species throughout the whole ripening period of Montasio cheese. Enterococci were also frequently present. This microbial group resulted probably from milk, and its proportion decreased rapidly during ripening. From isolates, one-hundred *S. thermophilus* strains were tested for their acidification activity in milk incubated at 42°C. The pH was measured at 5-min intervals during 24 h of incubation. At the end of fermentation time several kinetics parameters were evaluated, which were elaborated using cluster analysis in order to classify the cultures into defined categories with similar acidification performances. Clustering of acidification parameters grouped the cultures in 3 clusters, well correlated with bad, medium and good performances.

*Keywords:* Montasio cheese; lactic acid bacteria; technological properties

Maifreni *et al* (2006) *Sci Tecn Latt-Cas*, 57 (5), 433-444

Isolamento e caratterizzazione della microflora naturale colonizzante il formaggio Fiore Sardo (DOP).

Mannu L<sup>1</sup>, Comunian R<sup>1\*</sup>, Daga E<sup>1</sup>, Paba A<sup>1</sup>, Demuro PP<sup>1</sup>, Scintu MF<sup>1</sup> .....445-453

\* *Corrispondenza ed estratti*: comunian.r@tiscali.it

<sup>1</sup> Istituto Zootecnico e Caseario per la Sardegna, Località Bonassai. 07040 Olmedo (SS).

**RIASSUNTO** – Il Fiore Sardo è un formaggio duro tradizionale prodotto in Sardegna a livello aziendale utilizzando latte crudo di pecora, caglio di agnello in pasta, e senza aggiunta di colture starter sia selezionate che naturali. I campioni di formaggio prodotti in due aziende (A e B) sono stati raccolti a 24 ore, a 1 mese e a 3,5 mesi dopo la fabbricazione. Da ogni campione sono stati isolati batteri lattici ed è stata studiata la diversità genetica inter- e intra-specie. I 180 isolati (139 cocchi e 41 lattobacilli) sono stati identificati tassonomicamente con tecniche PCR e ARDRA. Tutti i bastoncini isolati appartenevano a lattobacilli eterofermentanti facoltativi (FHL); sono state ritrovate soltanto due specie, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus paracasei*, con la sola eccezione di un isolato appartenente alla specie *Lactobacillus curvatus*. I cocchi appartenevano alla specie *Lactococcus lactis* o al genere *Enterococcus*. Fra gli enterococchi, circa il 50% degli isolati, identificati con PCR, sono risultati appartenere alla specie *E. faecium*. La distribuzione di questa specie e lo sviluppo durante la maturazione del formaggio erano differenti nei campioni dei due produttori. Tutti i lattococchi e gli FHL isolati sono stati tipizzati a livello di ceppo tramite lo studio del profilo plasmidico e con tecnica fAFLP. La diversità genetica è risultata variare tra l'80 ed il 100% per i tre periodi esaminati. Inoltre, per tutti gli isolati sono state studiate le attività acidificante, proteolitica, autolitica e la capacità di fermentazione del citrato. La complessità genetica osservata in questo studio è di rilevante importanza per la salvaguardia della microflora naturale di questo formaggio tradizionale a latte crudo a Denominazione di Origine Protetta.

**Parole chiave**: batteri lattici, diversità microbica, formaggio Fiore Sardo

**ABSTRACT** – *Isolation and characterization of natural microflora of Fiore Sardo cheese (PDO)*. – Fiore Sardo is a traditional hard cheese manufactured in the island of Sardinia at farmhouse level from ewe's raw milk, using lamb rennet paste, and without any addition of selected or natural starter culture. Samples of cheese manufactured in two farms (A and B) were collected at 24h, 1 and 3,5 months after the manufacture. The inter-and intraspecies genetic diversity of lactic acid bacteria isolated at each sampling points was investigated. 180 isolates (139 cocci and 41 lactobacilli) were taxonomically identified by PCR and ARDRA. All the rods isolated belonged to the facultatively heterofermentative lactobacilli (FHL) group; only two species were found, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei*, with the sole exception of one isolate which belonged to *Lactobacillus curvatus*. The cocci were ascribed either to *Lactococcus lactis* or *Enterococcus* genus. Within the genus *Enterococcus*, about 50% of the isolates were PCR-identified as *E. faecium*. The distribution of these species and their evolution during the cheese ripening were different in the samples from the two producers. All the FHL and lactococci isolates were typed at strain level by means of plasmid profiling and fAFLP technique. The genetic diversity at subspecies level, ranged from 80 to 100% during the three periods examined. The acidifying ability, the proteolytic, the autolytic activity and the citrate fermentation ability of the isolates were also investigated. The genetic complexity observed in the present study is of particular relevance in the preservation of the natural microflora of traditional Protected Designation of Origin raw milk cheeses.

**Keywords**: lactic acid bacteria, microbial diversity, Fiore Sardo cheese

Isolamento e caratterizzazione di *Lactococcus lactis* dal microbiota di formaggi tipici da latte bovino e ovino prodotti in Abruzzo e Molise

Matteucci O<sup>1\*</sup>, Creati B<sup>1</sup>, Semprini P<sup>1</sup>, Migliorati G<sup>1</sup>, Di Giannatale E<sup>1</sup>....455-467

\* *Corrispondenza ed estratti*: o.matteucci@izs.it

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale". Campo Boario, Teramo.

**RIASSUNTO** – Sono stati isolati 67 ceppi della specie *Lactococcus lactis* da formaggi tipici da latte bovino e ovino e da un campione di latte di pecora, prodotti in Abruzzo e Molise. Tutti i ceppi sono stati caratterizzati sotto il profilo fenotipico e genotipico. Le sottospecie *cremoris* (33%) e *lactis* (67%) sono state caratterizzate con PCR specie-specifica e analisi di fingerprinting con RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Impiegando 2 primer, la RAPD ha permesso di distinguere isolati risultati simili all'indagine fenotipica. Molti ceppi sono risultati specifici degli impianti di produzione. Il lavoro rappresenta il primo studio polifasico per caratterizzare gli isolati di *Lactococcus lactis* e dimostrare la tipicità di alcuni formaggi prodotti in Abruzzo e Molise.

**Parole chiave**: formaggi tipici, *Lactococcus lactis*, PCR specie-specifica, RAPD

**ABSTRACT** – *Isolation and characterization of Lactococcus lactis from the microbiota of typical bovine and ovine cheeses produced in Abruzzo and Molise regions.* – Sixtyseven strains of *Lactococcus lactis* were isolated from one ewe's milk sample and ten typical bovine and ewe cheeses, produced in Abruzzo and Molise regions, and were phenotypically and genotypically characterized. The subspecies *cremoris* (33%) and *lactis* (67%) were characterized by species-specific PCR and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. Two primer-RAPD allowed to detect the heterogeneity of the isolates, otherwise similar at the phenotypic analysis. Several strains resulted to be specific of their processing plant. This article represents the first polyphasic study to characterize the *Lactococcus lactis* strains isolated from milk and cheeses produced in Abruzzo and Molise, in order to demonstrate their typicity.

**Keywords**: Typical cheeses, *Lactococcus lactis*, species-specific PCR, RAPD

Matteucci *et al* (2006) *Sci Tecn Latt-Cas*, 57 (5), 455-467

## Studio della biodiversità microbica in formaggi nostrani trentini.

Poznanski E<sup>1\*</sup>, Franciosi E<sup>1</sup>, Cavazza A<sup>1</sup>.....469-478

\* Corrispondenza ed estratti: elisa.poznanski@iasma.it

<sup>1</sup> Istituto Agrario di San Michele all'Adige (IASMA), Centro Sperimentale - Unità Microbiologia e Tecnologie Alimentari, Via E. Mach 1. 38010 S. Michele all'Adige (TN).

**RIASSUNTO** – Lo scopo di questo lavoro era studiare la microbiologia di formaggi prodotti nella regione Trentino a partire da latte crudo e utilizzando un innesto naturale (formaggio Nostrano). I microrganismi naturalmente presenti nel latte crudo e derivanti dall'ambiente di trasformazione sono responsabili del processo fermentativo nei formaggi. I prodotti considerati sono stati: Spressa, Puzzone di Moena, Nostrano di Primiero e Vezzena. Per caratterizzare gli isolati, sono state applicate tecniche sia tradizionali che molecolari. I ceppi sono stati identificati mediante PCR specie-specifica, analisi DGGE e sequenza del gene 16S rRNA. Le stesse tecniche hanno permesso di descrivere le dinamiche di popolazione durante la fase iniziale e finale di fermentazione e nel corso della maturazione dei formaggi. I quattro formaggi Nostrano studiati hanno mostrato una notevole diversità nella successione microbica e un numero rilevante di ceppi e specie fra un formaggio e un altro. Pertanto, prodotti ottenuti con le medesime pratiche tecnologiche in Trentino sono caratterizzati da un'ampia diversità microbica.

*Parole chiave:* diversità microbica, formaggi nostrani trentini, PCR, DGGE

**ABSTRACT** – *Study of the microbial diversity in artisan Trentino cheeses.* – Aim of this work was to study the microbiology of cheeses produced in Trentino region with raw milk and the addition of a natural starter culture (Nostrano cheese). The microorganisms naturally present in raw milk coming from dairy environment are responsible of the fermentation process of the considered cheeses, that were: Spressa, Puzzone di Moena, Nostrano di Primiero and Vezzena. The study was performed using traditional and molecular techniques in order to characterize the isolated strains, which identification was carried out with species-specific PCR, DGGE analysis and sequencing of 16S rDNA. By using the same techniques it was possible to study the population dynamics during early and late fermentation, and ripening of the cheeses. The four studied Nostrano cheeses showed big difference in microbial succession, a relevant number of strains and species from each one has been isolated, indicating that cheeses produced by the same manufacturing practice in Trentino bear high microbial biodiversity leading to very different products.

*Keywords:* microbial diversity, artisan Trentino cheeses, PCR, DGGE

## Diversità microbica di batteri lattici non-starter isolati da formaggi artigianali italiani

Rossetti L<sup>1</sup>, Remagnì M<sup>1</sup>, Zago M<sup>1</sup>, Bonvini B<sup>1</sup>, Fornasari ME<sup>1</sup>, Cerri D<sup>2</sup>,  
Carminati D<sup>1</sup>, Giraffa G<sup>1\*</sup>.....479-487

\* *Corrispondenza ed estratti:* ggiraffa@ilclodi.it

<sup>1</sup> CRA-Istituto Sperimentale Lattiero Caseario, Via Lombardo 11. 26900 Lodi.

<sup>2</sup> Università di Pisa, Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Via delle Piagge, 11. 56124 Pisa.

**RIASSUNTO** – Lo scopo di questo lavoro era di valutare la diversità microbica di batteri lattici non-starter (NSLAB) presenti in formaggi artigianali italiani. A tal fine, circa 500 ceppi isolati da formaggi a latte crudo sono stati identificati mediante PCR specie-specifica e caratterizzati sia genotipicamente, (con RAPDPCR) che fenotipicamente, applicando test fisiologici e biochimici classici. Il sequenziamento parziale del gene 16S rRNA ha consentito di identificare i casi dubbi. Le specie più frequentemente ritrovate sono state *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus* e *Streptococcus macedonicus*. Molti ceppi sono risultati appartenere a specie, come *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus*, tipicamente associate allo starter. La RAPD-PCR ha messo in evidenza un'ampia eterogeneità genotipica, in parte correlabile alle diverse aree geografiche di isolamento. In alcuni casi, i ceppi si distribuivano in modo specifico all'interno dei singoli formaggi, sottolineando una possibile selezione di biotipi dominanti legata a fattori tecnologici. I dati consentono di ipotizzare eventuali associazioni fra ceppi di NSLAB da utilizzare come colture aggiuntive (o complementari) all'innesto nella formulazione di "starter funzionali". Per raggiungere questo scopo, gli isolati saranno caratterizzati fenotipicamente, indagando specificamente alcune proprietà biochimiche di interesse tecnologico.  
*Parole chiave:* diversità microbica, batteri lattici non-starter, formaggi, PCR

**ABSTRACT** – *Microbial diversity of non-starter lactic acid bacteria isolated from artisan Italian cheeses.* – A microbial characterization of about 500 strains of non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from different Italian, artisan cheeses was carried out. Genotypic identification and typing were performed by species-specific PCR and RAPD-PCR. DNA sequencing of partial 16S rRNA gene was carried out on unidentified strains. Phenotypic characterization was carried out by classical biochemical and physiological tests. Isolates belonged to *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, and *Streptococcus macedonicus* were also found. Many starter LAB belonging to *Lactococcus lactis* and *Streptococcus thermophilus* were isolated as well. RAPDPCR evidenced a wide strain heterogeneity, which seemed related to the various cheese production areas or cheese types. In particular, grouping and distribution of the different species and strains seemed to indicate that technological factors may have caused a selection of some dominant biotypes within different cheeses. Well-defined strain associations of the main LAB species recovered, to be used as complementary (or adjunct) cultures for artisan cheese productions, could be suggested. To reach this goal, isolates will be phenotypically characterized by studying biochemical traits of technological interest.

*Keywords:* microbial diversity, non-starter lactic acid bacteria, artisan cheeses, PCR

La biodiversità microbica in relazione ad alcune produzioni della regione Umbria: formaggio Pecorino e Mozzarella “Fior di Latte”.

Rossi J<sup>1</sup>, Massitti O<sup>1</sup>, Settanni L<sup>2</sup>, Mastrangelo<sup>1,2</sup> M, Cenci G<sup>3</sup>, Corsetti A<sup>2\*</sup>.489-496

\* Corrispondenza ed estratti: acorsetti@unite.it

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Sezione di Tecnologie e Biotecnologie degli Alimenti, Università degli Studi di Perugia. Via S. Costanzo, 06126 Perugia.

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Sezione Microbiologia Agro-Alimentare ed Ambientale. Università degli Studi di Teramo. Via Lerici 1, 64023 Mosciano Sant'Angelo (TE).

<sup>3</sup> Dipartimento di Biologia Cellulare ed Ambientale. Università degli Studi di Perugia. Via del Giochetto 1, 06126 Perugia.

**RIASSUNTO** – Sono stati analizzati 6 formaggi Pecorino e 6 starters naturali (lattoinnesti) per Mozzarella, tipici della regione Umbria, per valutare la biodiversità microbica. I ceppi di batteri lattici isolati (122 bastoncini e 125 cocci), sono stati studiati sia per quanto riguarda il fenotipo (con sistemi API 50 CH e API 20 Strep, Biomerieux), sia per il genotipo (PCR-RAPD, utilizzando i primers M13 e 1254), e per caratteristiche tecnologiche (cinetica di acidificazione a 30° e 37°C; autolisi; attività proteasica e peptidasica). Per alcuni ceppi sono state inoltre valutate le attività batteriocinogeniche e antigenotossiche, così come l'antibiotico resistenza.

**Parole chiave:** batteri lattici, Pecorino, Mozzarella

**SUMMARY** – *Microbial biodiversity as related to some cheese productions of the Umbria region: Pecorino cheese and “Fior di Latte” mozzarella cheese.* – Six Pecorino cheese and six natural starters (lattoinnesto) for Mozzarella cheese, typical of the Umbria region, were analysed for bacterial biodiversity. The strains isolated (122 rods and 125 cocci), belonging to the lactic acid bacteria (LAB) group, were investigated from a phenotypic (API 50 CH e API 20 Strep system, Biomerieux), genotypic (PCR-RAPD, employing primers M13 and 1254) and technological (kinetics of acidification at 30 and 37°C; autolysis; proteinase and peptidase activity) point of view. Bacteriocinogenic as well as antigenotoxic activity and antibiotic resistance were also estimated on some strains.

**Keywords:** lactic acid bacteria, Pecorino cheese, Mozzarella cheese

## Isolamento e caratterizzazione della microflora autoctona dei formaggi Trentingrana, Monte Veronese e Val Venosta

Simeoni D, Gatto V, Knijff E, Sabbatini G, Cristofolletti M, Dellaglio F..497-505

\* *Corrispondenza ed estratti:* simeoni@sci.univr.it

<sup>1</sup> Dipartimento Scientifico e Tecnologico, Università degli Studi di Verona. Strada Le Grazie 15, 37134 Verona.

**RIASSUNTO** – Trentingrana, Monte Veronese e Val Venosta sono tre formaggi tipici prodotti nella zona alpina centro-orientale. Questi prodotti sono caratterizzati da una microflora peculiare, o “autoctona”, che contribuisce alla loro elevata qualità. Risulta quindi importante e necessario conoscere in modo approfondito i batteri lattici autoctoni associati a questi formaggi, al fine di meglio comprenderne il ruolo. Inoltre, in questi ultimi anni è aumentato l’interesse legato agli aspetti di sicurezza igienica degli alimenti. In particolare, un crescente interesse è rivolto alla valutazione di alcuni caratteri associati ai microrganismi presenti nei formaggi, come la produzione di ammine biogene e l’antibiotico-resistenza. E’ auspicabile l’utilizzo di batteri starter selezionati e GRAS (Generally Recognized as Safe) in grado di inibire la crescita di microrganismi patogeni o deterioranti.

**Parole chiave:** Trentingrana, Monte Veronese, Val Venosta, batteri lattici

**SUMMARY** – *Isolation and characterization of autochthonous microbial strains from Trentingrana, Monte Veronese and Val Venosta cheeses.* – Trentingrana, Monte Veronese and Val Venosta cheeses represent typical products of the middle-east region of the Alps. Indeed, they are characterised by a peculiar autochthonous microflora that carries out the production of these high quality and typical cheeses. Therefore, it is important and necessary a deep knowledge of the autochthonous lactic acid bacteria that play an important role in the production of these cheeses. In addition, in the last years, a growing concern has been addressed on the safety of the foods, in particular they must not contain bacteria able to produce biogenic amines or to be antibiotic resistant. Moreover, the use of selected GRAS (generally recognised as safe) bacteria able to produce metabolites inhibiting the growth of pathogenic or spoilage microorganisms is highly appreciated.

**Keywords:** Trentingrana cheese, Monte Veronese cheese, Val Venosta cheese, lactic acid bacteria

## Caratterizzazione della microflora lattica del Caciocavallo Silano.

Suzzi G<sup>1\*</sup>, Serio AL<sup>1</sup>, Tofalo R<sup>1</sup>, Schirone M<sup>1</sup>.....507-513

\* *Corrispondenza ed estratti:* [suzzi@unite.it](mailto:suzzi@unite.it)

<sup>1</sup> Università degli Studi di Teramo. Via Lerici 1, 64023 Mosciano Stazione, Teramo.

**RIASSUNTO** – Il Caciocavallo Silano è un formaggio duro a pasta filata, tipicamente prodotto in Basilicata e in tutto il sud Italia. Sono stati isolati più di 600 ceppi di batteri lattici da sieroinnesto naturale e formaggio a vari tempi di stagionatura, provenienti da differenti produttori. I ceppi sono stati identificati mediante test fenotipici e valutazione del profilo delle proteine di parete. Le specie più ritrovate negli innesti naturali sono state *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* con una limitata biodiversità all'interno della stessa produzione, testimoniata dal fatto che ogni singola coltura era dominata da una sola specie. L'analisi SDS-PAGE delle proteine totali dei ceppi isolati dai formaggi ha consentito di ottenere, ad un livello di similarità dell'80%, 31 differenti clusters. All'inizio della maturazione la specie più frequente è risultata *Lc. lactis*, mentre col procedere della maturazione i batteri lattici dominanti sono risultati appartenere al gruppo *Lactobacillus casei*/*Lactobacillus paracasei*. La presenza di specie eterofermentanti come *L. fermentum* e *Lactobacillus brevis* è risultata spesso associabile a difetti di gonfiore. L'analisi statistica non ha evidenziato una particolare correlazione fra la composizione della popolazione microbica al termine della stagionatura e l'area produttiva, né fra il microbiota di Caciocavallo DOP e quello di prodotti simili. I parametri chimico-fisici dei formaggi, come pH e umidità, sembrano influenzare la composizione microbica. Tranne alcuni ceppi di *E. faecalis*, i ceppi indagati hanno mostrato un limitato potere acidificante e scarsa attività lipolitica e proteolitica. Solo qualche ceppo di *E. faecalis* e un isolato di *L. lactis* sono risultati in grado di decarbossilare la tirosina, con possibile produzione di tiramina, mentre nessun ceppo è stato in grado di decarbossilare l'istidina.  
*Parole chiave:* Caciocavallo Silano, diversità microbica, microflora lattica, caratterizzazione fenotipica

**ABSTRACT** – *Characterization of the lactic microflora of Caciocavallo Silano cheese.* – Caciocavallo Silano is a hard “pasta filata” cheese, typically produced in Basilicata and in all South Italy. From natural whey cultures and cheeses coming from several housefarms, at different ripening stages, more than 600 lactic acid bacteria were isolated and then analysed for biochemical and technological traits. They were identified by means of phenotypical features, combined with cell wall proteins profile. The most abundant species in whey cultures were *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* and *Lactococcus lactis*, with a small biodiversity within the same batch, since each whey culture was dominating by only one species. Among the isolates from cheeses during ripening, the SDS-PAGE analysis of cell proteins allowed to obtain 31 different clusters at 80% of similarity. As expected, several species were found, and the most abundant were *Lactococcus lactis* at the beginning of ripening, while they belonged to the group *Lactobacillus casei*/*paracasei* for the cheeses as the ripening proceeded. The presence of some heterofermentative species, such as *L. fermentum* and *L. brevis*, seemed to be correlated with gaseous defects. Statistical analysis revealed that no correlation existed between microbial population at the end of ripening, and production area, nor between microbiota of Caciocavallo produced in DOP area and that of other similar products. Physical-chemical parameters of cheeses, such as pH and humidity seemed to influence microbiota composition. About technological capabilities, the strains showed a low acidifying power, with the exception of some *E. faecalis* strains, and scarce lipolytic and proteolytic activities. About safety aspects, only few *E. faecalis* and one *Lc. lactis* decarboxylated tyrosine, with possible production of tyramine, while none decarboxylated histidine.  
*Keywords:* Caciocavallo Silano cheese, microbial diversity, lactic microflora, phenotypic characterization

Isolamento e caratterizzazione dei ceppi microbici autoctoni dei formaggi siciliani, Pecorino Siciliano e Ragusano.

Torriani S<sup>1\*</sup>, Simeoni D<sup>1</sup>, Rizzotti L<sup>1</sup>, Gatto V<sup>1</sup> .....515-523

\* *Corrispondenza ed estratti*: sandra.torriani@univr.it

<sup>1</sup> Dipartimento Scientifico e Tecnologico, Università degli Studi di Verona. Strada Le Grazie 15, 37134 Verona.

**RIASSUNTO** – In questo lavoro è stata studiata la microflora lattica di due tipici formaggi siciliani (Ragusano e Pecorino Siciliano) prodotti secondo tecnologie tradizionali. Sono stati identificati diversi generi e specie di batteri lattici (LAB) e la caratterizzazione fenotipica e genotipica di 200 isolati (cocchi e bastoncini) ha evidenziato un'elevata biodiversità intra-specifica. Gli enterococchi sono risultati la componente più rilevante della popolazione di LAB di questi formaggi; degno di nota è stato il rilevamento della specie *S. macedonicus* nel formaggio Ragusano. Per valutare la possibilità di utilizzare questi isolati, come starter, sono state studiate alcune caratteristiche relative alla sicurezza, quali l'assenza di antibiotico resistenza, l'emolisi, la produzione di ammine biogene, e la presenza di importanti proprietà funzionali, come la capacità di liberare metaboliti attivi contro l'ACE (Angiotensin-I-Converting Enzyme) o di produrre batteriocine. I risultati ottenuti dimostrano la presenza in questi formaggi siciliani di ceppi idonei che possono essere ulteriormente studiati per sviluppare specifici e standardizzati processi di produzione dei formaggi usando starter autoctoni.

**Parole chiave**: Pecorino Siciliano, Ragusano, batteri lattici

**ABSTRACT** – *Characterization of autochthonous microbial strains isolated from Sicilian cheeses, Pecorino Siciliano and Ragusano.* – In this research the lactic microflora of two typical Sicilian cheeses (Ragusano and Pecorino Siciliano) produced by traditional technologies was investigated. Several genera and species of lactic acid bacteria (LAB) were recognised and the phenotypic and genotypic characterisation of the 200 coccal- and rod-shape isolates highlighted a huge intra-specific biodiversity. Enterococci were found as the most relevant component of the LAB population of these cheeses; the detection of *S. macedonicus* in the Ragusano cheese is noteworthy. To explore the suitability of the isolates to be used as potential starters, some traits related to the safety, such as the absence of antibiotic resistance, haemolysis or production of biogenic amines, or the presence of important functional properties, i.e. the ability to release metabolites against ACE (Angiotensin-I-Converting Enzyme) or bacteriocins, were determined. The obtained results indicate the existence in these Sicilian cheeses of proper candidate strains which can be deeply explored for the development of specific and more standardised cheese-making processes using autochthonous starters.

**Keywords**: Pecorino Siciliano cheese, Ragusano cheese, lactic acid bacteria

Torriani *et al* (2006) *Sci Tecn Latt-Cas*, 57 (5), 515-523

Identificazione e caratterizzazione di batteriofagi di lattobacilli termofili isolati da innesti naturali.

Zago M<sup>1\*</sup>, Rossetti L<sup>1</sup>, Fornasari ME<sup>1</sup>, De Lorentiis A<sup>1</sup>, Bonioli A<sup>1</sup>,  
Perrone A<sup>1</sup>, Giraffa G<sup>1</sup>, Carminati D<sup>1</sup>.....525-534

\* *Corrispondenza ed estratti:* miriam.zago@entecra.it

<sup>1</sup> C.R.A. - Istituto Sperimentale Lattiero Caseario. Via Lombardo 11, 26900 Lodi.

**RIASSUNTO** – Sieroinnesti naturali che non mostravano problemi di attività acidificante sono risultati un potenziale serbatoio di fagi. Utilizzando tecniche colturali tradizionali è stata dimostrata in 16 sieroinnesti su 32 la presenza di fagi di lattobacilli termofili. L'impiego di un metodo PCR ha permesso di evidenziare in altri 53 sieroinnesti per Grana Padano la presenza di DNA di fagi di *L. delbrueckii* subsp. *lactis*. I fagi di *L. helveticus* e di *L. delbrueckii* subsp. *lactis* sono stati poi caratterizzati in base allo spettro d'ospite, alla capacità di formare placche di lisi su agar, all'efficienza di replicazione ed in funzione del profilo di endorestrizione ottenuto per digestione del DNA fagico con enzima EcoRI. Fagi differenti sono stati evidenziati in uno stesso sieroinnesto. Per alcuni fagi sono state studiate altre caratteristiche quali, la sensibilità al pH, il ciclo di replicazione e, utilizzando una tecnica conduttimetrica, la curva di crescita di un ospite infettato con dosi differenti di fago.

*Parole chiave:* batteriofagi, batteri lattici, sieroinnesti naturali

**ABSTRACT** – *Identification and characterization of bacteriophages of thermophilic lactobacilli isolated from natural starters.* – The natural whey starters were found to be a potential reservoir of phages. The presence of phages of thermophilic lactobacilli was demonstrated by traditional methods in 16 of the 32 natural whey starters studied. The phages were detected in natural whey starters which did not show problems of acidifying activity. In other 27 whey starters, the presence of phage DNA of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* has been detected by the use of a PCR method. The phages of *L. helveticus* and of *L. delbrueckii* subsp. *lactis* have been characterized according to the capability to form lysis plaques on agar plate, the efficiency of replication on the host strains, the host range, and the EcoRI phage-DNA restriction profile. The presence of different phages into the same natural whey starters has been demonstrated. On few phages, other characteristics such as sensitivity to acidic pH, latent period and burst size, and the behavior of an host under the pressure of different levels of the related phage by conductance measurement technique have been studied.

*Keywords:* bacteriophages, lactic acid bacteria, artisanal whey starters

Zago *et al* (2006) *Sci Tec Latt-Cas*, 57 (5), 525-534

Attività glutammato deidrogenasica di lattobacilli mesofili isolati da formaggi artigianali italiani.

Zago M<sup>1</sup>, Rossetti L<sup>1</sup>, Maietti L<sup>1</sup>, Bonvini B<sup>1</sup>, Fornasari ME<sup>1</sup>, Cerri D<sup>2</sup>, Carminati D<sup>1</sup>, Giraffa G<sup>1\*</sup>.....535-542

\* *Corrispondenza ed estratti:* ggiraffa@ilclodi.it

<sup>1</sup> CRA-Istituto Sperimentale Lattiero Caseario. Via Lombardo 11, 26900 Lodi.

<sup>2</sup> Università di Pisa, Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti. Via delle Piagge, 11. 56124 Pisa.

**RIASSUNTO** – E' stata studiata la presenza del gene codificante l'enzima glutammato-deidrogenasi (GDH) in lattobacilli non-starter isolati da formaggi artigianali italiani prodotti con latte crudo. A tal fine, 60 ceppi di *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum* sono stati indagati mediante PCR e la relativa attività enzimatica è stata valutata mediante gel-elettroforesi nativa. Ventisette ceppi su 60 (45%) sono risultati positivi alla PCR; di questi, 25 appartenevano alla specie *L. casei* e 2 a *L. plantarum*. Lo zimogramma utilizzando L-glutammato come substrato e NADPH quale cofattore enzimatico ha consentito di individuare una singola banda di proteine GDH biologicamente attive nel 75% dei ceppi risultati positivi alla PCR. La taglia molecolare delle proteine è risultata differente fra le due specie, a conferma dell'eterogeneità di sequenza nucleotidica riscontrata dal sequenziamento di alcuni degli ampliconi ottenuti dopo PCR. Si propone un protocollo PCR per ottenere uno screening rapido di lattobacilli mesofili GDH positivi. L'ottimizzazione di PCR specifiche per *L. casei* o *L. plantarum* rappresenta un ulteriore vantaggio nella ricerca di organismi specifici da applicare come colture complementari in diverse situazioni produttive.

**Parole chiave:** formaggi artigianali, aromi nei formaggi, batteri lattici non-starter (NSLAB), glutammato-deidrogenasi

**ABSTRACT** – *Glutamate dehydrogenase activity of mesophilic lactobacilli isolated from artisan Italian cheeses.* – In this work, the presence of the gene coding for the glutamate dehydrogenase (GDH) and the biological activity of the corresponding enzyme were investigated. Sixty strains belonging to *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* and isolated from artisan, Italian raw milk cheeses were tested by PCR and GDH activity staining. Twenty-seven out of 60 strains (45%) resulted positive for the presence of the GDH gene after PCR protocols specifically designed in this study. In particular, 25 out of 28 strains of *L. casei* and 2 out of 32 strains of *L. plantarum* gave the expected PCR products. A GDH zymogram with L-glutamate as the substrate and NADPH as the cofactor showed a single band of biologically active GDH proteins in 75% of the PCR positive strains. The GDH proteins showed a different size between *L. casei* e *L. plantarum*, thus confirming the DNA sequence heterogeneity between the two species observed after sequencing of some of the PCR products. The proposed PCR-based approach can be applied as fast screening system to search for the presence of the GHD gene in mesophilic lactobacilli. The optimization of a PCR protocol for *L. casei* and *L. plantarum* could be useful to search for the presence of specific strains with GDH activity, to be used as cheese adjuncts according to different application needs.

**Keywords:** artisan cheeses, cheese aroma, non-starter lactic acid bacteria (NSLAB), glutamate-dehydrogenase