# *Relazione tecnica  sulla produzione di formaggio Nostrano Valtrompia*

A cura di **Germano Mucchetti* e Roberto Mondinelli****
***Istituto Sperimentale Lattiero Caseario di Lodi**
**** Comunità Montana Valle Trompia**

**Processo di fabbricazione, caratteristiche chimiche e microbiologiche del formaggio**

**NOSTRANO VALTROMPIA**

**Il formaggio Nostrano Valtrompia si può a buon diritto inserire nel grande contesto delle produzioni tipiche delle vallate alpine italiane, benché presenti caratteristiche qualitative particolari, tali da poterlo bene identificare e da renderlo differente dai formaggi tipologicamente analoghi e financo simili. Infatti se la base di partenza comune a quasi tutti i prodotti alpini e prealpini è quella di derivare dalla lavorazione di latte vaccino, crudo e scremato per affioramento, con prevalente salatura a secco e con peso a maturazione che ruota attorno ai 10-12 Kg., il Nostrano Valtrompia presenta alcune peculiarità che non si ritrovano nei prodotti tipologicamente vicini (o se alcune ci sono, altre distintive ne mancano) e che contribuiscono ad assegnargli caratteri qualitativi singolari, quale l'aggiunta di zafferano che da origine al caratteristico colore giallo della pasta oltre a sfumature di odore e sapore peculiari, l'oliatura costante delle forme in stagionatura che ne mantiene compattezza ed elasticità e per ultimo la durata minima della stagionatura di 12 mesi, che comporta un livello di affinamento delle caratteristiche organolettiche molto accentuato. Per meglio esplicitare le caratteristiche del Nostrano Valtrompia, rispetto a produzioni alpine che già si fregiano della certificazione DOP o che hanno in corso istanza di riconoscimento, si è elaborata la seguente tabella sinottica di confronto:**

| | Nostrano Valtrompia | Asiago | Bagoss | Bitto | Casera | Formai de Mut | Monte Veronese | Silter | Stelvio |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Latte Crudo** | **si** | **si** | **si** | **si** | **si** | **si** | **si** | **si** | |
| **Scrematura per affioramento** | **si** | **si** | **si** | **no** | **si** | **no** | **si** | **si** | |
| **Aggiunta zafferano** | **si** | **no** | **si** | **no** | **no** | **no** | **no** | | |
| **Peso Kg.** | **8 - 18** | **9 - 12** | **15** | **8 - 25** | **7 - 12** | **8 - 12** | | **8** | |
| **Salatura** | **secco** | **Secco/salam** | **secco** | **secco** | | **secco** | **Secco/salam** | **si** | |
| **Oliatura** | **si** | **no** | **si** | | **no** | **no** | **si** | **si** | |
| **Stagionatura minima mesi** | 12 | 9 | | 2 | 3 | 6 | 3 | 4 - 6 | |

## Tecnologia di caseificazione

*Origine del latte*

Il latte impiegato per produrre i formaggi è prodotto da vacche di razza bruna, la cui alimentazione è basata, nel periodo invernale-primaverile, principalmente (circa 4/5) sul fieno locale, integrato da fioccato di mais, orzo, *panello* e *miscela*, e nel periodo estivo prevalentemente sul pascolo. Le vacche sono munte a mano o meccanicamente con un intervallo di 10-12 ore.

*Affioramento del latte*

Il latte della mungitura della sera è posto ad affiorare per circa 14-15 ore in una bacinella piatta con scarico del latte dal basso, mentre il latte del mattino sosta per 3-4 ore nelle classiche bacinelle tonde con dimensioni variabili da 20 a 50 l, dalle quali la panna è separata con spannarola.

Durante una serie di prove condotte nel mese di aprile 1998, il latte della sera al momento della spillatura aveva una temperatura media di 13,5°C (min 11,5; max 15,5°C), mentre quello del mattino al momento della spannatura presentava temperature variabili tra 14,5 e 21,3°C. Quest'ultima variabilità è da imputare sia alla differente temperatura ambientale dei giorni di prova (ad es., il primo giorno nevicava), sia al tempo differente di sosta in affioramento per le singole bacinelle (NB: la mungitura dura circa 1 ora) sia alla differente capacità delle bacinelle di affioramento: nella stessa giornata si sono misurate differenze di temperatura tra bacinelle piccole e grandi pari a 5.5°C.

*Latte in caldaia*

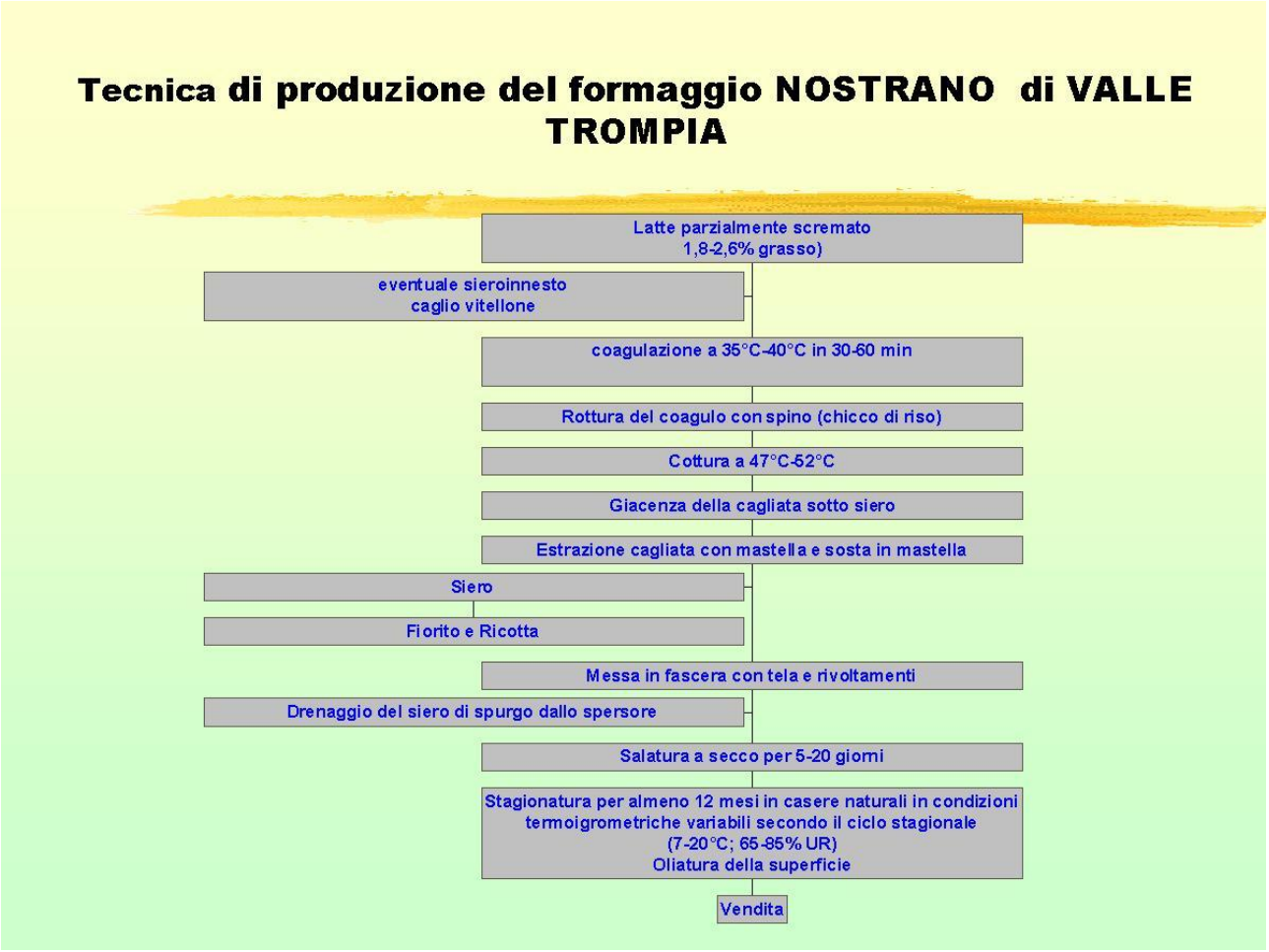
Il latte della sera è spillato in un secchio con il quale è trasportato alla caldaia. Il latte del mattino, dopo la spannatura, è trasportato direttamente dalle bacinelle alla caldaia: per ridurre i movimenti del latte ed evitare rovesciamenti la spannarola in legno è lasciata sopra il latte in bacinella. La temperatura media del latte in caldaia è risultata pari a 17°C (min 15,1-max 19°C).

*Composizione chimica del latte in caldaia e del siero di fine caseificazione*

La composizione del latte in caldaia evidenzia una buona regolarità nell'esecuzione della fase di affioramento. Il contenuto in proteine è risultato nella norma, (>3,2%) a conferma di un corretto valore di acidità titolabile del latte pari a 7°SH/100 ml.

| Campione | **grasso %** | **proteine %** | **lattosio %** | **pH** | **°SH/100 ml** |
|---|---|---|---|---|---|
| Latte | **2,56** | **3,29** | **5,05** | **6,64** | **7,5** |
| Latte | **2,51** | **3,27** | **5,07** | **6,66** | **7,4** |
| latte | **2,51** | **3,22** | **5,04** | **6,68** | **7** |

*Tecnologia di caseificazione*
Lo schema tipo della tecnologia di caseificazione del formaggio NOSTRANO VALTROMPIA è riportato di seguito:




*Evoluzione di temperatura e pH durante le prime 23 ore del processo di trasformazione del latte in formaggio*

L'evoluzione indicativa della discesa del valore di pH in seguito all'acidificazione determinata dalla crescita dei batteri lattici originari del latte crudo e/o del sieroinnesto e quella della temperatura sono di seguito riportate.

| tempo | pH | Temperatura | temperatura | Δt °C | **Formaggio Nostrano Valtrompia** |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Interna | esterna | | |
| **0,00** | 6,60 | 15,1 | | | **inizio riscaldamento latte** |
| 0,05 | | 17,8 | | | |
| 0,09 | | 21,0 | | | |
| 0,20 | | 25,0 | | | |
| 0,30 | | 32,0 | | | |
| **0,34** | | 36,5 | | | **fine riscaldamento latte** |
| 0,34 | 6,58 | 36,5 | | | addizione caglio (21ml/100kg) |
| 0,44 | | | | | Presa |
| 1,02 | | | | | I° rivoltamento con spannarola |
| 1,08 | | | | | fine I° rivoltamento |
| 1,17 | | 35,0 | | | II° rivoltamento con spannarola |
| 1,21 | | | | | fine II° rivoltamento |
| **1,24** | | | | | **inizio rottura cagliata fuori fuoco con spino** |
| 1,30 | | 34,4 | | | fine rottura con spino, inizio cottura |
| 1,36 | | 38,0 | | | |
| 1,39 | | 40,8 | | | |
| 1,41 | | 44,0 | | | |
| 1,45 | | 46,4 | | | |
| 1,50 | | 50,0 | | | fine cottura, inizio agitazione cagliata fuori fuoco |
| **2,02** | | 50,3 | | | **fine agitazione cagliata, inizio sosta sotto siero** |
| **2,39** | 6,44 | 46,7 | | | **estrazione cagliata con mastella** |
| 2,45 | 6,27 | 46,3 | 43,80 | 2,5 | cagliata in mastella |
| 3,15 | 6,21 | 47,2 | | | |
| 3,45 | 6,06 | 46,6 | | | |
| **4,15** | 5,94 | 45,2 | 40,9 | 4,3 | **cagliata in fascera**, I° rivoltamento |
| 5,15 | 5,67 | 44,3 | | | II° rivoltamento |
| 6,15 | 5,58 | 41,2 | | | |
| 7,15 | 5,55 | 39,7 | 32,90 | 6,8 | III°rivoltamento |
| 8,15 | 5,41 | 37,0 | | | |
| 9,15 | 5,40 | 35,6 | | | |
| 10,15 | 5,40 | 34,1 | | | |
| 10,45 | 5,44 | 32,7 | 24,3 | 8,4 | IV° rivoltamento |
| 11,00 | 5,44 | 31,0 | | | |
| 12,00 | 5,44 | 29,7 | | | |
| 13,00 | 5,44 | 28,6 | | | |
| 14,00 | 5,44 | 27,4 | | | |
| 15,00 | 5,45 | 26,3 | | | |
| 17,00 | 5,45 | 24,1 | | | |
| 17,30 | 5,45 | 23,4 | 15,40 | 8,0 | V° rivoltamento |
| 18,00 | 5,42 | 23,2 | | | |
| 19,00 | 5,42 | 22,3 | | | |
| 20,00 | 5,43 | 21,4 | | | |
| 21,00 | 5,44 | 20,5 | | | |
| 22,00 | 5,44 | 19,7 | | | |
| 23,00 | 5,44 | 19,0 | | | |

*Composizione chimica del siero di fine caseificazione*

I dati riportati in tabella evidenziano innanzitutto una forte perdita di grasso nel siero, che può essere recuperato quando si produce la Ricotta: tale valore di grasso nel siero spiega inoltre il ridotto tenore di grasso presente nel formaggio. Il valore di pH ancora prossimo al valore del pH iniziale del latte è testimone di una lavorazione eseguita senza o con limitata addizione di innesto, ma indica tuttavia già l'inizio di un'attività fermentativa che si ha nelle prime 3 ore di lavorazione, momento al quale avviene la separazione della cagliata dal siero.

| campione | **grasso %** | **Proteine %** | **Lattosio %** | **pH** | **°SH/100 ml** |
|---|---|---|---|---|---|
| siero | **0,97** | **1,03** | **5,2** | **6,57** | **7** |
| siero | **1** | **1,03** | **5,22** | **6,59** | **6,6** |
| siero | **1,4** | **0,94** | **5,48** | **6,53** | **5,8** |

## Composizione chimica di formaggi Nostrano Valtrompia

La composizione chimica di formaggi NOSTRANO VALTROMPIA, ripresa da dati precedenti di letteratura (Mucchetti et al 1985, Mucchetti et al 1993) è riportata in tabella

| campione | a | b | c | d | e | f | G | h | i | **media** | dev st | coef var |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| residuo secco | 65,65 | 68,57 | 64,65 | 67,93 | 69,49 | 67,06 | 68,30 | 66,03 | 70,59 | **67,59** | 1,91 | 2,83 |
| umidità | 34,35 | 31,43 | 35,35 | 32,07 | 30,51 | 32,94 | 31,70 | 33,97 | 29,41 | **32,41** | 1,91 | 5,91 |
| grasso stq | 18,86 | 25,38 | 23,13 | 22,48 | 23,76 | 27,64 | 23,03 | 19,00 | 19,80 | **22,56** | 2,95 | 13,08 |
| grasso s.s. | 28,80 | 37,02 | 35,78 | 33,10 | 34,20 | 41,23 | 33,72 | 28,77 | 28,05 | **33,41** | 4,36 | 13,05 |
| proteine stq | 39,30 | 37,10 | 36,36 | 37,50 | 38,84 | 34,43 | 38,38 | 38,63 | 40,55 | **37,90** | 1,80 | 4,74 |
| azoto non caseinico (NCN) | 1,75 | 1,74 | 2,09 | 1,72 | 1,74 | 1,63 | 1,42 | 1,81 | 1,79 | **1,74** | 0,17 | 10,03 |
| azoto non proteico (NPN) | 1,53 | 1,44 | 1,93 | 1,41 | 1,44 | 1,20 | 0,71 | 1,51 | 1,48 | **1,41** | 0,32 | 22,99 |
| NCN/ N totale | 0,28 | 0,30 | 0,37 | 0,30 | 0,28 | 0,30 | 0,24 | 0,30 | 0,28 | **0,29** | 0,03 | 11,66 |
| NPN/NCN | 0,87 | 0,83 | 0,92 | 0,82 | 0,83 | 0,74 | 0,50 | 0,83 | 0,83 | **0,80** | 0,12 | 15,17 |
| NaCl | 2,28 | 2,01 | 2,34 | 1,64 | 2,68 | 1,93 | 1,51 | 2,46 | 2,98 | **2,20** | 0,48 | 21,71 |

Il contenuto in amminoacidi liberi (mg/100g) di formaggi NOSTRANO VALTROMPIA maturi è riportato in tabella.

| AMMINO ACIDO | 14 mesi | 13 mesi | 15 mesi | 13 mesi | 26 mesi |
|---|---|---|---|---|---|
| **ASP** | 178 | 112 | 77 | 71 | 210 |
| **THR** | 37 | 50 | 54 | 77 | 96 |
| **SER** | 103 | 6 | 12 | 41 | 94 |
| **GLU** | 700 | 91 | 581 | 706 | 1721 |
| **GLN** | 9 | 0 | 13 | 22 | 47 |
| **PRO** | 218 | 174 | 81 | 180 | 868 |
| **GLY** | 78 | 26 | 20 | 37 | 178 |
| **ALA** | 87 | 59 | 63 | 97 | 194 |
| **VAL** | 182 | 193 | 150 | 253 | 579 |
| **MET** | 45 | 28 | 30 | 48 | 101 |
| **ILE** | 144 | 83 | 84 | 96 | 422 |
| **LEU** | 206 | 335 | 279 | 359 | 745 |
| **TYR** | 54 | 33 | 1111 | 33 | 101 |
| **PHE** | 102 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| **LYS** | 320 | 300 | 291 | 300 | 1134 |
| **HIS** | 45 | 37 | 26 | 14 | 96 |
| **ARG** | 0 | 2 | 2 | 2 | 10 |
| **Totale** | **2508** | **1534** | **1773** | **2335** | **6607** |

Il non utilizzo di uno starter o il suo uso sporadico in quantità ridotta giustifica la variabilità del contenuto in amminoacidi liberi per i formaggi aventi periodo di stagionatura comparabile. Il prolungamento della stagionatura oltre i 2 anni determina un notevole incremento del contenuto in amminoacidi liberi, che diventa comparabile a quello medio di un formaggio Grana Padano o Parmigiano Reggiano di 1 anno.

## *Evoluzione della composizione chimica di formaggio NOSTRANO VALTROMPIA durante i primi 9 mesi di stagionatura*

In tabella è rappresentata l'evoluzione della composizione chimica di formaggio NOSTRANO VALTROMPIA durante i primi 9 mesi di stagionatura.

| | 24 ORE | 1 MESE | 5 MESI | 7 MESI | 9 MESI |
|---|---|---|---|---|---|
| Residuo secco | 54.80 | 54.20 | 63.80 | 65.10 | 68.80 |
| ceneri | 3.30 | 4.60 | 5.10 | 5.30 | 6.0 |
| ceneri/ secco | 6.07 | 8.49 | 7.99 | 8.14 | 8.72 |
| NaCl | 0.30 | 1.33 | 1.92 | 2.01 | 2.88 |
| NaCl/secco | 0.55 | 2.45 | 3.01 | 3.09 | 4.19 |
| Proteine | 29.40 | 28.80 | 32.90 | 34.30 | 35.30 |
| proteine/ secco | 54.04 | 53.14 | 51.57 | 52.69 | 51.30 |

## *Evoluzione della frazione zuccherina durante i primi 9 mesi di stagionatura.*

La determinazione della composizione chimica macro centesimale della cagliata dopo 24 ore dalla produzione ha evidenziato innanzitutto che la fermentazione lattica è stata condotta inizialmente da una flora non in grado di utilizzare il galattosio, che è risultato presente in quantità paragonabile a quella dell'acido lattico prodotto (circa 0,8%).

| mg/100 g | **lattosio** | **galattosio** | **acido lattico** |
|---|---|---|---|
| **Cagliata 24 ore** | 176 | 766 | 1044 |
| **Formaggio 30 giorni** | 0 | 192 | 1535 |
| **5 mesi** | 0 | 0 | 1340 |
| **7 mesi** | | | 1424 |
| **9 mesi** | | | 1446 |

Coerentemente con la crescita dei lattobacilli mesofili, nel formaggio dopo un mese di stagionatura, alla fine del periodo di salatura, la fermentazione del lattosio è completata e si osservano solo residui di galattosio, distribuiti soprattutto nella zona esterna ove si ha una maggior concentrazione di sale che ha contribuito a rallentare la fermentazione.
Nel formaggio con 5-9 mesi di stagionatura il contenuto in acido lattico è risultato più basso rispetto a quello determinato dopo 1 mese di stagionatura, indicando quindi la possibilità di una sua metabolizzazione, soprattutto nella zona centrale del formaggio.

## *Evoluzione di azoto non caseinico (NCN), azoto non proteico (NPN) ed amminoacidi liberi durante i primi 9 mesi della stagionatura*

I valori crescenti degli indici maturativi (NCN/N totale, NPN/NCN) in funzione del tempo di stagionatura indicano che la maturazione è in fase di attuazione: il solo indice NCN/N totale ai 9 mesi risulta simile a quello dei formaggi maturi, mentre il rapporto NPN/NCN, che indica soprattutto il contributo alla maturazione dato dalle esopeptidasi batteriche, resta stabile fino a 7 mesi e solo in seguito si innalza e si avvicina al valore medio di 0,80 trovato nei formaggi maturi.

| | 24 ORE | 1 MESE | 5 MESI | 7 MESI | 9 MESI |
|---|---|---|---|---|---|
| Proteine % | 29.40 | 28.80 | 32.90 | 34.30 | 35.30 |
| NCN % | 1.10 | 6.16 | 6.34 | 7.05 | 10.41 |
| NPN% | 0.90 | 2.94 | 3.31 | 3.84 | 7.88 |
| NCN/N totale | 0,04 | 0,21 | 0,19 | 0,21 | 0,29 |
| NPN/N totale | 0,03 | 0,10 | 0,10 | 0,11 | 0,22 |
| NPN/NCN | 0,94 | 0,48 | 0,52 | 0,54 | 0,76 |

L'evoluzione del contenuto in amminoacidi liberi è parallelo a quello di NPN: dopo 9 mesi di stagionatura il contenuto amminoacidico è confrontabile con quello dei formaggi maturi.

| amminoacido | Cagliata 24 ore | | V.T. 1 mese | | V.T. 5 mesi | | V.T. 7 mesi | | V.T. 9 mesi | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | media | s.d. | media | s.d. | media | s.d. | media | s.d. | media | s.d. |
| ASP | 0,10 | 0,02 | 3,13 | 0,05 | 20,73 | 0,80 | 23,29 | 0,94 | 32,01 | 1,79 |
| THR | 0,16 | 0,01 | 1,87 | 0,05 | 13,24 | 0,84 | 16,74 | 0,76 | 23,59 | 1,35 |
| SER | 0,20 | 0,02 | 3,09 | 0,13 | 1,76 | 0,05 | 1,79 | 0,00 | 2,84 | 0,45 |
| GLU | 1,18 | 0,12 | 23,24 | 0,67 | 199,77 | 7,08 | 230,08 | 2,12 | 346,97 | 8,23 |
| GLN | 0,08 | 0,01 | 0,41 | 0,03 | 7,62 | 0,32 | 7,72 | 0,00 | 8,33 | 0,62 |
| PRO | 1,61 | 0,09 | 4,51 | 0,11 | 55,08 | 1,58 | 83,24 | 1,79 | 115,01 | 0,81 |
| GLY | 0,14 | 0,01 | 1,07 | 0,03 | 14,25 | 1,09 | 14,26 | 0,00 | 20,52 | 1,32 |
| ALA | 1,33 | 0,09 | 7,47 | 0,22 | 22,73 | 0,68 | 19,51 | 0,63 | 26,86 | 2,41 |
| VAL | 0,65 | 0,04 | 6,27 | 0,22 | 55,50 | 1,35 | 69,12 | 1,66 | 98,94 | 8,52 |
| MET | 0,00 | 0,00 | 2,12 | 0,21 | 16,85 | 0,29 | 24,92 | 0,63 | 37,00 | 2,40 |
| ILE | 0,14 | 0,01 | 2,65 | 0,24 | 22,88 | 0,65 | 28,17 | 0,97 | 44,76 | 3,52 |
| LEU | 0,43 | 0,01 | 14,12 | 0,31 | 113,97 | 3,10 | 115,43 | 5,57 | 164,49 | 9,28 |
| TYR | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 11,73 | 0,46 | 11,78 | 0,26 | 16,31 | 1,28 |
| PHE | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,76 | 0,14 | 49,23 | 1,87 | 69,63 | 4,09 |
| GABA | 2,57 | 0,17 | 4,06 | 0,38 | 18,42 | 0,95 | 1,55 | 0,15 | 1,44 | 0,00 |
| ORN | 0,45 | 0,03 | 11,91 | 0,54 | 86,46 | 3,61 | 106,55 | 3,74 | 132,14 | 2,80 |
| LYS | 0,76 | 0,04 | 8,96 | 0,55 | 88,16 | 5,21 | 129,73 | 2,58 | 184,48 | 14,06 |
| HIS | 2,06 | 0,12 | 6,47 | 0,79 | 36,56 | 4,93 | 23,27 | 2,19 | 24,83 | 2,19 |
| ARG | 0,67 | 0,11 | 0,86 | 0,17 | 0,00 | - | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| tot | 12,50 | 0,99 | 102,22 | 7,62 | 791,46 | 181 | 956,38 | 20,1 | 1350,14 | 59,5 |

Gli aminoacidi più rappresentati sono acido glutammico, lisina, leucina e prolina, che rappresentano mediamente nell'ordine il 25%, 15%, 13% e 10% del totale degli aminoacidi liberati dalle peptidasi microbiche, la cui presenza ed attività è stata per altro verificata nel formaggio.

| AMMINO ACIDO % sul tot | 24 ore | 1 mese | 5 mesi | 7 mesi | 9 mesi |
|---|---|---|---|---|---|
| ASP | 1,05 | 3,27 | 2,93 | 2,72 | 2,69 |
| THR | 1,68 | 2,14 | 1,70 | 2,02 | 2,02 |
| SER | 2,10 | 3,31 | 0,21 | 0,15 | 0,32 |
| GLU | 12,38 | 24,28 | 27,89 | 26,59 | 27,62 |
| GLN | 0,84 | 0,53 | 1,15 | 0,90 | 0,66 |
| PRO | 16,89 | 4,47 | 7,26 | 9,81 | 9,50 |
| GLY | 1,47 | 1,12 | 2,10 | 1,68 | 1,71 |
| ALA | 13,96 | 7,80 | 3,18 | 2,25 | 2,23 |
| VAL | 6,19 | 6,55 | 7,39 | 8,23 | 8,22 |
| MET | 0,00 | 2,21 | 2,37 | 2,93 | 3,08 |
| ILE | 1,36 | 2,77 | 3,19 | 3,28 | 3,72 |
| LEU | 3,67 | 14,75 | 15,98 | 13,28 | 13,71 |
| TYR | 0,00 | 0,00 | 1,71 | 1,27 | 1,43 |
| PHE | 0,00 | 2,19 | 0,73 | 5,80 | 5,06 |
| GABA | 25,50 | 4,18 | 2,55 | 0,14 | 0,09 |
| ORN | 3,87 | 12,27 | 5,90 | 11,17 | 9,83 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| LYS | 7,97 | 9,36 | 11,12 | 15,41 | 15,32 |
| HIS | 20,04 | 6,31 | 4,03 | 2,76 | 2,07 |
| ARG | 6,51 | 0,98 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |

Nel formaggio NOSTRANO VALTROMPIA è stata infatti ritrovata un'attività aminopeptidasica che generalmente aumenta al progredire della maturazione in quanto tali attività enzimatiche sono di solito endocellulari e quindi il loro rilascio nel formaggio è dovuto ai fenomeni di lisi cellulare.

| | 24 ore | 1 mese | 5 mesi | 7 mesi |
|---|---|---|---|---|
| aminopeptidasi** | | | | |
| Phe-Pro-β Naftile | 0,494 | 0,652 | 1,045 | 1,876 |
| Arg-β Naftile | 0,012 | 0,016 | 0,184 | 0,236 |
| Leu-β Naftile | 0,208 | 0,154 | 0,253 | 0,193 |
| Lis-β Naftile | 0,205 | 0,098 | 0,199 | 0,456 |
| Pro-β Naftile | 0,028 | 0,034 | 0,008 | 0,203 |
| Glu-β Naftile | 0,027 | 0,032 | 0,005 | 0,116 |

## *Contenuto in D-aminoacidi liberi*

La ricerca del contenuto in D-aminoacidi in formaggi maturi Nostrano Valtrompia ha evidenziato un contenuto significativo di D-aspartico, D-glutammico, D-prolina e D-alanina(mg/100g), rappresentati in tabella a fianco del contenuto totale dell'amminoacido omologo (forma D+L).

| Campione | **ASP** | **D-ASP** | **GLU** | **D-GLU** | **PRO** | **D-PRO** | **ALA** | **D-ALA** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1VT 14 mesi | 178,35 | 51,72 | 700,34 | 84,04 | 217,60 | 93,57 | 87,31 | 8,73 |
| 2VT 13 mesi | 111,80 | 11,18 | 91,22 | 10,03 | 173,85 | 33,03 | 58,80 | 10,00 |
| 3VT 15 mesi | 77,20 | 6,95 | 581,16 | 52,30 | 80,59 | 8,06 | 63,25 | 6,96 |
| 4VT 13 mesi | 70,54 | 4,23 | 706,22 | 28,25 | 179,60 | 28,74 | 97,11 | 7,77 |
| 5VT (26 mesi) | 210,30 | 35,75 | 1721,42 | 309,85 | 868,08 | 390,64 | 194,22 | 25,25 |

I rapporti % tra la forma D e la somma delle forme D+L dei singoli amminoacidi riscontrata nei formaggi maturi è riassunta in tabella

| Campione | **D/(D+L) ALA** | **D/(D+L) PRO** | **D/(D+L) ASP** | **D/(D+L) GLU** |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| 1VT 14 mesi | 10 | 43 | 29 | 12 |
| 2VT 13 mesi | 17 | 19 | 10 | 11 |
| 3VT 15 mesi | 11 | 10 | 9 | 9 |
| 4VT 13 mesi | 8 | 16 | 6 | 4 |
| 5VT (26 mesi) | 13 | 45 | 17 | 18 |

L'evoluzione dei rapporti % tra la forma D e la somma delle forme D+L dei singoli amminoacidi riscontrata nei formaggi durante i primi 9 mesi di stagionatura è riportata in tabella.

| Campione | **D/(D+L) ALA** | **D/(D+L) PRO** | **D/(D+L) ASP** | **D/(D+L) GLU** |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| 24 ORE | 47 | <0,1 | 20 | 33 |
| 1 MESE | 21 | <0,1 | 14 | 5 |
| 5 MESI | 24 | 2.5 | 11 | 4 |
| 7 MESI | 17,8 | 3.2 | 9.5 | 4.2 |
| 9 MESI | 10 | 4.5 | 6.8 | 3.8 |

Dal confronto tra il dato relativo ai formaggi maturi e quello evolutivo risulta un ritardo nella formazione di D-prolina, che per altro è noto essere un amminoacido che si forma tardivamente nel corso della stagionatura, come evidenziato per altro dal dato riguardante il formaggio maturo di 26 mesi.

## Caratteristiche microbiologiche del formaggio NOSTRANO VALTROMPIA

***Latte di caldaia***

La microflora predominante nei latti di caldaia analizzati è rappresentata dai lattococchi: gli streptococchi termofili e gli enterococchi sono presenti, ma in numero inferiore. I lattobacilli, mesofili e termofili, sono presenti in quantità diverse nei latti, ma in numero sempre inferiore a qualche decina di migliaia di cellule/ml, con l'eccezione del campione L5 cui probabilmente era stato già aggiunto il sieroinnesto naturale. La presenza di flora coliforme ed eumicetica è risultata di norma molto contenuta.

| | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Lattobacilli termofili** | 1.6E+03 | n.r. | 1.5E+02 | 1.2E+01 | 1.0E+07 | 6.5E+01 |
| **Lattobacilli mesofili** | 4.9E+03 | 5.0E+02 | 5.3E+03 | 4.4E+05 | 1.8E+05 | 4.2E+04 |
| **cocchi termofili** | 8.2E+04 | 5.4E+04 | n.r. | 5.5E+03 | 1.2E+07 | 6.2E+06 |
| **Lattococchi** | 3.6E+06 | 1.6E+05 | 3.4E+05 | 1.8E+05 | 2.3E+06 | 7.6E+06 |
| **Enterococchi** | 2.7E+04 | 5.4E+04 | 2.2E+05 | 1.9E+01 | 2.4E+02 | 4.3E+02 |
| **Coliformi** | 1.5E+02 | 3.0E+02 | 4.1E+01 | 9.0E+02 | 1.2E+04 | 0.8E+01 |
| **Lieviti** | 2.6E+03 | 9.1E+02 | 6.7E+03 | <1.0E+02 | 2.2E+04 | 5.3E+02 |
| **Muffe** | 5.0E+01 | 1.0E+02 | 6.3E+02 | 9.0E+01 | 1.5E+03 | 4.5E+01 |

*Microflora del latte di caldaia. Valori espressi come u.f.c./g.*

***Sieri di fine caseificazione***

Le caratteristiche microbiologiche dei sieri dolci di fine caseificazione confermano l'eterogeneità della popolazione microbica verificata nel latte. Si evidenzia tuttavia che, durante le circa due ore di lavorazione del latte in caldaia, i cocchi lattici termofili e gli enterococchi hanno iniziato la loro crescita, essendo la loro presenza maggiore di circa cinque-dieci volte rispetto all'analoga microflora ricercata nel latte. I lattococchi invece diminuiscono e risultano inferiori a $10^{-4}$ufc/ml, probabilmente in seguito ad un effetto selettivo svolto dalla cottura della cagliata. I lattobacilli invece non mostano crescita durante questa fase della caseificazione, così come coliformi, lieviti e muffe.

| | **S1** | **S2** | **S3** |
|---|---|---|---|
| **lattobacilli termofili** | n.r. | 5.0E+03 | 1.0E+03 |
| **lattobacilli mesofili** | n.r. | n.r. | 2.5E+02 |
| **cocchi termofili** | 2.0E+06 | 4.6E+05 | 2.9E+05 |
| **lattococchi** | <1E+04 | <1E+04 | <1E+04 |
| **enterococchi** | 5.0E+05 | 1.8E+05 | 1.2E+06 |
| **coliformi** | 5.0E+01 | 1.0E+02 | 2.3E+01 |
| **lieviti** | 7.5E+03 | 5.0E+02 | 2.2E+03 |
| **muffe** | <1E+03 | <1E+03 | 5.0E+01 |

*Microflora dei sieri di fine caseificazione. Valori espressi come u.f.c./g*

***Sieroinnesto***

La composizione microbiologica di un sieroinnesto naturale utilizzato per la produzione di formaggio NOSTRANO VALTROMPIA è di seguito riportata

| | |
|---|---|
| **lattobacilli termofili** | 3.9E+08 |
| **lattobacilli mesofili** | 5.4E+05 |
| **cocchi termofili** | 3.5E+07 |
| **lattococchi** | <1.0E+04 |
| **enterococchi** | 2.2E+03 |
| **coliformi** | 5.8E+01 |
| **lieviti** | 1.6E+06 |
| **muffe** | |

*Microflora di sieroinnesto naturale. Valori espressi come u.f.c./g*

Si evidenzia una significativa presenza di flora lattica termofila, particolarmente lattobacilli, fra i quali è stato riconosciuta la presenza di *L.helveticus*.

Va osservato, tuttavia, rispetto a quanto precedentemente scritto in merito ai possibili rapporti tra presenza di D-prolina nel formaggio ed uso di sieroinnesti caratterizzati dalla presenza di lattobacilli termofili che le dosi di uso del sieroinnesto nella produzione del NOSTRANO

VALTROMPIA sono in ogni caso molto inferiori a quelle comunemente in uso nei formaggi tipo Grana o Emmental. Importante è risultata la presenza di lieviti.

***Cagliata all'estrazione***

Le caratteristiche microbiologiche della cagliata appena estratta dopo cottura sono riportate in tabella. Tali cagliate sono state ottenute dai latti L4, L5 ed L6 rispettivamente

| | C4 | C5 | C6 |
|---|---|---|---|
| **lattobacilli termofili** | 2.1E+04 | 2.4E+07 | 1.1E+03 |
| **lattobacilli mesofili** | 1.2E+06 | 5.0E+05 | 2.5E+06 |
| **cocchi termofili** | 2.9E+06 | 1.3E+08 | 2.1E+08 |
| **Lattococchi** | < 1E+05 | < 1E+05 | <1E+04 |
| **Enterococchi** | 7.7E+04 | 6.6E+04 | 1.4E+04 |
| **Coliformi** | 5.6E+03 | 1.6E+04 | 9.6E+03 |
| **Lieviti** | 1.3E+03 | 1.3E+05 | 2.6E+04 |
| **Muffe** | 1.8E+02 | 3.7E+03 | 5.0E+01 |
| **Pediococchi** | 1.8E+06 | 6.0E+04 | 3.3E+05 |

*Microflora di cagliata appena estratta dopo cottura. Valori espressi come u.f.c./g*

***Cagliata dopo 24 ore dalla estrazione.***

Le caratteristiche microbiologiche della cagliata dopo 24 ore dall'estrazione dalla caldaia evidenziano la predominanza della flora lattica coccica termofila, come d'altra parte prevedibile in funzione del ciclo termico di raffreddamento della cagliata durante la fase d'acidificazione. Rilevante è tuttavia già in questa fase la crescita dei lattobacilli mesofili e termofili. La corretta acidificazione della cagliata ha, di fatto, impedito la crescita della già scarsa microflora coliforme presente nel latte, evidenziata ancora tuttavia nella cagliata appena estratta .

Non si evidenzia più, già dopo 24 ore di stufatura, una presenza significativa di lattococchi: le colonie capaci di crescere in M17 a 25°C, ascrivibili teoricamente al gruppo dei cocchi lattici mesofili, non sono infatti risultate essere lattococchi nella grande maggioranza dei casi una volta sottoposte a caratterizzazione fenotipica e molecolare. E' stato quindi confermato il dato di assenza già riscontrato nel siero dolce di fine caseificazione, e quindi si suffraga l'ipotesi di una selezione operata dalla cottura della cagliata a 50°C e dalla sosta della cagliata sotto siero a quella temperatura per un periodo di circa 30-50 minuti. Il numero degli enterococchi aumenta invece di pari passo con i cocchi lattici termofili . Nel formaggio ad un mese si ha un aumento delle cariche di quasi tutti i generi di microrganismi; in particolare la microflora lattica coccica termofila continua ad essere la dominante con valori che sono compresi tra $5 \cdot 10^8$ e $1.9 \cdot 10^9$. Dopo 5 mesi di stagionatura tutta la microflora lattica appare in significativa diminuzione, in particolare i lattobacilli termofili, che risultano non rilevabili nelle condizioni di analisi utilizzate (< $10^5$ufc/g. La flora eumicetica appare sostanzialmente stabile. I Pediococchi risultano presenti nell'ordine di $10^5$ ufc/g: tale presenza è simile a quanto riscontrato normalmente in formaggio Grana. Nel formaggio a 7 mesi la diminuzione dei lattobacilli mesofili continua. I lattobacilli termofili, precedentemente non evidenziati nel campione di 5 mesi, risultano ancora presenti in numero di circa 5x $10^4$ ufc/g. Gli Enterococchi subiscono una diminuzione meno marcata rispetto ai lattobacilli mesofili, e la loro quantità è ancora elevata, attorno a $10^6$ ufc/g, mentre la presenza dei Pediococchi resta sostanzialmente invariata. Nel formaggio a nove mesi la microflora lattica nel suo complesso è diminuita ulteriormente rispetto alla campionatura precedente svolta a 7 mesi. La microflora dominante è rappresentata da Enterococchi e Pediococchi che sono presenti ancora a valori elevati:

almeno di un ordine di grandezza in più rispetto alla microflora lattica. Si può quindi affermare che col procedere della maturazione la carica microbica diminuisce progressivamente anche di tre, quattro ordini di grandezza in meno.
L'evoluzione quali-quantitativa della microflora durante i primi 9 mesi della maturazione del formaggio NOSTRANO VALTROMPIA è riassunta in tabella.

| | 24 ore | 1 mese | 5 mesi | 7 mesi | 9 mesi |
|---|---|---|---|---|---|
| **lattobacilli termofili** | 3.3E+05 | 3.4E+07 | <1E+03 | 5.0E+04 | 3.1E+03 |
| **lattobacilli mesofili** | 1.0E+06 | 3.3E+08 | 7.5E+06 | 3.1E+06 | 6.1E+04 |
| **cocchi termofili** | 1.9E+08 | 1.1E+09 | <1E+03 | | |
| **lattococchi** | <1E+03 | | | | |
| **enterococchi** | 7.1E+07 | 1.6E+08 | 1.1E+07 | 2.8E+06 | 1.3E+06 |
| **coliformi** | <1E+03 | <1E+02 | <1E+01 | | |
| **lieviti** | 1.2E+04 | 1.0E+05 | 5.1E+04 | 1.0E+03 | 6.5E+02 |
| **muffe** | 5.0E+02 | 4.3E+04 | 2.8E+04 | 3.0E+05 | nd |

*Evoluzione della microflora durante la maturazione del formagggio. Valori espressi come u.f.c./g.*

La caratterizzazione della microflora isolata dal formaggio NOSTRANO VALTROMPIA ed il completamento delle ricerche inerenti l'individuazione di possibili marker di qualità sono di seguito riportate.

# CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA E MOLECOLARE DI BATTERI LATTICI AUTOCTONI SELEZIONATI DA LATTE, SIERO, CAGLIATE E FORMAGGIO NOSTRANO VALTROMPIA.

*Isolamento dei ceppi.*

Durante le differenti fasi di produzione del Formaggio NOSTRANO VALTROMPIA si è proceduto a un campionamento di latte, siero, cagliata cotta, cagliata di 24 h e formaggi a 1, 5 7 e 9 mesi di stagionatura dai quali sono stati isolati 762 ceppi batterici. Per l'isolamento dei ceppi i campioni sono stati diluiti con soluzione di Ringer e quindi un'aliquota di tale diluizione è stata seminata su piastre di terreni di coltura, MRS e M 17, che permettono di rilevare i principali batteri lattici, ed incubate a due differenti temperature, 25°C e 42°C considerate elettive per una prima selezione dei microrganismi mesofili e termofili.

*Identificazione fenotipica degli isolati.*

I 762 ceppi, isolati durante le fasi precedenti ed attuale della ricerca, sono stati sottoposti ad indagini per determinare la specie di appartenenza e analizzare l'eventuale presenza di caratteristiche fenotipiche particolari. Gli isolati sono stati analizzati al microscopio ottico per verificare la loro morfologia, e, successivamente, sono stati incubati a differenti temperature per determinare l'intervallo temperatura di crescita e quindi confermare o meno l'attribuzione di microrganismi mesofili o termofili in prima approssimazione loro attribuita sulla base della temperatura di incubazione della piastra da cui originariamente erano stati isolati: in particolare i lattobacilli sono stati quindi incubati in MRS a 15°C , 37°C e 45°C e i cocchi in terreno M 17 a 10°C, 37°C e 45°C. I ceppi capaci di crescere a tutte le temperature previste sono considerati termofili, mentre quelli incapaci di crescere a 45°C sono considerati mesofili.

I bacilli sono, poi, stati incubati in presenza della campanella di Durham per valutare la loro capacità di produzione di anidride carbonica, mentre i cocchi sono stati strisciati su terreno KAA (Kanamicina esculina-azide agar), terreno selettivo per la specie *Enterococcus*, su terreno MRS addizionato di calcio citrato, per verificare la loro capacità di fermentare il citrato ed infine incubati in brodo M 17 contenente sodio cloruro (6.5% concentrazione finale) per valutare la loro resistenza al sale.

*Identificazione genotipica degli ceppi.*

Per ottenere una identificazione tassonomica della specie di appartenenza dei vari ceppi in studio si è utilizzata la tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) con primers specie-specifici per i differenti gruppi microbici: *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris*, *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus.* La PCR (reazione a catena della polimerasi) è una tecnica di biologia molecolare che permette di ottenere elevate quantità di una ben determinata e specifica zona del DNA di qualsiasi organismo attraverso il susseguirsi di tre fasi distinte: un primo passaggio a temperatura di 94°C, nel quale la doppia elica del DNA viene scissa nei suoi due filamenti costitutivi, cosicché durante la fase successiva piccoli frammenti di DNA sintetico (primers) aggiunti alla reazione possono trovare corrispondenti regioni bersaglio a cui agganciarsi e da li partire a costruire un nuovo filamento di DNA (terza fase). Questi passaggi sono altamente specifici e solo quando i primers trovano delle sequenze corrette si agganciano e permettono l'amplificazione di quella specifica zona.

Con la tecnica PCR sono quindi stati classificati 144dei 762 ceppi isolati, ovvero un ceppo ogni 5 isolati.

*Studio della biodiversità genotipica con tecnica RAPD.*
Dopo una preliminare analisi dei risultati delle identificazioni sia fenotipiche che genotipiche 150 ceppi sono stati scelti allo scopo di valutare il grado di variabilità ed eterogeneità genotipica della microflora isolata da Formaggio nostrano della Valle Trompia.
A tale scopo si è proceduto all'estrazione del loro DNA genomico utilizzando una resina a scambio ionico che permette il rilascio in soluzione acquosa del DNA stesso. Il DNA così estratto è stato successivamente sottoposto ad amplificazione RAPD con il primer M 13, utilizzato come marcatore molecolare. I risultati delle amplificazioni sono stati visualizzati per elettroforesi su gel di agarosio ottenendo per ciascun ceppo un profilo caratteristico che si può considerare come un'impronta digitale. Ciascuna analisi è stata eseguita in doppio. Per valutare il grado di eterogeneità genetica della microflora di questo particolare ecosistema tutti i profili di amplificazione RAPD sono stati confrontati utilizzando un programma informatico di analisi dell'immagine (Gel Compar) che valuta, tramite degli algoritmi matematici, il grado di similarità dei profili studiati e, quindi, permette di valutare la presenza e la numerosità di biotipi microbici nella popolazione in esame.

## Risultati

Isolamento dei ceppi.

Lo schema di isolamento dei ceppi, riportato in tab. 1, ha portato ad un totale di 762 ceppi.

| | MRS 25°C | MRS 42°C | M 17 25°C | M 17 42°C |
|---|---|---|---|---|
| | | | | |
| latte (1^ prova) | 8 | 0 | 20 | 9 |
| latte (2^ prova) | 69 | 22 | 58 | 26 |
| siero dolce | 0 | 5 | 27 | 16 |
| sieroinnesto | 2 | 21 | 7 | 6 |
| cagliata fine cottura (43°C) | 9 | 0 | 10 | 10 |
| cagliata fine cottura | 58 | 18 | 31 | 16 |
| cagliata 24 ore | 27 | 19 | 30 | 26 |
| forma 1 mese maturazione | 15 | 15 | 15 | 15 |
| forma 5 mesi maturazione | 16 | 4 | 13 | 15 |
| forma 7 mesi maturazione | 15 | 10 | 15 | 15 |
| forma 9 mesi maturazione | 10 | 8 | 14 | 10 |
| Totale | **229** | **122** | **240** | **164** |

*Tab. 1 Piano di campionamento dei ceppi*

Tutti i ceppi isolati sono stati osservati al microscopio ottico per una conferma della loro morfologia. I risultati, riportati in tab. 2, indicano che soprattutto per i ceppi isolati da MRS, terreno elettivo per i lattobacilli, la conferma della morfologia bastoncellare non è risultata sempre univoca. Si è osservato inoltre che, soprattutto per la microflora isolata dal latte e dalle cagliate, sono stati ritrovati dei ceppi con morfologia di difficile identificazione in condizioni di crescita considerate

"normali". Per una loro identificazione morfologica e tassonomica sono state quindi necessarie ulteriori prove di crescita con terreni arricchiti di estratto di lievito che ne hanno favorito lo sviluppo in modo tale da facilitare un loro riconoscimento, nonché è stato necessario portare a completamento tutte le indagini previste dal protocollo di ricerca.

| | Lattobacilli da MRS 25°C | lattobacilli da MRS 42°C | cocchi da M17 25°C | cocchi da M17 42°C | dubbi |
|---|---|---|---|---|---|
| Latte (1^ prova) | 8 | 0 | 20 | 9 | 0 |
| Latte (2^ prova) | 33 | 15 | 12 | 57 | 58 |
| Siero dolce | 0 | 5 | 0 | 43 | 0 |
| Sieroinnesto | 0 | 18 | 5 | 9 | 5 |
| Cagliata fine cottura (43°C) | 9 | 0 | 10 | 11 | 11 |
| Cagliata fine cottura | 17 | 13 | 22 | 15 | 50 |
| Cagliata 24 ore | 27 | 19 | 0 | 56 | 0 |
| Forma 1 mese maturazione | 15 | 15 | 0 | 30 | 0 |
| Forma 5 mesi maturazione | 16 | 4 | 3 | 25 | 0 |
| Forma 7 mesi maturazione | 15 | 10 | 0 | 30 | 0 |
| Forma 9 mesi maturazione | 18 | 0 | 0 | 24 | 0 |
| Totale | **158** | **99** | **72** | **309** | **124** |

*Tab. 2 Risultati dell'osservazione degli isolati al microscopio ottico.*

Identificazione fenotipica degli isolati.

Sulla base dell'osservazione microscopica e della verifica della capacità di crescere in terreno KAA per enterococchi, la popolazione microbica isolata da formaggio NOSTRANO VALTROMPIA può in prima approssimazione essere suddivisa nei seguenti gruppi microbici rappresentati in Fig. 1: bacilli (257 ceppi), cocchi (295 ceppi) ed enterococchi (210 ceppi).

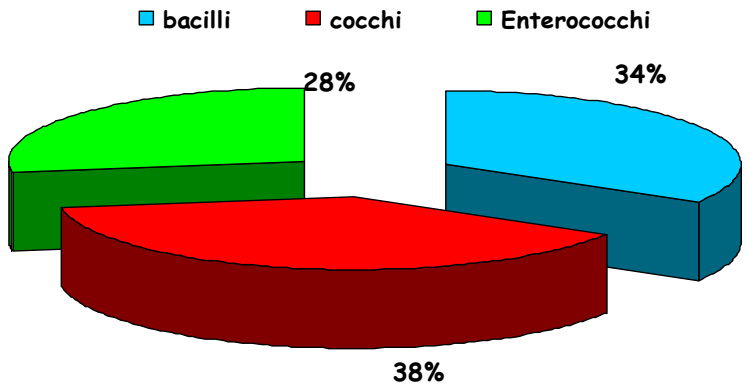
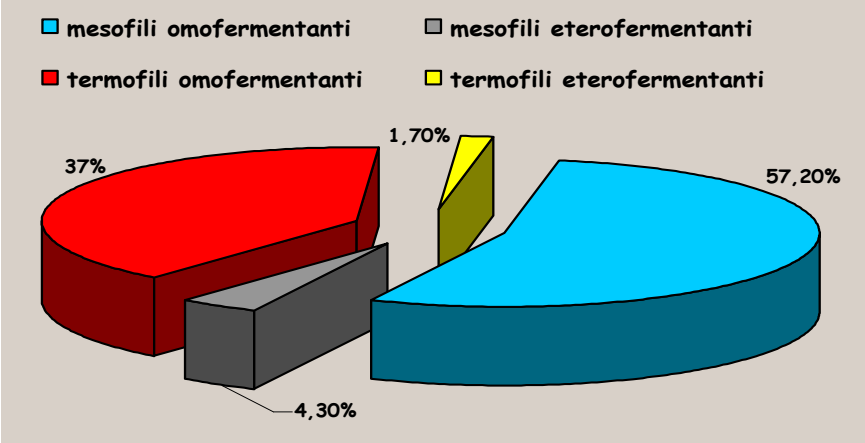



**Fig. 1 Ripartizione dei ceppi isolati da Formaggio NOSTRANO VALTROMPIA**

Considerando che la temperatura di incubazione del terreno colturale (MRS, M17) dal quale i ceppi sono stati originariamente isolati, non fosse sufficientemente discriminante per assegnare ai ceppi la qualifica di termofili o mesofili, si è proceduto a prove di crescita a temperature differenziate. I batteri mesofili (cocchi e bacilli), incapaci di crescere a temperatura di 45°C, sono risultati 346, mentre i batteri termofili sono risultati essere 416, comprensivi dei 210 enterococchi. In alcuni casi alcuni lattobacilli hanno dimostrano una certa termofilia, sviluppando anche a temperatura attorno ai 50°C. Relativamente infine ai soli lattobacilli si è verificata la loro capacità eterofermentativa, ovvero di produrre gas: come riportato in fig. 2, si osserva che la maggioranza dei 257 ceppi è omofermentante (94%) suddivisa in modo comparabile tra forme mesofile e termofile, mentre solo una minima aliquota (6%) è eterofermentante.

**Fig. 2 Risultati delle attività fermentative dei lattobacilli.**




La sequenza degli isolamenti dei lattobacilli omo ed eterofermentanti mesofili e termofili è di seguito riportata in tab. 2 bis

| | **Bacilli mesofili** | | | **Bacilli termofili** | |
|---|---|---|---|---|---|
| | omoferm. | eteroferm. | | omoferm. | eteroferm. |
| latte (1^ prova) | 8 | 0 | | 0 | 0 |
| latte (2^ prova) | 29 | 4 | | 13 | 2 |
| siero dolce | 0 | 0 | | 5 | 0 |
| sieroinnesto | 0 | 0 | | 18 | 0 |
| cagliata fine cottura (43°C) | 7 | 2 | | 0 | 0 |
| cagliata fine cottura | 12 | 5 | | 11 | 2 |
| cagliata 24 ore | 27 | 0 | | 19 | 0 |
| forma 1 mese matur. | 15 | 0 | | 15 | 0 |
| forma 5 mesi matur. | 16 | 0 | | 4 | 0 |
| forma 7 mesi matur. | 15 | 0 | | 10 | 0 |
| forma 9 mesi matur. | 18 | 0 | | 0 | 0 |
| | **147** | **11** | | **95** | **4** |

*Tab 2 bis. Isolamento di lattobacilli omo ed eterofermentanti mesofili e termofili*

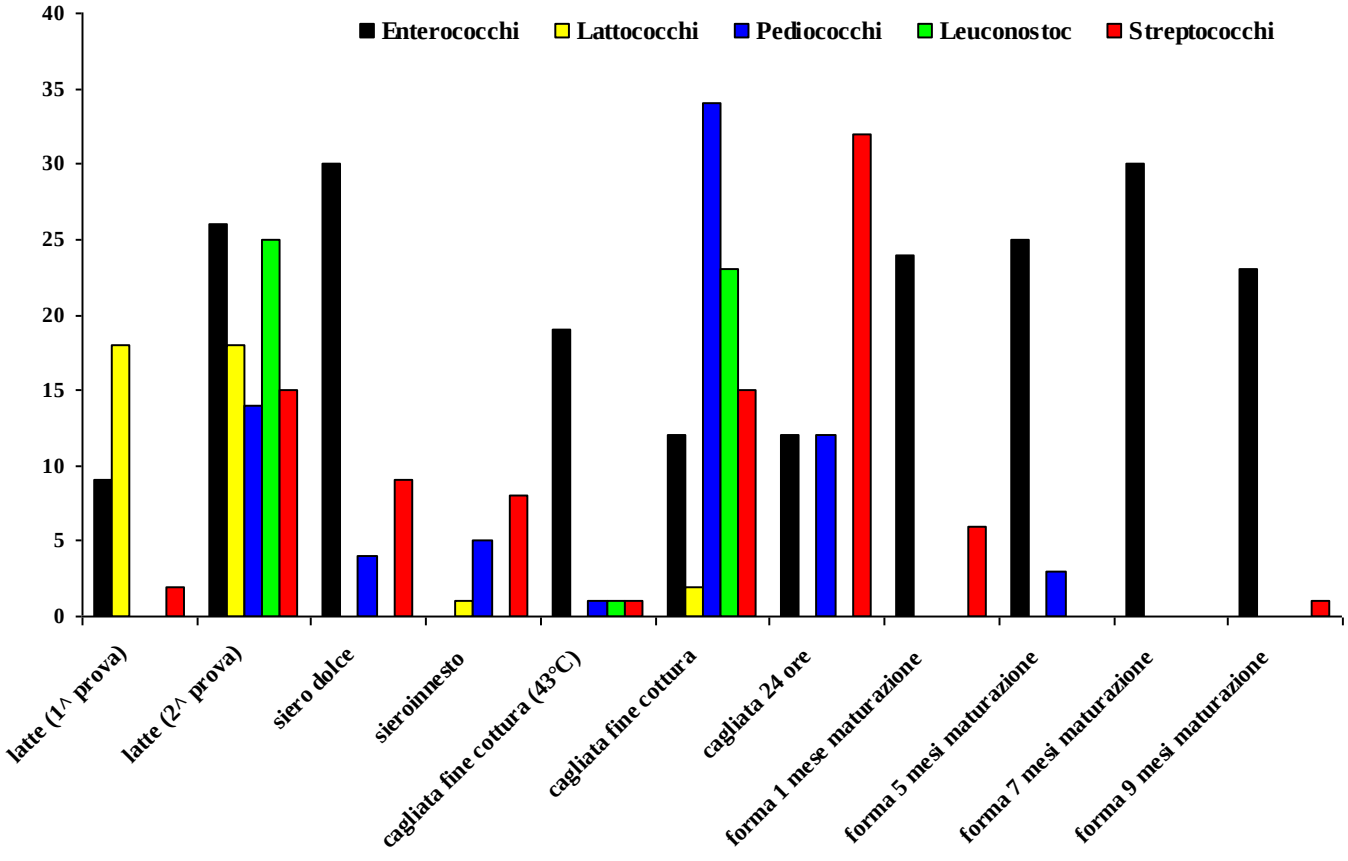
La microflora coccica, non *Enterococcus* spp., presenta a sua volta una certa diversificazione al suo interno. Sono stati infatti individuati 39 lattococchi (cocchi che sviluppano solo a 10 e 25°C), 89 streptococchi (cocchi che sviluppano a 42 e 45°C), 49 cocchi che fermentano il calcio citrato, presumibilmente ascrivibili al genere *Leuconostoc*, e 73 cocchi che resistono a concentrazioni di sale pari al 6.5% e quindi ascritti al genere *Pediococcus*. Fra la microflora coccica inoltre sono stati osservati alcuni ceppi che dimostrano particolari comportamenti di sviluppo che non rientrano nei

criteri di classificazione e di identificazione "canonici": 6 streptococchi termofili riescono infatti a sviluppare anche in terreno con 6.5% NaCl, mentre 12 cocchi mesofili crescono in presenza di 6.5% NaCl e metabolizzano il citrato.
In tab. 3 e fig. 3 è riportato l'andamento della microflora coccica nelle varie fasi di trasformazione del latte e di stagionatura del formaggio.

| | **Enterococchi** | **Lattococchi** | **Pediococchi** | **Leuconostoc** | **Streptococchi** |
|---|---|---|---|---|---|
| latte (1^ prova) | 9 | 18 | 0 | 0 | 2 |
| latte (2^ prova) | 26 | 18 | 14 | 25 | 15 |
| siero dolce | 30 | 0 | 4 | 0 | 9 |
| Sieroinnesto | 0 | 1 | 5 | 0 | 8 |
| cagliata fine cottura (43°C) | 19 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| cagliata fine cottura | 12 | 2 | 34 | 23 | 15 |
| cagliata 24 ore | 12 | 0 | 12 | - | 32 |
| forma 1 mese maturazione | 24 | 0 | 0 | - | 6 |
| forma 5 mesi maturazione | 25 | 0 | 3 | - | 0 |
| forma 7 mesi maturazione | 30 | 0 | 0 | - | 0 |
| forma 9 mesi maturazione | 23 | 0 | 0 | - | 0 |
| | | | | | |
| Microflora coccica | **210** | **39** | **73** | **49** | **88** |

*Tab . 3 Andamento della microflora coccica nelle varie fasi produttive del formaggio*

**Fig. 3 Andamento della microflora coccica nelle varie fasi produttive del formaggio**



*Caratterizzazione genotipica dei ceppi.*

Sulla base di questa prima caratterizzazione fenotipica dei ceppi, si è proceduto a determinare la specie di appartenenza di 144 ceppi, scelti tra i vari gruppi omogenei e quindi rappresentativi dell'intero gruppo degli isolati, ad esclusione dei bacilli eterofermentanti (15 ceppi sul totale degli isolati) e degli enterococchi per i quali l'appartenenza alla specie è stata confermata dalla loro capacità di crescita in terreno KAA. In tab. 4 è rappresentato il piano di campionamento dei ceppi per l'identificazione tassonomica mediante caratterizzazione genotipica. Considerando inoltre che dal punto di vista numerico le popolazioni microbiche predominanti nel formaggio da 1 a 9 mesi erano risultate enterococchi e lattobacilli mesofili, nella caratterizzazione dei ceppi isolati da formaggio si è privilegiato lo studio della flora bacillare mesofila, la cui biodiversità è ampiamente riconosciuta in letteratura, a scapito di quella latttobacillare termofila, che pur presente ed isolata nel corso della stagionatura, era tuttavia numericamente inferiore.

| | Lattobacilli | Cocchi | Morfologia incerta |
|---|---|---|---|
| latte (1^ prova) | 3 | 7 | 0 |
| latte (2^ prova) | 14 | 5 | 19 |
| siero dolce | 3 | 4 | 0 |
| Sieroinnesto | 6 | 4 | 1 |
| cagliata fine cottura (43°C) | 1 | 1 | 4 |
| cagliata fine cottura | 4 | 7 | 16 |
| cagliata 24 ore | 7 | 7 | 0 |
| forma 1 mese maturazione | 4 | 4 | 0 |
| forma 5 mesi maturazione | 5 | 0 | 0 |
| forma 7 mesi maturazione | 7 | 0 | 0 |
| forma 9 mesi maturazione | 11 | 0 | 0 |
| Totale | **65** | **39** | **40** |

*Tab. 4 Suddivisione dei ceppi per caratterizzazione genotipica*

*Suddivisione dell'appartenenza alla specie dei ceppi sulla base della loro morfologia*

*Flora coccica*

In tabella 5 è riportata la suddivisione dei ceppi sulla base della specie di appartenenza. 26 ceppi mesofili non sono stati riconosciuti dai primers specie-specifici utilizzati e restano quindi di dubbia classificazione, anche se attribuibili probabilmente al gruppo dei cocchi mesofili. Si evidenzia che i cocchi lattici mesofili non si ritrovano più già nella cagliata di 24 ore, con l'eccezione forse di alcune forme anomale non meglio identificate. Anche *S.thermophilus* si ritrova solo nel formaggio fino ad 1 mese di stagionatura.

| COCCHI | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Lc.lactis* | *S.thermophilus* | *Leuconostoc* | *Pediococcus* | **non ID** | **totale** |
| latte (1^ prova) | 6 | 0 | 0 | 0 | 1 | 7 |
| latte (2^ prova) | 2 | 1 | 11 | 0 | 10 | 24 |
| siero dolce | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 4 |
| Sieroinnesto | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | 5 |
| cagliata fine cottura (43°C) | 0 | 0 | 0 | 1 | 4 | 5 |
| cagliata fine cottura | 0 | 3 | 13 | 0 | 7 | 23 |
| cagliata 24 ore | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| forma 1 mese maturazione | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 4 |
| forma 5,7 e 9 mesi maturazione | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **Totale** | **8** | **20** | **24** | **1** | 26 | 79 |

*Tab. 5. PCR cocchi lattici*

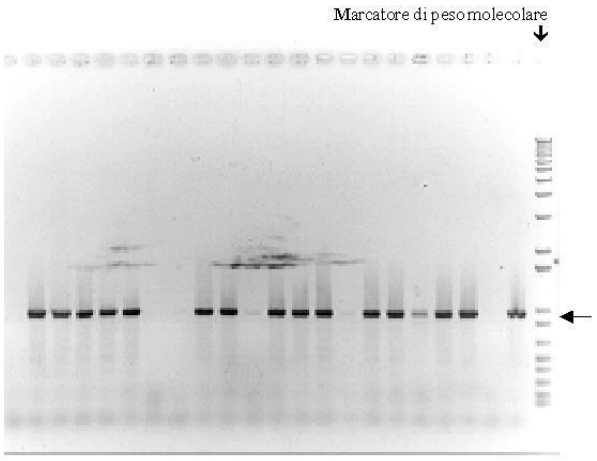



**Fig. 8 Amplificazione specie-specifica per la specie *S. thermophilus***
**(la freccia evidenzia la banda caratteristica di specie)**

*Flora lattobacillare*

In tabella 6 è riportata la suddivisione dei ceppi sulla base della specie di appartenenza. I lattobacilli mesofili sono stati identificati durante tutto il corso della stagionatura del formaggio, ove diventano microflora dominante. Nel latte e nella cagliata le specie di lattobacilli mesofili ritrovate sono tuttavia meno diversificate che non nel formaggio, anche se a tale proposito è da considerare il forte gruppo (9 ceppi) di ceppi non identificati presente nella serie di latti campionati nella seconda fase dello studio. I lattobacilli termofili, invece, pur presenti fino al 7 mese di stagionatura (Tab.2), sono stati studiati solo fino al primo mese di stagionatura privilegiando per la caratterizzazione quelli provenienti dal latte crudo e dal sieroinnesto, ove è stata riscontrata presenza di *L. helveticus*.

| BACILLI | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | L.helveticus | L.lactis delbrueckii | L.plantarum | L.paracasei | L.rhamnosus | Gruppo casei | Non ID | totale |
| latte (1^ prova) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| latte (2^ prova) | 3 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 9 | 14 |
| siero dolce | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 3 |
| sieroinnesto | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| cagliata fine cottura (43°C) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| cagliata fine cottura | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 4 |
| cagliata 24 ore | 0 | 2 | 0 | 3 | 0 | 1 | 1 | 7 |
| forma 1 mese maturazione | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 4 |
| forma 5 mesi maturazione | 0 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| forma 7 mesi maturazione | 0 | 0 | 2 | 2 | 3 | 0 | 0 | 7 |
| forma 9 mesi maturazione | 0 | 0 | 5 | 0 | 2 | 1 | 3 | 11 |
| Totale | 10 | 5 | 8 | 14 | 5 | 5 | 18 | 65 |

*Tab.6 PCR bacilli lattici*

18 ceppi di bacilli mesofili infine non hanno dato amplificazione con la serie di primers specie-specifici utilizzati in questo studio (vedi Materiali e Metodi): confrontando tuttavia le loro caratteristiche fenotipiche con i risultati di altre tecniche tassonomiche si potrebbe supporre che appartengano alla specie *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus brevis*. Ulteriori approfondimenti di indagine sono necessari prima di assegnare loro un'appartenenza in modo definitivo, anche se dati di letteratura concernenti la presenza di tali specie in formaggi prodotti senza l'impiego di starters, permetterebbero di supportare tali ipotesi.

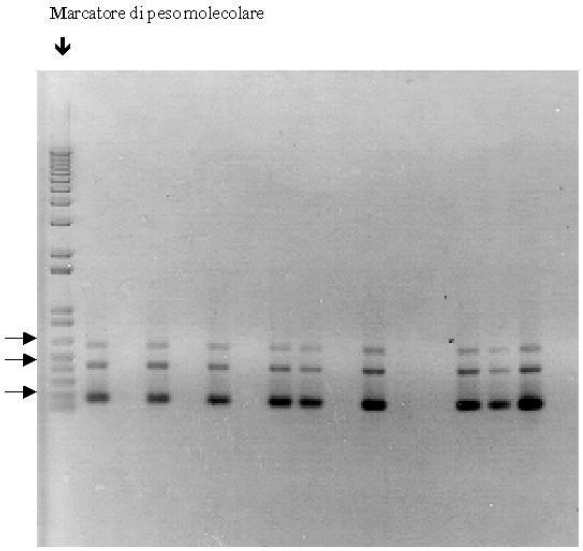



**Fig. 9 Amplificazione specie-specifica per la specie *L. helveticus***
**(le frecce evidenziano le bande caratteristiche della specie)**

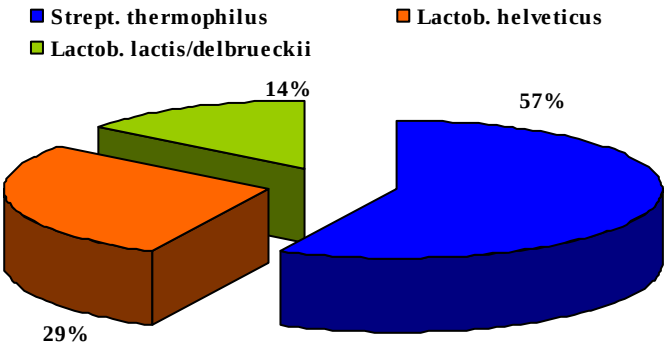
*Suddivisione dell'appartenenza alla specie dei ceppi sulla base " termofili-mesofili"*

*Flora termofila*

L'identificazione genotipica della microflora termofila è riportata in fig. 3: la componente coccica risulta essere composta dalla specie *Streptococcus thermophilus*, in cui si ritrovano anche quegli streptococchi resistenti a concentrazione di sale pari al 6.5% evidenziati durante la fase di caratterizzazione fenotipica.

La frazione bacillare si divide invece, principalmente, tra tre differenti specie: *L. helveticus, L. lactis* e *L. delbrueckii*.

**Fig. 3 Caratterizzazione della microflora termofila**

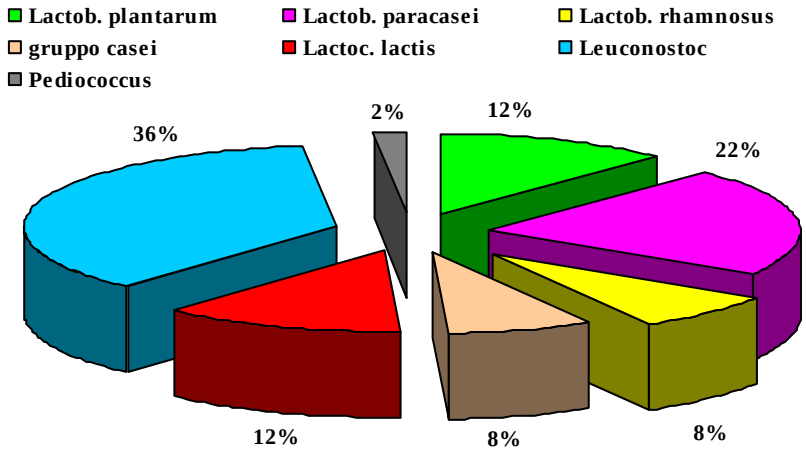



*Flora mesofila*

La microflora mesofila risulta più variegata grazie alla presenza di un numero maggiore di specie batteriche, come mostrato in fig. 4.

La specie mesofila maggiormente rappresentata tra i bacilli è *L. paracasei*, seguita da *L. rhamnosus* e *L. plantarum*, mentre tra i cocchi si riscontra una prevalenza di *Leuconostoc* spp., e di *Lactoc. Lactis*, isolati per altro solo dal latte e dalla cagliata di fine cottura.

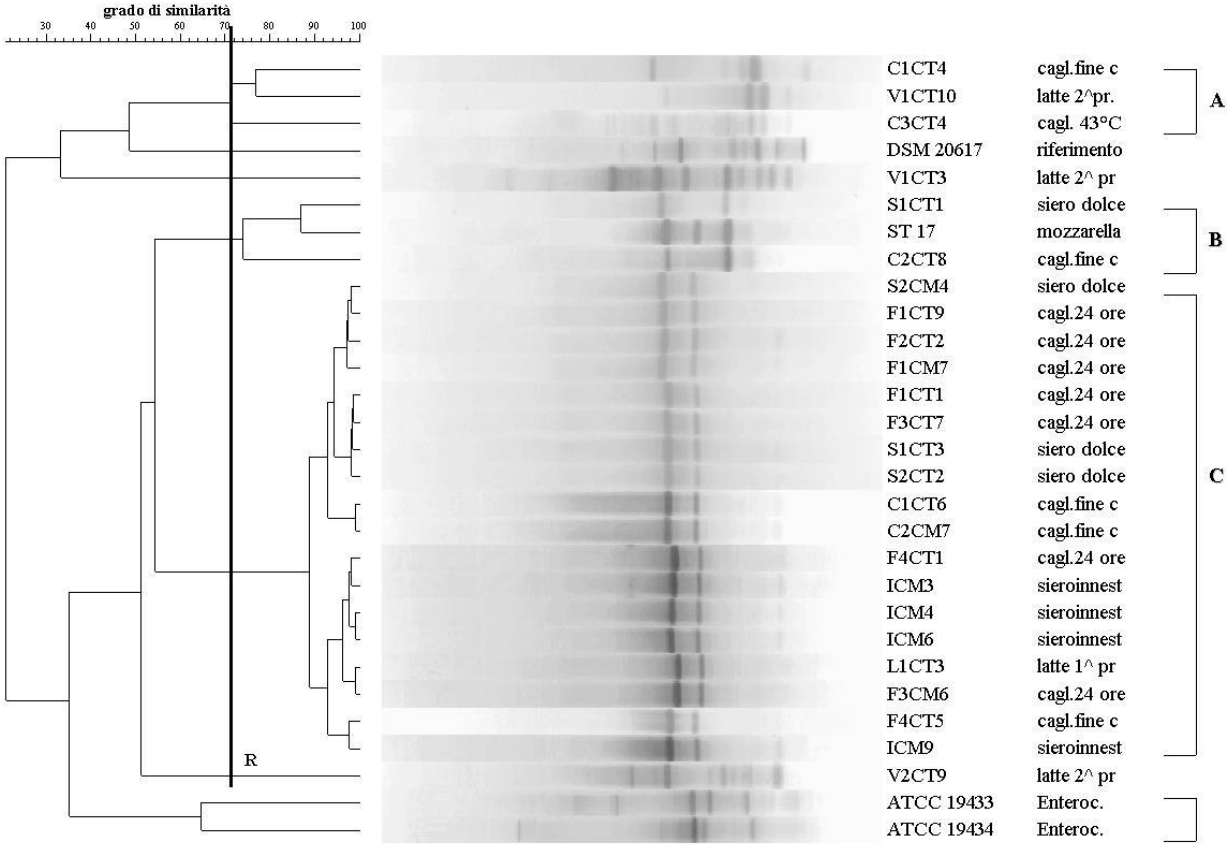
**Fig. 4 Caratterizzazione della microflora mesofila**



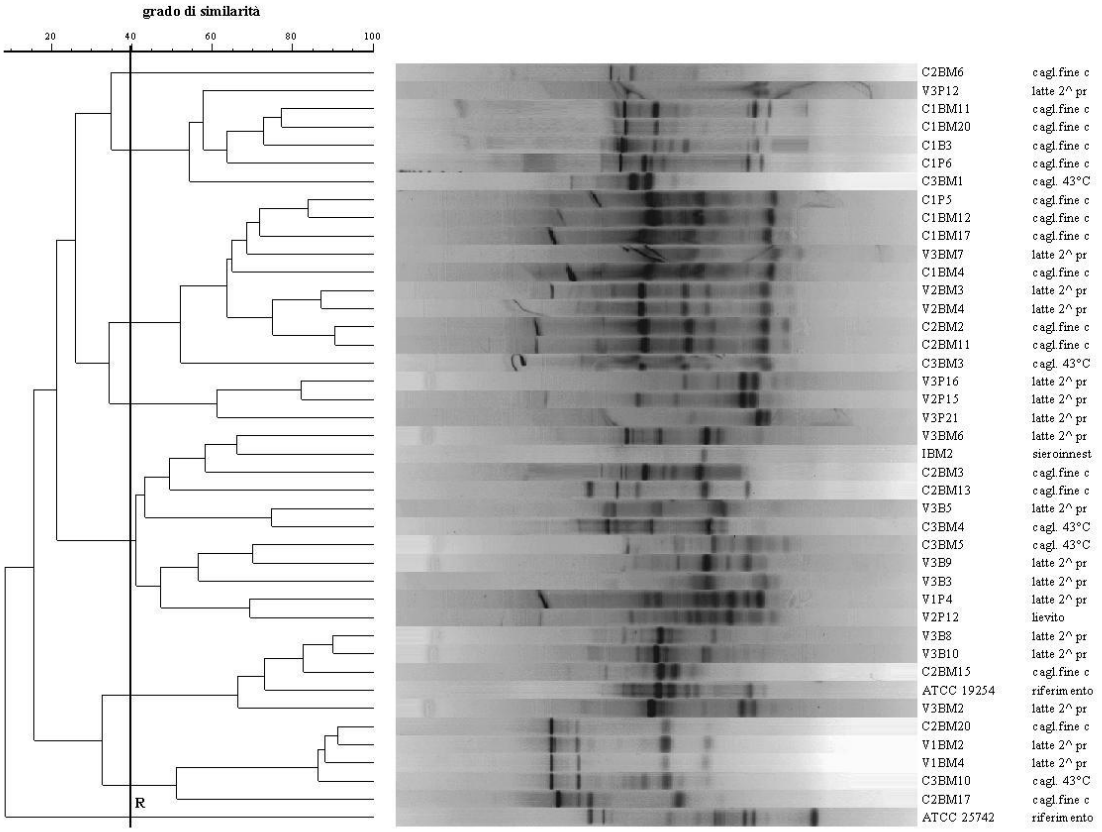
## *Studio della biodiversità*

L'analisi ed il confronto dei profili RAPD dei differenti ceppi presi in esame, ottenuti per amplificazione con il primer M 13, eseguiti con programma di analisi dell'immagine in modo da valutare il loro grado di similarità genetica, ha permesso di suddividere la maggioranza degli streptococchi termofili in tre gruppi principali, di differente composizione numerica: il gruppo "C" che è il più numeroso, comprendendo 18 ceppi, contiene ceppi che presentano solo due bande principali con leggerissime differenze di peso molecolare tra loro. Il gruppo "A" è costituito da tre ceppi di cui due sono in grado di sviluppare anche in presenza di sale, mentre un altro ceppo resistente al sale, V1CT3, costituisce gruppo a sé. Il gruppo "B" è costituito da due ceppi di cui uno isolato dall'ecosistema "Valle Trompia" e l'altro ceppo proveniente da lavorazione di Mozzarella (dal quale per altro differiscono per la mancanza di una banda) ed aggiunto all'analisi di raggruppamento come rappresentante di una differente tecnologia e di un ambiente d'origine diverso.
Ai ceppi di *Streptococcus thermophilus* sottoposti ad amplificazione RAPD è stato aggiunto anche il ceppo di collezione, preso come riferimento della specie (DSM 20617). Si nota come il profilo di amplificazione del ceppo di collezione si discosti da quello degli isolati da Formaggio NOSTRANO VALTROMPIA per cui si può affermare che questi ultimi, pur essendo classificati come *S. thermophilus*, sono "differenti" rispetto al ceppo di riferimento. Per affermare tuttavia un'identità dei ceppi di *S. thermophilus* isolati sarà necessario confrontarli con un numero maggiore di profili derivanti da altre tecnologie casearie e da altre collezioni.
Comunque resta il fatto che si osservano delle differenze tra i vari profili di *S. thermophilus* analizzati ed è possibile individuare, sostanzialmente, otto differenti biotipi che ben si separano inoltre dai profili degli Enterococchi aggiunti nel corso dell'analisi, da cui si deduce che, nei limiti della sperimentazione eseguita, i ceppi considerati mostrano una loro "tipicità". Il fatto poi che nel gruppo C si ritrovino ceppi con caratteristiche analoghe provenienti da due momenti di campionamento differenti nel tempo suffraga ulteriormente l'ipotesi di una specificità dei ceppi di *S. thermophilus* isolati in Valle Trompia.

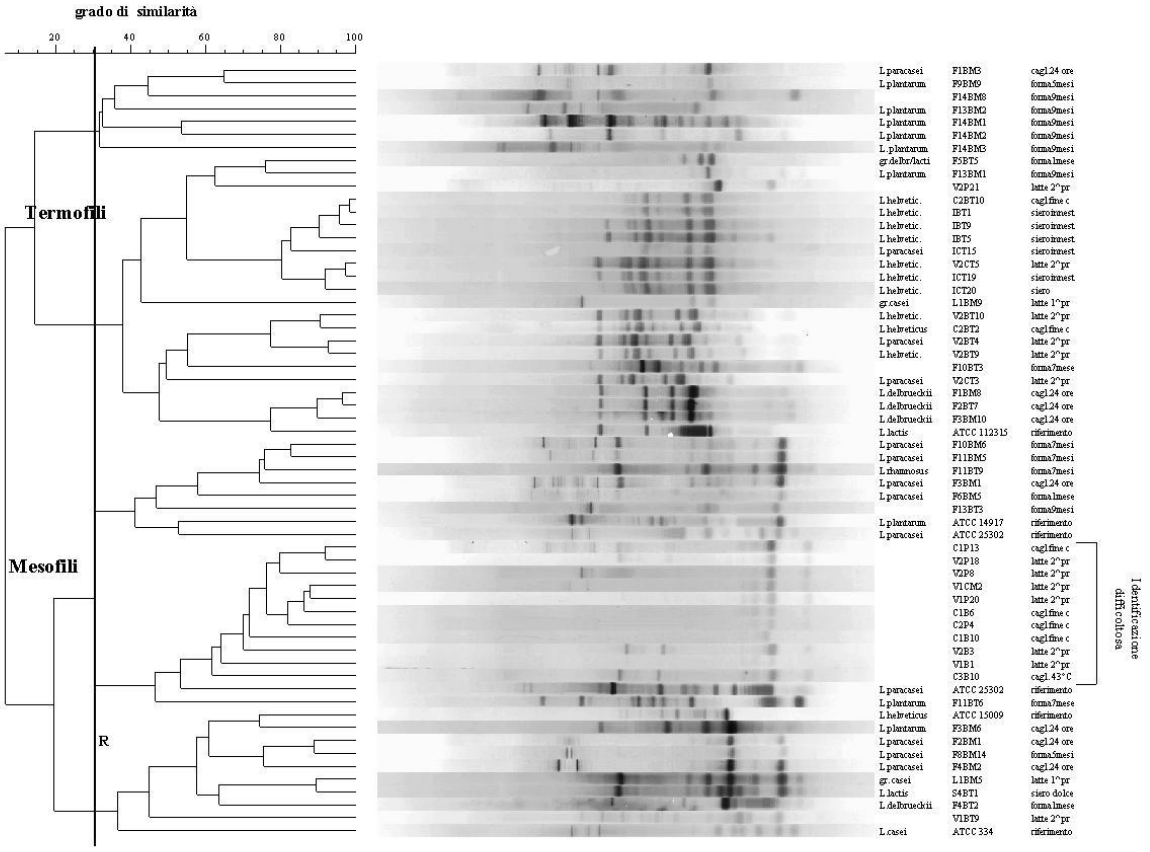
Fra i cocchi mesofili si ha la presenza di numerosi biotipi: tale biodiversità è indicata da una ampia dispersione dei profili, che potrebbe corrispondere realmente ad un'eterogeneità di ceppi dato che la maggior parte di essi appartengono alla medesima specie *Leuconostoc* . Nel caso dei lattobacilli invece è difficile affermare la presenza di biotipi diversi, in quanto pur a fronte di un numero importante di ceppi analizzati si è riscontrata la presenza di almeno 6 specie diverse. La numerosità delle specie microbiche presenti ha abbassato quindi il numero dei ceppi appartenenti alla singola specie, e reso meno significativa la valutazione di biodiversità. In linea di massima è possibile differenziare i lattobacilli nei due grandi gruppi termofili e mesofili ed evidenziare una tendenza a raggrupparsi dei ceppi appartenenti alla specie *L. helveticus.* Come evidenziato nel caso di *S. thermophilus* i profili RAPD dei ceppi di *L. helveticus* isolati da latte e sieroinnesto sono molto simili tra loro e distanti dal profilo del ceppo di riferimento. Il limitato numero dei ceppi di *L. lactis* e *L. delbrueckii* non permette di fare ulteriori considerazioni. Come osservato anche per altri ecosistemi caseari i ceppi di *L. plantarum* hanno la tendenza a "sparpagliarsi" e a non concentrarsi in un unico gruppo come, invece, hanno la tendenza a fare i ceppi appartenenti alle specie *L. casei* e *L. paracasei.*
Un dato di una certo interesse è il fatto che si delinea un gruppo di ceppi abbastanza separato dagli altri (gruppo identificazione difficoltosa) e che annovera al suo interno proprio quei ceppi che avevano presentato difficoltà di estrazione del DNA. Questo è un dato che evidenzia una peculiarità dei ceppi stessi: questa "segregazione" dei loro profili RAPD infatti è indice di una loro "famigliarità" sul cui significato non abbiamo dati per suffragare al momento ipotesi concrete.




**Streptococchi: dendrogramma dei profili figerprinting ottenuti con la tecnica RAPD/M13 (indice cofenetico 92.8%)**




**Cocchi mesofili: dendrogramma dei profili fingerprinting ottenuti con la tecnica RAPD/M13 (indice cofenetico 75%)**




**Lattobacilli: dendrogramma dei profili fingerprinting ottenuti con la tecnica RAPD/M13. (indice cofenetico 82:9%)**

**Letteratura allegata sul formaggio NOSTRANO VALTROMPIA**

**Mucchetti G., Neviani E., Carminati D., Contarini G., Olivari G., Mondinelli R., Savino L. :** *Il formaggio "Nostrano" di Valle Trompia: indagine tecnologica e composizione chimica.* **INDUSTRIA DEL LATTE 21 (2) 23-40 (1985)**

**Mucchetti G., Taglietti P., Emaldi G.C., Mondinelli R.:** *Influenza di alcuni fattori tecnologici ed ambientali sulle caratteristiche organolettiche del formaggio di Valle Trompia.* **LATTE 18, 548-556 (1993)**