

## RUOLO DI LATTOBACILLI PROTEOLITICI NATURALI NELLA FERMENTAZIONE E STAGIONATURA DELLA SCAMORZA ALTAMURANA

### INTRODUZIONE

La pastorizzazione del latte, sebbene permetta di controllare le microflora patogene maggiormente presenti, comporta una drastica riduzione delle popolazioni batteriche naturali coinvolte nella fermentazione e stagionatura dei formaggi; pertanto, si utilizzano starter selezionati per ottenere la fermentazione del latte pastorizzato. Questo tipo di lavorazione, effettuato su scala industriale, porta ad una forte riduzione della biodiversità microbica esistente in caseificio.

In Italia la diffusione di piccoli caseifici e di disciplinari di produzione, che ancora permettono l'uso di latte non pastorizzato e di microflora naturali nei processi di trasformazione, consente l'ottenimento di una vasta gamma di formaggi dotati delle più differenti caratteristiche organolettiche.

Lo studio della Scamorza Altamurana (Baruzzi *et al.*, 2002), un formaggio a pasta filata tipico della Murgia barese ottenuto da latte pastorizzato ma inoculato con siero innesto naturale, ha permesso di isolare 25 ceppi di batteri lattici appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Weissella*.

Le analisi fisiologiche condotte sui ceppi hanno rivelato che gli streptococchi avevano un ruolo prettamente acidificante, mentre otto ceppi di lattobacilli su dodici mostravano elevata attività proteolitica.

Per comprendere il ruolo che i ceppi autoctoni svolgono nella fermentazione e stagionatura della Scamorza Altamurana, quattro lattobacilli proteolitici sono stati impiegati come starter nella produzione di formaggi in laboratorio per studiarne le attività proteolitiche totali e peptidasiche. Inoltre, le analisi molecolari condotte su campioni prelevati durante un normale ciclo di lavorazione della Scamorza hanno permesso di individuare la presenza di alcuni ceppi proteolitici, precedentemente non isolati con tecniche tradizionali.

### MATERIALI E METODI

Le fasi di lavorazione e di campionamento della Scamorza Altamurana sono illustrate in fig. 1.

Analisi microbiologiche ed identificazione tassonomica dei ceppi

Sono stati utilizzati i substrati Rogosa SL Agar e M17 Agar (Difco, Detroit, USA) per la conta dei presunti lattobacilli e dei cocci Gram positivi. Da ciascuno dei suddetti sub-

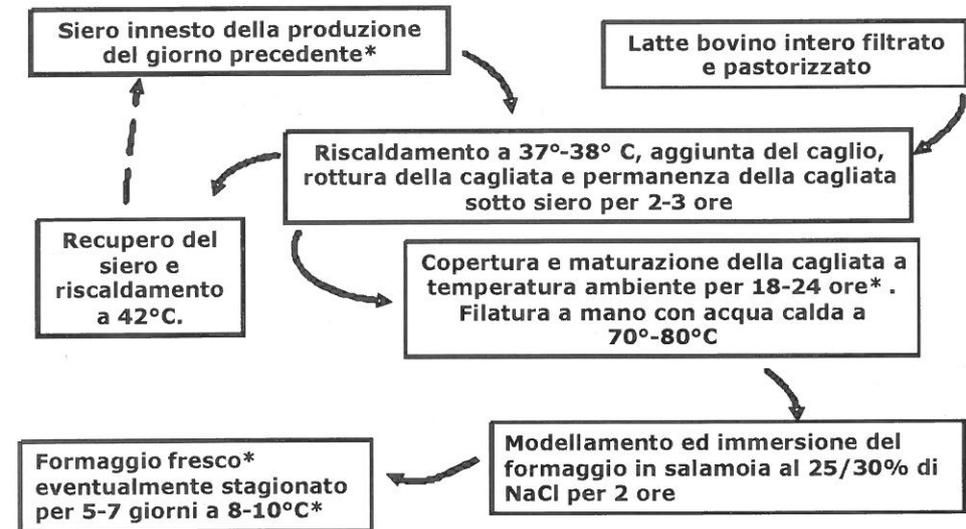


Fig. 1 - Processo di produzione artigianale della Scamorza Altamurana. I campioni analizzati sono stati prelevati nelle fasi contrassegnate dall'asterisco.

strati sono state selezionate, in maniera casuale, circa 40 colonie per ogni campione. Gli isolati sono stati tipizzati utilizzando il protocollo "two step" RAPD-PCR ed identificati mediante sequenziamento dell'rDNA 16S (Baruzzi *et al.*, 2002).

#### Analisi molecolare della proteasi di membrana

Il DNA estratto direttamente dai campioni provenienti dalla lavorazione tradizionale della Scamorza Altamurana è stato utilizzato per l'amplificazione dei geni specie-specifici codificanti per proteasi di membrana (CEP) (Siezen, 1999). Primer specifici per diverse proteasi sono stati disegnati sulla base delle sequenze presenti in banca dati di CEP specie-specifiche per *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*prtB*), per *L. helveticus* (*prtH*) e per *L. paracasei* (*prtP*).

Non è stato possibile ottenere frammenti PCR da *L. gasseri* in quanto al momento erano assenti in banca dati sequenze CEP specifiche per questa specie.

#### Analisi della proteolisi in latte e formaggio

Tutti i ceppi sono stati saggiati per l'attività proteolitica totale in latte a 30°C, seguendo la metodica *o-pa* (Church *et al.*, 1983). I ceppi che hanno mostrato la maggiore attività proteolitica in latte sono stati analizzati per l'attività proteolitica sviluppata al tempo zero e dopo sei giorni di stagionatura a 10°C in Scamorze ottenute in laboratorio come riportato di seguito. Un ceppo proteolitico per ognuna delle seguenti specie, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. paracasei* e *L. gasseri*, è stato fatto accrescere in MRS broth (Difco, Detroit, USA) per 16 ore alla temperatura appropriata e quindi centrifugato, lavato in soluzione salina ed inoculato, ciascuno alla concentrazione di  $10^7$ - $10^8$  cfu/mL di latte. Il processo di lavorazione tradizionale della Scamorza Altamurana è stato quindi seguito, realizzando quattro diverse prove, una per ogni lattobacillo proteolitico. L'acidificazione del latte, durante la lavorazione in laboratorio, è stata ottenuta inoculan-

do, insieme ad ogni singolo lattobacillo proteolitico,  $10^7$  cfu/mL di *Streptococcus thermophilus* C48W, che non mostrava significativa attività proteolitica in latte.

Le frazioni azotate solubili e insolubili a pH 4,6 di ciascun formaggio così ottenuto sono state analizzate con Urea-PAGE secondo il metodo di Andrews (1983) ed i gel sono stati colorati come descritto da Blakesley and Boezi (1977).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

La distribuzione nei campioni di Scamorza Altamurana dei lattobacilli totali, dei lattobacilli proteolitici e dei cocchi Gram positivi, desunta dalle conte in piastra, è mostrata in fig. 2.

Si osserva come la conta dei lattobacilli proteolitici è risultata prossima a quella dei lattobacilli totali; ciò sottolinea che l'evoluzione della microflora naturale lattiero-casearia favorisce la conservazione nel siero innesto, rinnovato giornalmente, dei ceppi più direttamente coinvolti nella trasformazione del latte.

La ricerca dei marker molecolari specie-specifici effettuata mediante PCR su DNA estratto direttamente da campioni di Scamorza Altamurana è mostrata in fig. 3.

A differenza di quanto rilevato dai conteggi in piastra, i ceppi proteolitici di *L. helveticus* sembrano essere presenti anche nei campioni formaggio e non solo nei campioni siero e cagliata. L'indagine molecolare ha permesso di rilevare cellule presumibilmente presenti in quantità inferiori rispetto a quelle dei ceppi dominanti.

I 4 ceppi di lattobacilli proteolitici utilizzati come starter hanno mostrato attività proteolitica sia in latte dopo 6 giorni di crescita a  $30^\circ\text{C}$ , sia in formaggio fino al 6° giorno di stagionatura a  $10^\circ\text{C}$  (fig. 4). È ipotizzabile che tali attività abbiano luogo anche durante la lavorazione in caseificio. Il ceppo che ha sviluppato la maggior attività proteolitica è stato il *L. helveticus*.

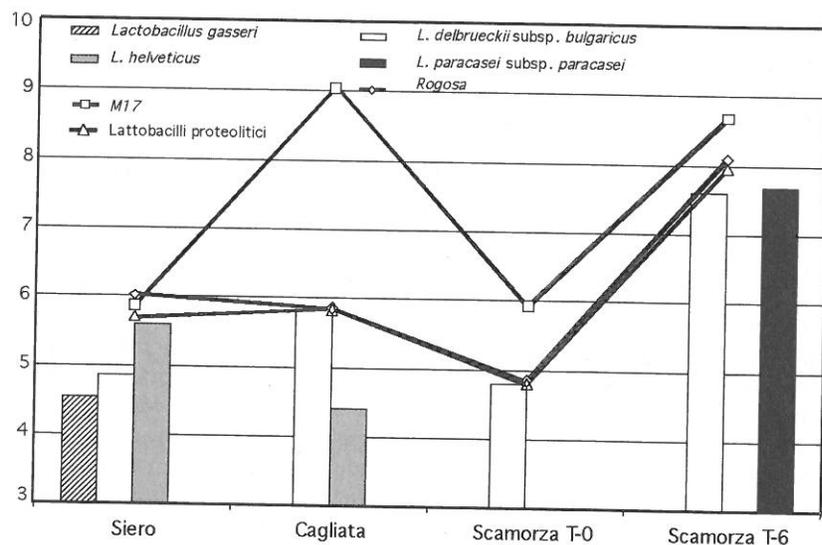


Fig. 2 - Confronto delle dinamiche di sviluppo dei lattobacilli proteolitici e dei presunti LAB isolati da piastra.

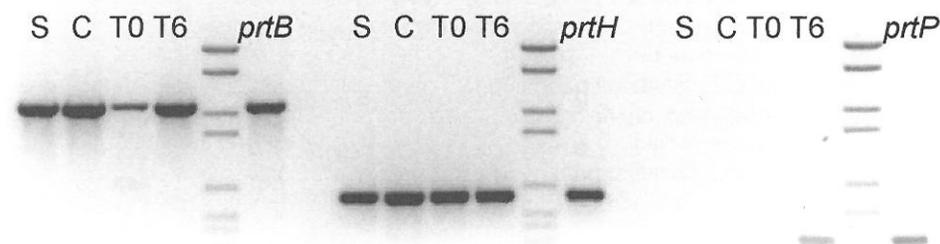


Fig. 3 - Presenza di geni codificanti per proteinasi di membrana specie-specifiche nei campioni di Scamorza Altamurana. S, siero; C, cagliata; T-0, Scamorza dopo filatura; T-6, Scamorza dopo stagionatura.

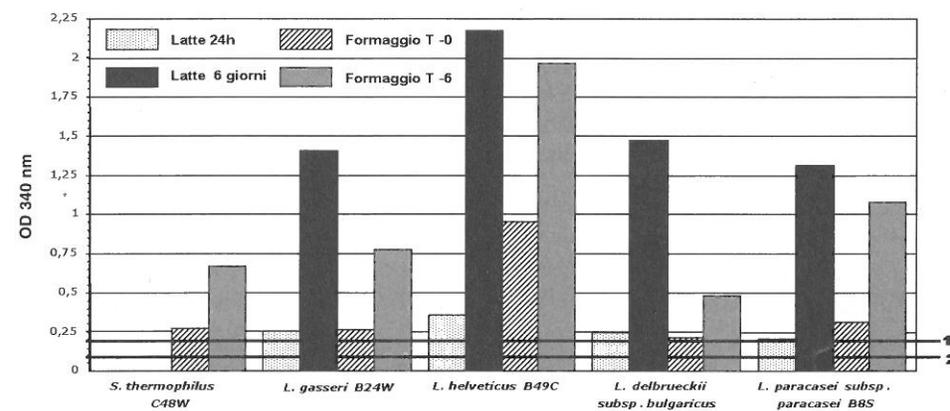


Fig. 4 - Attività proteolitica totale sviluppata dai lattobacilli naturali in latte e formaggio. Le linee 1 e 2 sono, rispettivamente, la lettura del latte e del Na-caseinato.

L'elettroferogramma dell'N insolubile a pH 4,6 ha mostrato l'idrolisi parziale delle caseine  $\alpha_{s1}$  e  $\beta$  (fig. 5 A) durante i 6 gg di stagionatura dei formaggi ottenuti in laboratorio. Poche differenze sono state riscontrate a carico della frazione proteica insolubile tra il controllo inoculato solo con lo *S. thermophilus* ed i formaggi ottenuti con l'inoculo dei ceppi proteolitici. L'analisi della frazione azotata solubile ha messo in evidenza una maggiore concentrazione di peptidi a 6 gg di stagionatura rispetto a quella osservata nel formaggio dopo 24 ore dalla produzione. In alcuni casi sono stati riscontrati peptidi di dimensioni diverse in funzione del ceppo utilizzato come starter (fig. 5 B). Così come per la proteolisi totale la maggiore attività peptidasica è stata sviluppata da *L. helveticus*.

## CONCLUSIONI

Le analisi molecolari e fisiologiche condotte per comprendere il ruolo dei lattobacilli proteolitici naturali nella fermentazione e stagionatura della Scamorza Altamurana hanno

messo in evidenza che: 1) i lattobacilli proteolitici rappresentano oltre il 90% della popolazione di lattobacilli; 2) alcuni ceppi, ad es. *L. helveticus* e *L. paracasei* sono presenti nei campioni anche se non rilevati dall'isolamento in piastra; 3) ogni ceppo proteolitico sviluppa la propria attività fino al sesto giorno di stagionatura; 4) l'idrolisi proteica svolta da ciascun ceppo produce differenti frazioni peptidiche.

I risultati di questo lavoro inducono a ritenere che solo la presenza di tutti i lattobacilli proteolitici isolati concorre a determinare le caratteristiche organolettiche tipiche di questo formaggio a pasta filata a brevissima stagionatura.

Il presente lavoro mostra come la biodiversità delle microflorie naturali utilizzate per la produzione degli alimenti a vocazione territoriale possa essere fonte di isolamento di nuovi microrganismi dotati di caratteristiche tecnologicamente utili, come per esempio il *L. gasseri* B24W.

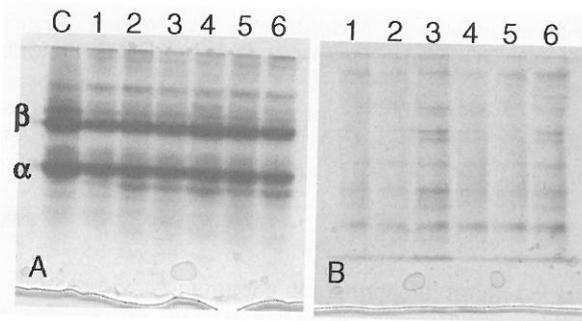


Fig. 5 - Urea-PAGE delle frazioni proteiche insolubili (A) e solubili (B) a pH 4,6. (C, Na-caseinato; 1, *S. thermophilus* C48W T-0; 2, *S. thermophilus* C48W T-6; 3, *L. helveticus* B49C T-6; 4, *L. delbrueckii* B15Z T-6; 5, *L. paracasei* B18S T-6; 6, *L. gasseri* B24W T-6).

sto formaggio. L'applicazione di un protocollo RAPD-PCR ha portato all'isolamento di 25 biotipi appartenenti a cinque specie di *Lactobacillus*, tre di *Streptococcus*, una di *Weissella* ed una di *Enterococcus*.

Le analisi fisiologiche di tutti i ceppi hanno mostrato che gli isolati appartenenti al genere *Streptococcus* erano i più acidificanti mentre alcuni ceppi di lattobacilli erano dotati di un'elevata attività proteolitica totale in latte.

L'analisi dei diversi geni (*prtB*, *prtH*, *prtP*) delle proteinasi associate alla parete cellulare (CEP) dei lattobacilli, effettuata estraendo ed amplificando il DNA direttamente da campioni prelevati durante la lavorazione e stagionatura della Scamorza Altamurana, ha rivelato la loro presenza anche quando i relativi ceppi proteolitici non sono stati isolati con tecniche tradizionali. In particolare, quattro ceppi proteolitici appartenenti alle specie *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *L. gasseri*, utilizzati come starter in laboratorio, hanno mostrato attività proteolitica totale fino al sesto giorno di stagionatura del formaggio.

L'analisi delle frazioni caseiniche solubili ed insolubili a pH 4,6, effettuata su scamorze prodotte in laboratorio inoculando il latte con un ceppo proteolitico alla volta, ha indicato come ogni ceppo CEP<sup>+</sup> concorre, con le proprie attività proteolitiche, nel determinare il profilo peptidico presente nel formaggio tipico.

## SUMMARY

### ROLE OF NATURAL PROTEOLYTIC LACTOBACILLI IN FERMENTATION AND RIPENING OF SCAMORZA ALTAMURANA

The growth dynamics of the natural microbial community responsible for the fermentation of Scamorza Altamurana, a stretched cheese from whole cow's milk typical of Southern Italy, was investigated in order to understand the role of bacterial populations from natural whey culture in fermentation and ripening of this cheese. The application of a RAPD-PCR protocol made it possible to isolate 25 biotypes belonging to five species of *Lactobacillus*, three of *Streptococcus*, one of *Weissella* and one of *Enterococcus*.

The physiological analyses of all lactic acid bacteria strains revealed that the isolates belonging to *Streptococcus* genus were the most acidifying, whereas lactobacilli were most proteolytic.

The analysis of different *Lactobacillus* cell envelope proteinase (CEP) genes (*prtB*, *prtH*, *prtP*), carried out extracting and amplifying DNA directly from samples collected during processing and ripening of Scamorza, showed their presence also when their respective proteolytic strains were not isolated by traditional techniques. Four proteolytic strains belonging to *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. paracasei* subsp. *paracasei* and *L. gasseri*, used as starters in laboratory, exhibited a total proteolytic activity until the sixth day of ripening of cheese.

Urea-PAGE analyses of pH 4.6 soluble and insoluble nitrogen fractions, carried out on cheeses obtained in laboratory using, for each Scamorza, as starter and ripening microflora, one of the different proteolytic *Lactobacillus*, indicated that each CEP<sup>+</sup> strain contributes, with its own proteolytic activities, to provide peptide profiles present in typical cheese.

Lavoro svolto in parte nell'ambito dei Piani di Potenziamento delle Reti di Ricerca Scientifica e Tecnologica del MURST, Progetto 2.1, W3 "Caratterizzazione microbiologica ed enzimatica di formaggi pugliesi".

Si ringrazia il Caseificio dei Colli Pugliesi nella persona del Sig. Antonio Maiullari per la cortese collaborazione nella supervisione della lavorazione e stagionatura della Scamorza Altamurana.

## BIBLIOGRAFIA

- Andrews A.T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.* 50: 45-55.
- Baruzzi F., Matarante A., Morea M., Cocconcelli P.S. 2002. Microbial Community Dynamics during the Scamorza Altamurana Cheese Natural Fermentation. *J. Dairy Sci.* 85: 1390-1397.
- Blakesley R.W., Boezi J.A. 1977. A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Comassie Brilliant Blue G250. *Anal. Biochem.* 82: 580-582.
- Church F.C., Swaisgood H.E., Porter D.H., Catignani G.L. 1983. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* 66: 1219-1227.
- Siezen R.J. 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 76: 139-155.

## RIASSUNTO

La crescita e la dinamica della microflora naturale responsabile della fermentazione della Scamorza Altamurana, un formaggio a pasta filata da latte bovino intero tipico dell'Italia Meridionale, sono state studiate per comprendere il ruolo delle popolazioni batteriche, presenti nel siero innesto naturale, nella fermentazione e stagionatura di que-