

I microrganismi nella tecnologia di produzione del Pecorino Toscano DOP: starter autoctoni e relazioni con la qualità del formaggio

INTRODUZIONE

L'impiego dell'innesto, al fine di "governare" i processi fermentativi della caseificazione, è pratica consolidata nella tradizione dei formaggi tipici. L'acidificazione, infatti, risulta determinante nel regolare i processi di coagulazione del latte, di spurgo della cagliata e di maturazione della pasta (Mucchetti e Neviani, 2006). La composizione microbiologica degli innesti può variare in relazione all'utilizzo. Alle caratteristiche delle colture, e in particolare all'attività metabolica delle specie e dei biotipi che le costituiscono, sono legate le caratteristiche dei prodotti ottenuti e, in molti casi, da loro dipende l'originale qualità che diventa anche tipicità e pregio commerciale. Il Pecorino Toscano DOP, uno dei formaggi tipici della tradizione casearia italiana, è prodotto con latte di pecora pastorizzato e prevede, secondo quanto riportato nel Disciplinare di Produzione, l'utilizzo di un innesto autoctono. Il profilo microbiologico di questo formaggio è determinato dalla presenza di un'eterogenea popolazione lattica, derivante dal latte crudo, residuale al trattamento termico e derivante dallo starter, che evolve nel corso del processo di produzione (Neviani et al., 1998).

Al fine di preservare la microflora caratteristica di questa peculiare nicchia casearia, il Consorzio del Pecorino Toscano si avvale, per la preparazione dell'innesto, di una collezione microbica costituita da specie e biotipi isolati durante le diverse fasi del processo di produzione. Tale ceppoteca, allestita a partire dagli anni '90, è prevalentemente costituita da ceppi appartenenti alle specie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Streptococcus thermophilus*. Questo

* Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università di Parma

progetto si è posto lo scopo di rivalutare la collezione microbica del Pecorino Toscano al fine di ampliarla, caratterizzarla con tecniche altamente discriminanti e renderla di maggior rilievo tecnologico. Secondo il Disciplinare di Produzione, infatti, tale collezione deve essere aggiornata periodicamente attraverso nuove ricerche validate dal Consorzio di tutela e trasmesse al Ministero competente, anche per verificare quale parte della microflora (specie e biotipi) del latte crudo sia ancora oggi da ritenere autoctona. Nel corso dell'ultimo decennio gli ecosistemi ambientali potrebbero essersi modificati anche in seguito ad innovazioni tecnologiche occorse lungo la filiera produttiva (dall'allevamento al caseificio) e tale fenomeno può aver comportato la perdita o l'arricchimento in specie e biotipi, modificazione che deve essere valutata e considerata nella costituzione di una nuova collezione microbica aggiornata.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quindi quello di identificare nuovi ceppi microbici isolati da campioni di latte crudo, latte crudo in caldaia addizionato di starter, cagliata a fine stufatura, provenienti da dieci differenti caseifici afferenti al Consorzio Pecorino Toscano. In una seconda fase sono state messe a confronto le caratteristiche genetiche e metaboliche dei ceppi di *S. thermophilus* e *L. lactis* appartenenti alla vecchia (1998) e alla nuova collezione.

MATERIALI E METODI

Sono stati oggetto di questo studio dieci caseifici afferenti al Consorzio di Tutela del Pecorino Toscano. Da ogni caseificio sono stati prelevati campioni di latte crudo, latte in caldaia pastorizzato addizionato di starter e cagliata a fine stufatura derivanti dal medesimo processo di caseificazione. L'utilizzo di mezzi di coltura differenti (Milk Plate Count Agar, Main Rogosa Agar, M17-lattosio) e l'incubazione differenziale a 25°C e a 42°C, per 48 h in condizioni di anaerobiosi, ha permesso di recuperare la microflora lattica mesofila e termofila presente nei differenti campioni. In totale sono stati isolati 209 ceppi, in particolare 57 ceppi da latte crudo, 77 da latte crudo addizionato di starter, 75 da cagliata a fine stufatura. Gli isolati sono stati identificati mediante tecnica tRNAAla-23S rDNA- RFLP (Mancini et al., 2012), che si basa sullo studio e comparazione delle sequenze dell'IRS (Intergenic Spacer Region), in particolare di quello tra i geni 16S-23S dell'rDNA. È stata quindi effettuata l'estrazione del DNA totale dalle colture microbiche dei 209 isolati. La regione ISR (tRNAAla-23S) è stata amplificata mediante PCR a partire dal DNA genomico. È stata quindi effettuata la digestione enzimatica

del frammento tRNA^{Ala}-23S con tre enzimi di restrizione (Hind III, Hinf I e TaqI) ed in seguito a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide sono stati ottenuti profili di restrizione caratteristici per ogni ceppo. L'elaborazione dei profili elettroforetici con software BioNumerics (versione 5.1; Applied Maths, BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgio) e la comparazione con quelli dei ceppi type presenti in database ha reso possibile l'identificazione di ciascun isolato. Per lo studio successivo, di confronto tra nuovi e vecchi isolati appartenenti alla collezione del Consorzio, sono stati presi in esame 79 ceppi, appartenenti alle specie *S. thermophilus* e *L. lactis* subsp. *lactis*. In particolare sono stati analizzati 20 ceppi di *L. lactis* (1-20) e 20 ceppi di *S. thermophilus* (21-40) della vecchia collezione e confrontati con 20 ceppi di *L. lactis* (61-80) e 19 ceppi di *S. thermophilus* (41-60) della nuova collezione. Per valutare il polimorfismo genetico tra i ceppi è stata impiegata la tecnica Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). Tale tecnica, basata sulla digestione dell'intero genoma con enzimi di restrizione, a cui seguono amplificazioni specifiche dei frammenti ristretti e corsa in elettroforesi capillare, genera un "fingerprinting" caratteristico per ogni genotipo. Per i 39 ceppi *S. thermophilus* è stato seguito il protocollo riportato in letteratura per questa specie (Lazzi et al., 2009), mentre per i 40 ceppi *L. lactis* è stata necessaria la messa a punto del metodo di analisi al fine di individuare le combinazioni di primers per avere un profilo elettroforetico ottimale. I profili relativi a ciascuna corsa elettroforetica sono stati elaborati con il programma GeneMapper Software 4.0 (Applied Biosystem-Pe Corporation, Foster City, California, USA), al fine di produrre elettroferogrammi caratteristici per ogni ceppo studiato. I differenti elettroferogrammi sono stati poi elaborati mediante il software Statistica 6 al fine di individuare la distanza genetica tra i diversi genotipi.

L'attività metabolica, rilevata mediante analisi impedometrica, è stata analizzata con lo strumento BacTrac 4300 (SY-LAB Purkersdorf, Austria). Il metabolismo microbico provoca modificazioni nelle proprietà elettriche di un mezzo culturale, aumentandone la conduttanza grazie al rilascio di metaboliti a conducibilità più elevata, e quindi facendo diminuire l'impedenza ovvero la resistenza che si oppone alla corrente elettrica applicata al mezzo (Gatti et al., 1993; Mucchetti et al., 1993) (fig. 1a). Sono stati misurati cambiamenti in conducibilità e impedenza a intervalli regolari di tempo durante la crescita in latte magro sterile dei ceppi appartenenti alle due specie, a temperature definite (30 °C per *L. lactis* e 40 °C per *S. thermophilus*). Sono state quindi create curve di impedenza, che esprimono la variazione percentuale dell'impedenza (M%) in funzione del tempo. Per ogni ceppo analizzato sono stati considerati i seguenti parametri: T1, tempo corrispondente all'inizio della

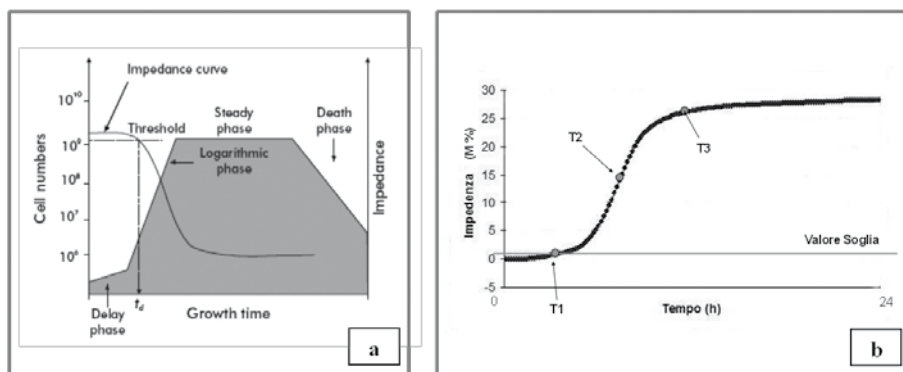


Fig. 1 Rappresentazione di una curva di crescita batterica e di impedenza (a) e di una curva impedometrica (b)

fase esponenziale, T2, tempo corrispondente alla massima velocità di crescita e T3, tempo corrispondente all'inizio della fase stazionaria (fig. 1b). È stato inoltre considerato l'intervallo di tempo tra la massima velocità di crescita (T2) e l'ingresso in fase stazionaria (T3), parametro che può essere messo in relazione con la resistenza del ceppo a sopravvivere in ambiente acido. I dati ottenuti sono stati elaborati dal programma freeware *Octave 3.6.4.* e mediante SPSS Statistics 20.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Ampliamento collezione autoctona

La caratterizzazione genetica degli isolati, condotta mediante tecnica tRNA-Ala-23S rDNA- RFLP, ha permesso di identificare la quasi totalità degli isolati microbici, mesofili e termofili, derivanti dai campioni di latte crudo, latte in caldaia, cagliata a fine stufatura dei dieci caseifici oggetto di studio. Il dendrogramma relativo ai profili elettroforetici ottenuti (fig. 2) evidenzia come dei 209 ceppi analizzati 191 sono stati suddivisi in cinque cluster ben distinti, mentre i restanti 18 non sono risultati comparabili ad alcuna specie presente nel database e per la loro identificazione si è proceduto al sequenziamento del gene 16S rDNA. In generale, è stato evidenziato come le specie dominanti siano due: *L. lactis subsp lactis* e *S. thermophilus* (fig. 2 e fig. 3), ovvero le due principali specie acidificanti utilizzate come starter nella produzione di Pecorino Toscano. Tra gli isolati da latte crudo (fig. 3) la specie dominante, rilevata

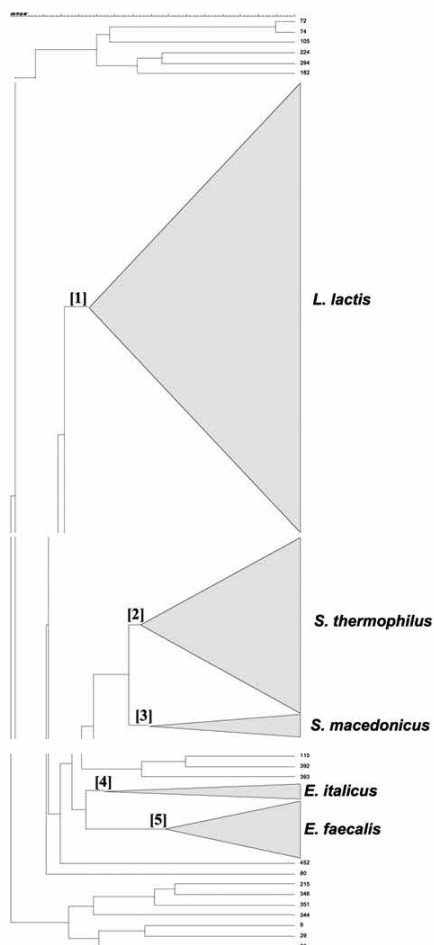


Fig. 2 Dendrogramma relativo all'identificazione dei 209 isolati effettuata mediante *tRNAAla-23S rDNA-RFLP*

in otto caseifici su dieci, è risultata essere *L. lactis* subsp. *lactis*. Sono risultati infatti ascrivibili a questa specie 31 isolati su 57. È importante sottolineare come il latte crudo sia la matrice nella quale è stata osservata la più alta variabilità tra gli isolati non associati a specie conosciute presenti nel database, infatti 15 dei 18 isolati ignoti provenivano da questa tipologia di campione. Questo dato può essere riconducibile alla presenza di microrganismi autocotoni e caratteristici sia dell'allevamento che dell'ambiente di trasformazione del formaggio Pecorino Toscano DOP (Quigley et al., 2013). Nel latte crudo sono state ritrovate specie minoritarie come *S. thermophilus*, *Streptococcus macedonicus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus italicus*, *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc citreum*. In particolare *S. thermophi-*

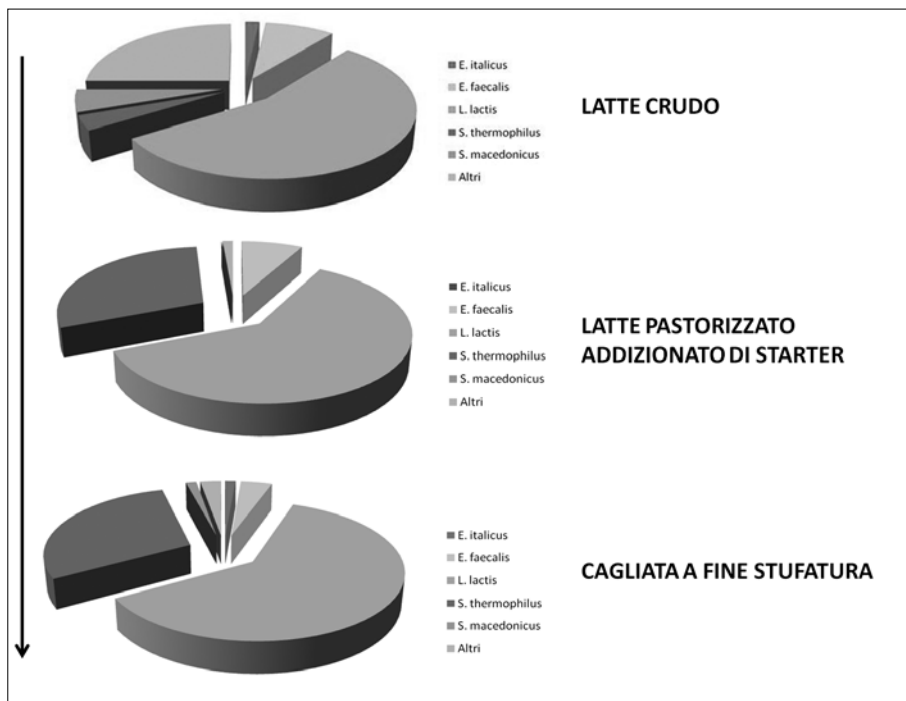


Fig. 3 Distribuzione delle specie microbiche nei campioni di latte crudo, di latte pastorizzato addizionato di starter, di cagliata a fine stufatura

lus è stato isolato solo dal latte di due caseifici. Il risultato conferma quanto descritto dalla letteratura che riporta che *S. thermophilus* si ritrova nel latte crudo in quantità assai minore rispetto alla specie *L. lactis* (Quigley et al 2013) e che l'origine di questa specie sia prevalentemente l'innesto (Mucchetti, Neviani, 2006).

Gli enterococchi, tra cui *E. faecalis* e *E. italicus* ritrovati in diversi campioni, costituiscono un importante gruppo di batteri ubiquitari, il cui habitat predominante è rappresentato dal tratto intestinale di uomini e animali. Per questa loro fonte endogena sono considerati indice di contaminazione fecale, anche se non è da escludere una contaminazione esterna ai locali di lavorazione e avvenuta durante le fasi di prelievo del campione o durante il trasporto (Fortina et al., 2004). Infine, il ritrovamento di specie come *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc citreum* nei campioni di latte crudo, ma la loro assenza nella cagliata a fine stufatura, indica che questi microrganismi non partecipano attivamente all'acidificazione della cagliata ma non esclude che possano essere presenti come popolazione minoritaria e

contribuire al processo di maturazione visto il loro potenziale nella produzione di aromi.

Nel latte pastorizzato addizionato di starter le due specie dominanti tra i 77 isolati sono risultate, come atteso, *L. lactis* subsp. *lactis* (47 isolati) e *S. thermophilus* (23 isolati). Entrambe le specie sono infatti aggiunte al latte in caldaia con l'innesto in miscele a prevalenza termofila (*S. thermophilus*), mesofila (*L. lactis*) o in rapporto di parità (Mucchetti e Neviani, 2006). La specie *L. lactis* è stata isolata nel latte pastorizzato di tutti i caseifici mentre *S. thermophilus* in soli 5 caseifici su 10. Questo risultato evidenzia come, nonostante la pastorizzazione, la capacità di sopravvivenza e di adattamento della prima specie (dominante nel latte crudo) la rendano dominante anche nelle prime fasi di lavorazione del Pecorino Toscano. Sono stati isolati dal latte pastorizzato, anche alcuni ceppi di *E. faecalis*, la cui presenza può essere imputabile alla termoresistenza caratteristica di questa specie.

Le specie microbiche individuate nei campioni in cagliata a fine stufatura rappresentano la microflora che è stata in grado di svilupparsi, acidificando la cagliata, durante il tempo di stufatura. Come atteso, sono quindi i batteri lattici, presenti nel latte crudo che hanno resistito alla pastorizzazione e/o addizionati con l'innesto, che meglio si sono adattati alle condizioni previste dalla stufatura. Nei dieci campioni di cagliata a fine stufatura (fig. 3), come già osservato nei campioni di latte pastorizzato addizionato di starter, le due specie dominanti sono state *L. lactis* subsp. *lactis* (proveniente sia dal latte crudo che dallo starter) e *S. thermophilus* (derivante quasi esclusivamente dallo starter). Queste due specie dimostrano quindi di essere le più idonee all'acidificazione determinata dalle condizioni di stufatura della cagliata, che per il Pecorino Toscano corrispondono a 40-42°C. Da sottolineare come da una cagliata sia stata isolata, come specie minoritaria, anche *S. macedonicus*, ritrovata anche nel latte crudo. *S. macedonicus* è infatti un microrganismo proveniente dal latte crudo considerato termofilo ma con un range di crescita molto ampio (10-50°C), utilizzato nell'industria casearia per la produzione d'importanti composti aromatici e di recente interesse per la produzione di batteriocine che contrastano lo sviluppo di coliformi e stafilococchi nei formaggi (Settanni et al., 2011). *S. macedonicus*, a causa del basso potere acidificante, non è incluso nelle specie utilizzate per la produzione di starter primari, tuttavia, molti autori suggeriscono un possibile impiego di questa specie come starter secondario grazie alla presenza di elevate attività esterasiche e peptidolitiche, rispettivamente coinvolte nei processi di lipolisi e idrolisi dei peptidi, e quindi implicate nella liberazione di composti aromatici nel formaggio (Lombardi et al., 2004). Il ritrovamento quindi di queste specie nei nuovi isolamenti da

latte crudo e cagliata a fine stufatura potrebbe quindi permettere l'introduzione di questo ceppo autoctono nella preparazione dello starter a Pecorino Toscano. In alcune cagliate acidificate sono stati isolati ceppi appartenenti alle specie *E. italicus* e *E. faecalis*. La presenza e il significato tecnologico di queste specie al termine dell'acidificazione resta discutibile sebbene appaia limitata e poco frequente.

Caratterizzazione genetica e fenotipica di ceppi microbici appartenenti alla collezione

La seconda parte dello studio ha riguardato il confronto tra nuovi e vecchi isolati della collezione microbica appartenenti alle specie *S. thermophilus* e *L. lactis* subsp. *lactis*. Lo screening è stato condotto su 79 ceppi, 40 *L. lactis* e 39 *S. thermophilus*, valutando due aspetti: i) è stato valutato il polimorfismo genetico tramite la tecnica dell'Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), ii) è stata misurata, mediante analisi impedometrica, l'attività metabolica conseguente alla differente capacità dei ceppi studiati di svilupparsi in latte modificandone i composti che condizionano la conducibilità elettrica. Dallo studio del polimorfismo genetico, mediante la tecnica AFLP, sono stati individuati, per *S. thermophilus*, complessivamente 20 genotipi differenti diversi a fronte di 39 ceppi analizzati. In particolare, dal dendrogramma (fig. 4) si osserva la formazione di due grandi cluster, identificati dai numeri 1 e 2, che raggruppano la totalità dei ceppi.

Il gruppo 1 è formato da 6 genotipi differenti che raggruppano complessivamente 19 ceppi (49%) divisi in 3 clusters (a, b, c); 18 ceppi (95%) appartengono ai vecchi isolati mentre solamente 1 ceppo (5%) è di recente isolamento. Il cluster a e il cluster b sono i più numerosi (9 ceppi per entrambi) ma presentano genotipi non troppo differenti tra loro; il cluster c è formato da un unico ceppo. Il gruppo 2 è costituito da 13 genotipi composti, complessivamente, da 20 ceppi (divisi in 3 clusters d, e, f) ma, contrariamente a quanto osservato per il gruppo 1, 18 ceppi (90%) sono di recente isolamento mentre solamente due (10%) appartengono alla vecchia collezione del Consorzio. Il cluster più numeroso è il d formato da 16 ceppi (14 di recente isolamento e 2 della vecchia collezione), raggruppati in 9 genotipi mentre i clusters e ed f sono entrambi formati da due ceppi con genotipi differenti tutti di recente isolamento. È interessante notare che tra i 20 genotipi individuati, 12, appartenenti tutti alla nuova collezione, sono costituiti da un singolo ceppo. In figura 5 è riportato il dendrogramma relativo all'elaborazione dei profili gene-

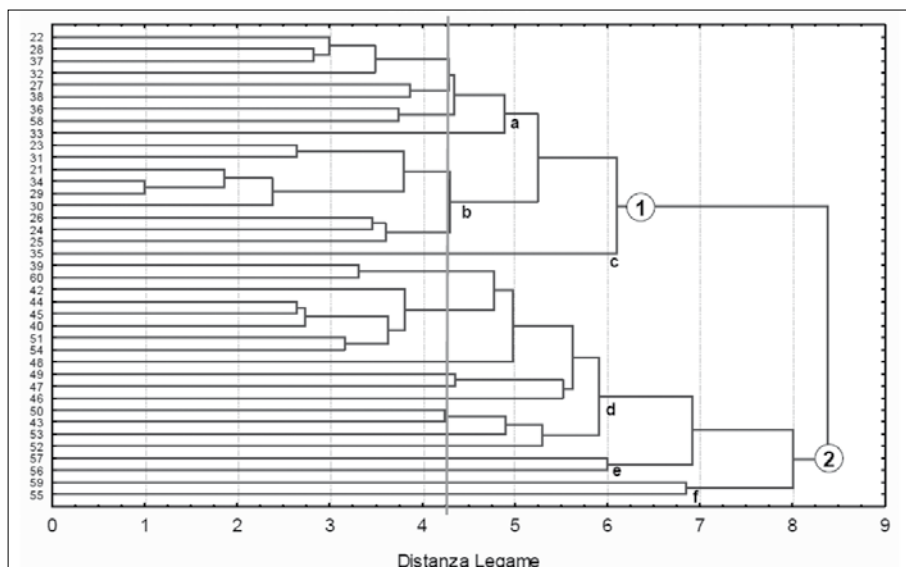


Fig. 4 Dendrogramma ottenuto dai profili elettroforetici AFLP per l'individuazione di genotipi all'interno degli isolati di «*S. thermophilus*»

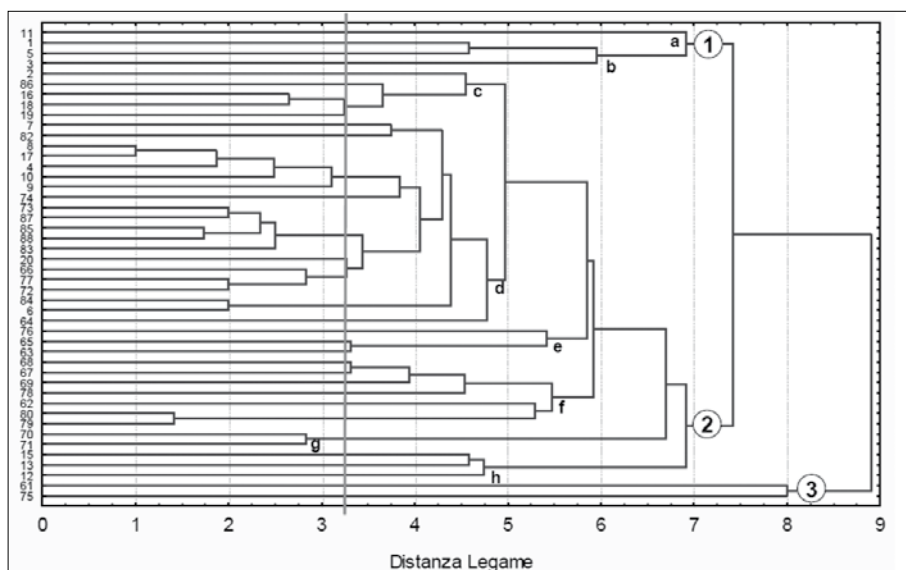


Fig. 5 Dendrogramma ottenuto dai profili elettroforetici AFLP per l'individuazione di genotipi all'interno degli isolati di «*L. lactis*»

tici dei ceppi di *L. lactis* subsp. *lactis* di vecchio e recente isolamento. Si può osservare la formazione di 3 gruppi, identificati come 1, 2 e 3. Il gruppo 1 è

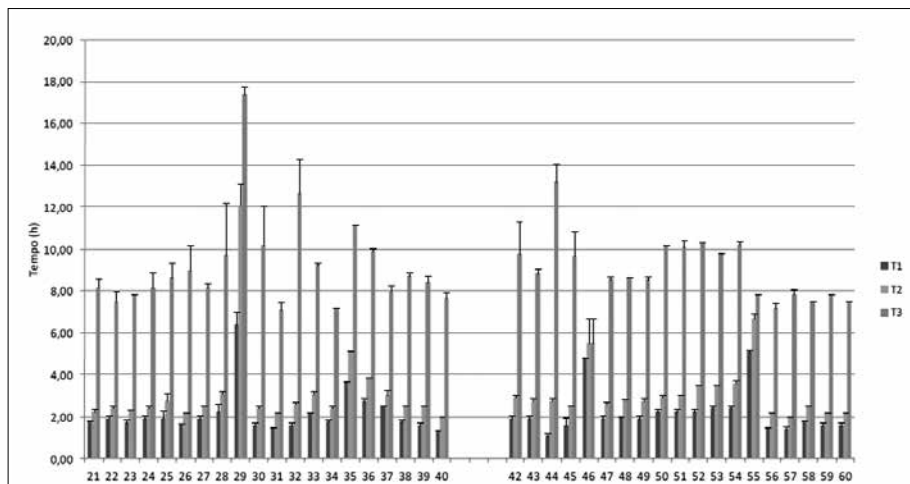


Fig. 6 Valori medi e relative deviazioni standard di T1, T2 e T3 per «*S. thermophilus*»

suddiviso a sua volta in 2 clusters: cluster a e b costituiti da 4 ceppi (8.7% del totale) tutti di vecchio isolamento, ognuno dei quali rappresenta un genotipo diverso. Il gruppo più rappresentativo è il gruppo 2 composto da 24 genotipi differenti suddivisi in 6 clusters (c, d, e, f, g, h). L'ultimo gruppo è il 3, composto da 2 ceppi recentemente isolati caratterizzati da un profilo genomico differente. Complessivamente, per quanto riguarda la specie *L. lactis* subsp. *lactis*, rispetto alla specie *S. thermophilus*, è stata quindi osservata una minore distinzione tra ceppi di recente e vecchio isolamento.

Per quanto riguarda la valutazione dell'attività metabolica in latte effettuata mediante tecnica impedometrica, il confronto dei parametri misurati (T1, T2, T3, T2-T3) tra i diversi ceppi ha evidenziato che la specie *L. lactis* subsp. *lactis* è caratterizzata da performance tecnologiche di acidificazione peggiori rispetto a quelle della specie *S. thermophilus*. Infatti i ceppi di *L. lactis* subsp. *lactis* non solo mostrano tempi di crescita significativamente maggiori ($p < 0,01$) rispetto a quelli impiegati da *S. thermophilus*, ma entrano anche più velocemente in fase stazionaria, quindi avranno la tendenza a lisarsi precocemente (fig. 5). Tale risultato conferma come la specie *S. thermophilus* abbia un ruolo prioritario nell'acidificazione del mezzo e riprova quanto riportato in letteratura (Mora et al., 2002). Nonostante la variabilità osservata, comparando per ciascuna specie, i ceppi di vecchio e recente isolamento, sono emerse tendenze diverse per la specie *S. thermophilus* e *L. lactis*. In particolare, i ceppi di *L. lactis* della vecchia collezione raggiungono in più breve tempo la massima velocità di crescita e presentano valori di T3 significativamen-

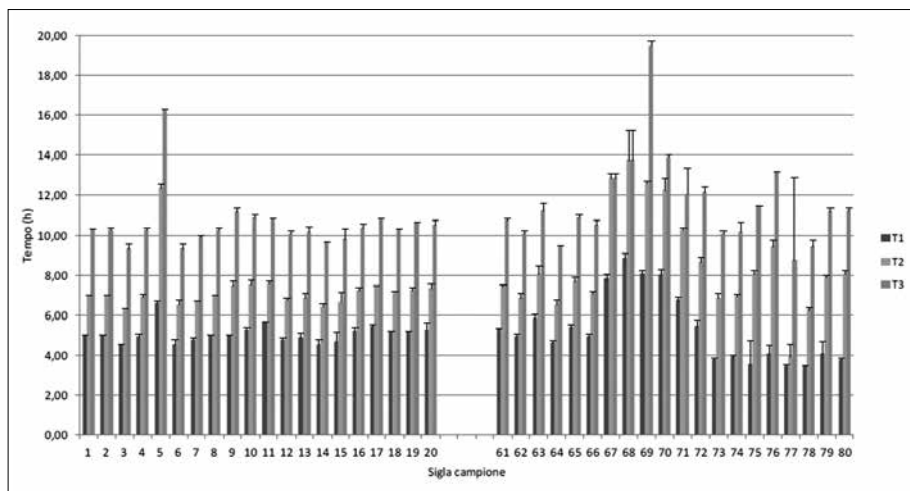


Fig. 7 Valori medi e relative deviazioni standard di T1, T2 e T3 per «*L. lactis*»

te inferiori rispetto a quelli della nuova collezione ($p < 0.05$). È interessante notare la presenza in entrambe le specie di ceppi con ottime performance di crescita in latte: ad esempio i ceppi di *S. thermophilus* 44, 30 e 32 entrano in fase esponenziale (T1) mediamente in 1,42 h, arrivano alla massima velocità di crescita (T2) dopo 2,59 h e raggiungono la fase stazionaria (T3) in un intervallo di tempo molto ampio (mediamente in 9,45 h); i ceppi di *L. lactis* 77 e 78 entrano in fase esponenziale (T1) mediamente in 3,46 h, arrivano alla massima velocità di crescita (T2) dopo 5,00 h e raggiungono la fase stazionaria (T3) mediamente in 4,00 h. Tali caratteristiche rendono questi ceppi molto interessanti al fine di essere selezionati come starter da utilizzare nella preparazione del Pecorino Toscano DOP.

CONCLUSIONI

I microrganismi caratteristici di un ecosistema ambientale-produttivo si possono trasferire nel latte e, a tutti gli effetti, possono rappresentare un anello di congiunzione tra prodotto e territorio di produzione. In tal senso, la salvaguardia e la valorizzazione di questo patrimonio biologico è da ritenere di notevole importanza al fine di preservare e valorizzare gli elementi qualitativi e tipici del formaggio Pecorino Toscano DOP. A tale fine da più di 20 anni è in corso un progetto di studio e raccolta della microflora lattica “autoctona” del Pecorino Toscano.

I microrganismi dello starter e quelli del latte crudo, residuali al trattamento termico, rappresentano il microbiota del formaggio Pecorino Toscano. Tale microflora, si evolve durante il processo produttivo, e in particolare solo alcuni dei biotipi presenti nell'ambiente di produzione sono in grado di adattarsi alla selezione tecnologica indotta dai parametri di processo e divenire dominanti nel formaggio. Questa popolazione si può evolvere nel corso degli anni poiché le innovazioni tecnologiche introdotte nei caseifici portano a una modificazione dei processi di selezione microbica. In collaborazione con il Consorzio di tutela Pecorino Toscano e la Provincia di Grosseto, è stato condotto un ampio studio per caratterizzare la collezione microbica utilizzata per la preparazione dello starter e per valutare se e come questa microflora autoctona fosse cambiata nel corso degli anni. Attraverso un approccio polifasico sono stati valutati caratteri metabolici e genetici di numerosi biotipi batterici caratteristici. Due specie sono risultate dominanti: *Streptococcus thermophilus* e *Lactococcus lactis*. Mediante tecnica AFLP è stato possibile differenziare i ceppi della vecchia e della nuova collezione, confermando che la microflora continua a evolversi nel tempo. L'elevata variabilità genetica osservata può essere sfruttata come potenzialità nella preparazione di starter, utilizzando, in rotazione, genotipi differenti con simili performance tecnologiche, al fine di ridurre il rischio di infezione fagica. L'analisi impedometrica, per valutare l'attività metabolica dei ceppi, è risultata un metodo efficace, ripetibile, poco costoso e adatto a testare numeri elevati di ceppi e può essere impiegato anche per l'analisi di miscele costituite da più ceppi.

Questo studio ha quindi permesso di ampliare le conoscenze sui ceppi che vengono utilizzati come starter per la produzione del Pecorino Toscano DOP. Vista l'importanza che gli starter rivestono nella trasformazione casearia, in particolare nel regolare, a seguito dell'acidificazione, i processi di coagulazione del latte, di spurgo della cagliata e di maturazione della pasta, conoscere la biodiversità presente tra i ceppi, in termini diversità genotipica e di attitudine tecnologica, è un primo passo per selezionare i ceppi più idonei al fine di creare starter sempre più performanti che siano in grado di migliorare le caratteristiche finali del Pecorino Toscano DOP.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano Il Consorzio per la tutela del Pecorino Toscano DOP e la Provincia di Grosseto per aver supportato la ricerca in oggetto.

RIASSUNTO

Il Pecorino Toscano DOP, uno dei formaggi tipici della tradizione casearia italiana, è prodotto con latte di pecora pastorizzato e prevede, secondo quanto riportato nel Disciplinare di Produzione, l'utilizzo di un innesto autoctono. A tal fine, a partire dagli anni '90, è stata allestita una collezione microbica, costituita da ceppi isolati durante le diverse fasi dal processo di produzione, prevalentemente appartenenti alle specie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus*. Questo progetto si è posto lo scopo di ampliare la collezione microbica del Pecorino Toscano e di confrontare le caratteristiche genetiche e metaboliche dei ceppi di *S. thermophilus* e *L. lactis* appartenenti alla vecchia (1998) e alla nuova collezione.

ABSTRACT

Pecorino Toscano cheese is a PDO Italian cheese manufactured with pasteurized ewe milk added with an autochthonous starter cultures. To this end, a microbial collection, mainly composed by strains belonging to the species *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *S. thermophilus*, was set up since the 90's. The aim of this project was to extend the microbial collection of Pecorino Toscano and to compare, following a genotypic and phenotypic characterization, the genetic biodiversity and the metabolic attitudes of new and old strains of *S. thermophilus* and *L. lactis* subsp. *lactis*.

BIBLIOGRAFIA

- FORTINA M.G., RICCI G., MORA D., MANACHINI P.L. (2004): *Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals Enterococcus italicus sp. nov.*, «International Journal of Evolutionary Microbiology», 54, pp. 1717-1721.
- GATTI M., NEVIANI E. (1993): *Studio dei sieroinnesti naturali per Grana mediante la tecnica conduttimetria*, «L'industria del latte», 29, pp. 3-23.
- LAZZI C., BOVE C. G., SGARBI E., GATTI M., LA GIOIA F., TORRIANI S., NEVIANI E. (2009): *Application of AFLP fingerprint analysis for studying the biodiversity of Streptococcus thermophilus*, «Journal of Microbiological Methods», 79 pp. 48-54.
- LOMBARDI A., GATTI M., RIZZOTTI L., TORRIANI S., ANDRIGHETTO C., GIRAFFA G. (2004): *Characterization of Streptococcus macedonicus strains isolated from artisanal Italian raw milk cheeses*, «International Dairy Journal», 14 pp. 967-976.
- MANCINI A., LAZZI C., BERNINI V., NEVIANI E., GATTI M. (2012): *Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP*, «Journal of Microbiological Methods», 91, pp. 380-390.
- MORA D., FORTINA M. G., PARINI C., RICCI G., GATTI M., GIRAFFA G., MANACHINI P. L. (2002): *Genetic diversity and technological properties of Streptococcus thermophilus strains isolated from dairy products*, «Journal of Applied Microbiology», 93, pp. 278-287.
- MUCCHETTI G., GATTI M., NEVIANI E. (1993): *Electrical conductivity changes in milk caused by acidification: determining factors*, «Journal of Dairy Science», 77, pp. 940-944.

- MUCCHETTI G., NEVIANI E. (2006): *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza*, Tecniche Nuove Editore, Milano.
- NEVIANI, E., BIZZARRO, R., RIGHINI, A., MUCCHETTI, G. (1998): *Pecorino toscano DOP: tecniche di produzione e caratteristiche microbiologiche*, «Industria del Latte», 34 pp. 3-35.
- QUIGLEY L., O'SULLIVAN O., STANTON C., BERESFORD T.P., ROSS R.P, FITZGERALD G.F., COTTER P.D. (2013): *The complex microbiota of raw milk*, «FEMS Microbiology Reviews», 37, pp. 664-698.
- SETTANNI L., MOSCHETTI G. (2010): *Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits*, «Food Microbiology», 27, pp. 691-697.