REGIONE ABRUZZO

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Il Pecorino di Farindola

Indagine fisica, chimica e microbiologica. Riferimenti di territorialità

Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale: l'Europa investe nelle zone rurali

P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 – Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale"

Progetto PecoPlus

"Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola"

© 2018 Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"
Campo Boario, 64100 Teramo - Italia

2° edizione pre-print

Progetto Editoriale:
Comunicazione Istituzionale - IZSAM

Hanno collaborato:
Paolo Boni
Paola Di Giuseppe
Alessandra Fraticelli
Manuel Graziani
Guido Mosca
Alessandro Pavone
Claudia Rasola
Fausta Roselli

Volume realizzato a cura di Guido Mosca

Foto:
Archivio IZSAM
Giacomo Migliorati
Guido Mosca

INDICE

Introduzione
Il Pecorino di Farindola tra passato, presente e futuro ..... pag. 9

Presentazione
Il Progetto PecoPlus ..... » 11

Studio I
Studio del processo di produzione del Pecorino di Farindola

Introduzione ..... » 13
Materiali e metodi ..... » 13
Aziende ..... » 13
Sopralluoghi e interviste ..... » 13
Risultati ..... » 14
Processo di produzione del Pecorino di Farindola ..... » 14
Processo di produzione del caglio ..... » 16
Discussione ..... » 16
Conclusioni ..... » 16
Bibliografia ..... » 16

Studio II
Studio chimico-fisico e microbiologico del Pecorino di Farindola

Introduzione ..... » 21
Materiali e metodi ..... » 22
Campionamento ..... » 22
Analisi di laboratorio ..... » 22
Analisi di statistica ..... » 23
Risultati ..... » 23
Rilevamento dei parametri chimico-fisici e microbiologici durante il processo di produzione ..... » 23
Determinazione del pH ..... » 23
Determinazione dell'a_w ..... » 23
Carica batterica mesofila (CBM) ..... » 23
Numerazione Enterobacteriaceae ..... » 24
Numerazione Enterococchi ..... » 24
Numerazione Lattobacilli ..... » 25
Numerazione Lattococchi ..... » 26
Numerazione Micrococcaceae ..... » 27
Numerazione di muffe e lieviti ..... » 27
Numerazione di stafilococchi coagulasi positivi (SCP) ..... » 27
Analisi statistica ..... » 27
Rilevamento dei parametri chimico-fisici e microbiologici del prodotto in vendita ..... » 29
Determinazione pH ..... » 30
Determinazione a_w ..... » 30
Carica batterica mesofila ..... » 31
Numerazione Enterobacteriaceae ..... » 31
Numerazione Enterococchi ..... » 31
Numerazione Lattobacilli ..... » 32
Numerazione Lattococchi ..... » 33
Numerazione Micrococcaceae ..... » 33
Numerazione muffe e lieviti ..... » 33
Analisi statistica ..... » 33
Discussione ..... » 33
Conclusioni ..... » 38
Bibliografia ..... » 38

Studio III

Caratterizzazione della flora autoctona del Pecorino di Farindola

Introduzione ..... pag. 41
Materiali e metodi ..... » 42
Ceppi batterici ..... » 42
Estrazione del DNA ..... » 42
Identificazione dei ceppi batterici ..... » 42
Rilevazione di geni codificati per batteriocine e ammine biogene ..... » 43
Rep PCR per lo studio di popolazioni batteriche ..... » 44
Risultati ..... » 44
Caratterizzazione dei LAB isolati dalla produzione sperimentale di pecorino ..... » 46
Discussioni ..... » 47
Conclusioni ..... » 51
Bibliografia ..... » 52

Studio IV

Valutazione delle caratteristiche probiotiche della flora latticadel Pecorino di Farindola

Introduzione ..... » 53
Materiali e metodi ..... » 54
Ceppi batterici ..... » 54
Resistenza a pH acidi ..... » 54
Resistenza alla bile ..... » 54
Test di adesione su colture cellulari ..... » 54
Produzione in vitro di batteriocine mediante Deferred Antagonism Test ..... » 55
Risultati ..... » 56
Discussione ..... » 57
Conclusioni ..... » 58
Bibliografia ..... » 58

Studio V

Studio di Challenge test su *Escherichia Coli* O157, *Listeria Monocytogenes, Salmonella Typhimurium* e *Staphilococcus Aureus* in Pecorino di Farindola

Introduzione ..... » 60
Materiali e metodi ..... » 62
Materia prima ..... » 62
Processo produttivo ..... » 62
Ceppi batterici e preparazione all'inoculo ..... » 62
Campionamento e determinazioni analitiche ..... » 63
Calcolo del potenziale di crescita (δ) ..... » 63
Risultati ..... » 63
Lotti di controllo ..... » 63
Determinazione attività dell'acqua (a_w) ..... » 63
Determinazione pH ..... » 63
Carica batterica mesofila (CBM) ..... » 65
Numerazione Enterobacteriaceae ..... » 65
Numerazione Enterococchi ..... » 65
Numerazione Lattobacilli ..... » 65
Numerazione Lattococchi ..... » 65
Numerazione Micrococcaceae ..... » 66
Numerazione di muffe e lieviti ..... » 66
Numerazione di stafilococchi coagulasi positivi ..... » 67

Lotti di contaminati ..... pag. 67
Numerazione Escherichia coli O157 ..... » 68
Numerazione Listeria monocytogenes ..... » 69
Numerazione Staphylococcus aureus ..... » 69
Potenziale di crescita ..... » 69
Discussione ..... » 71
Conclusioni ..... » 72
Bibliografia ..... » 72

Studio VI

Pecorino di Farindola prodotto in laboratorio: capacità dei probiotici di inibire la crescita di *Escherichia Coli O157* e *Listeria Monocytogenes*

Introduzione ..... » 75
Materiali e metodi ..... » 76
Produzione formaggio ..... » 76
Ceppi batterici e preparazione dell'inoculo ..... » 76
Modalità di contaminazione ..... » 76
Campionamento e determinazioni analitiche ..... » 77
Risultati ..... » 77
Determinazione attività dell'acqua (a_w) ..... » 77
Determinazione pH ..... » 77
Numerazione Enterococchi ..... » 77
Numerazione Lattobacilli ..... » 79
Numerazione Lattococchi ..... » 80
Numerazione stafilococchi coagulasi positivi ..... » 80
Numerazione Escherichia coli O157 ..... » 80
Numerazione Listeria monocytogenes ..... » 82
Discussione ..... » 82
Conclusioni ..... » 83
Bibliografia ..... » 83

Studio VII

Caratteristiche chimiche e valore nutrizionale del Pecorino di Farindola

Introduzione ..... » 85
Materiali e metodi ..... » 86
Proteine, grassi, umidità e sale ..... » 86
Acidi grassi saturi, monoinsaturi e polisaturi ..... » 86
Aminoacidi liberi ..... » 88
Zuccheri ..... » 89
Elementi ..... » 90
Risultati ..... » 92
Grassi, proteine, umidità e sale ..... » 92
Acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi ..... » 92
Aminoacidi liberi ..... » 92
Zuccheri ..... » 94
Elementi ..... » 94
Discussione ..... » 95
Grassi, proteine, umidità e sale ..... » 95
Acidi grassi saturi, monoinsaturi e polinsaturi ..... » 95
Aminoacidi liberi ..... » 96
Zuccheri ..... » 96
Elementi ..... » 96
Conclusioni ..... » 96
Bibliografia ..... » 97

Studio VIII

Censimento e georeferenziazione delle essenze vegetali nelle aree a pascolo impiegate per la produzione di latte ovino destinato alla caseificazione del Pecorino di Farindola

Introduzione ..... pag. 101
Materiali e metodi ..... » 101
Risultati ..... » 102
Azienda 1 ..... » 103
Azienda 2 ..... » 104
Azienda 3 ..... » 107
Discussione ..... » 107
Conclusioni ..... » 109
Bibliografia ..... » 109

Studio IX

Caratterizzazione sensoriale di campioni di Pecorino di Farindola mediante Analisi Descrittiva Quantitativa (QDA)

Introduzione ..... » 111
Materiali e metodi ..... » 112
Campionamento ..... » 112
Analisi descrittiva quantitativa ..... » 112
Valutazione ..... » 112
Risultati ..... » 113
Discussione ..... » 114
Conclusioni ..... » 118
Bibliografia ..... » 118

Studio X

Misura del rapporto isotopico dello stronzio mediante Spettrometria di Massa a Ionizzazione Termica (TIMS) per la tracciabilità del Pecorino di Farindola

Introduzione ..... » 120
Materiali e metodi ..... » 122
Origine e selezione dei campioni ..... » 122
Preparazione dei campioni di pecorino ..... » 122
Indagine preliminare sul legame prodotto-territorio ..... » 123
Spettrometria di massa ..... » 123
Risultati ..... » 124
Discussione ..... » 124
Conclusioni ..... » 125
Bibliografia ..... » 125

Studio XI

Riconoscimento del Pecorino di Farindola con approccio di tipo "Untargeted" mediante spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ad Alta Risoluzione del Protone (^{1}H HR-NMR)

Introduzione ..... » 129
Materiali e metodi ..... » 130
Piano di Campionamento ..... » 130
Analisi NMR ..... » 130
Analisi Statistica Multivariata ..... » 131

Risultati ..... pag. 132
Analisi NMR ..... » 132
Analisi Statistica Multivariata ..... » 132
Discussione ..... » 134
Conclusioni ..... » 135
Bibliografia ..... » 135

Conclusioni generali

Conclusioni generali ..... » 137

FoodAbruzzo: il sistema informativo per la catalogazione, caratterizzazione e valorizzazione dei prodotti agroalimentari tipici regionali

Cos'è FoodAbruzzo? ..... » 139
La struttura di FoodAbruzzo ..... » 140
FoodAbruzzo e PecoPlus ..... » 140

Il Pecorino di Farindola tra passato, presente e futuro

Nel I sec. d. C. Farindola e altri comuni dell'area vestina erano "agri" di *Pinna Vestinorum*, l'attuale Penne in provincia di Pescara. Piccoli nuclei di abitazioni di pastori e montanari, sparsi tra le fitte selve ai piedi della catena del Gran Sasso. Roma in quel periodo storico era al massimo del suo splendore imperiale con i cronisti dell'epoca che si occupavano anche di usi e costumi da tramandare, tra cui il *caseus vestinus* (formaggio vestino). Apicio lo cita come ingrediente di una "salsa in tazza" da lui creata; Marziale lo elegge a sostituto della carne: *"se vuoi fare una frugale colazione senza carne, ecco per te una forma di formaggio delle greggi vestine"*; Plinio il Vecchio ne parla come uno dei più prelibati formaggi sulla tavola dell'imperatore e dei ricchi romani. Ciò fa intendere che il formaggio non solo era fonte di sostentamento dei pastori, ma anche merce pregiata negli scambi economici.
L'allevamento degli ovini è sempre stata una costante nella vita economica di questo territorio, insieme ai suini. Sarà per questo stretto connubio tra specie animali che la preparazione del Pecorino di Farindola si realizza impiegando il caglio ricavato dallo stomaco dei suini adulti. Pecore e maiali godono della grande varietà di erbe e piante di questi luoghi, favorite da un clima particolare, con il mare che addolcisce la precoce primavera e mitiga i rigidi inverni.
In questa ricostruzione merita una menzione il sistema delle "stinzie" veri insediamenti pastorali estivi della Valle d'Angri che videro la luce nei primi anni del 1800. Erano piccole costruzioni in pietra e legno dove oltre alla coltivazione del mais rotondo e delle patate rosse, era molto importante l'attività casearia come dimostra il ritrovamento di nicchie scavate nella roccia per la conservazione del pecorino. La grande varietà botanica della Valle d'Angri, unita alla presenza di acqua, ne faceva un luogo privilegiato per l'ottenimento di un pecorino di grande qualità.
Fino agli anni Trenta del secolo scorso, era comune allevare gli ovini in piccoli nuclei familiari utilizzando il pascolo tutto l'anno, in particolare, nella tarda primavera e in estate, quello delle zone montane, in autunno e primo inverno, quello presente più in basso. Il formaggio si faceva in primavera con tanta erba fresca. Il ricovero invernale degli animali prevedeva l'utilizzo delle stalle anche in paese. La disponibilità per i farindolesi dei pascoli pubblici facilitava l'allevamento delle pecore e, di conseguenza, la produzione di formaggio. Il mercato del pecorino era più rilevante rispetto alle zone limitrofe. Questa "prevalenza di mercato", come si dice oggi, ha fatto in modo che Farindola si identificasse con il luogo simbolo della produzione del pecorino fatto con il caglio di maiale, tipico di tutta la zona vestina. L'importanza economica del prodotto durò fino agli anni Sessanta, quando iniziarono i flussi di emigrazione dalle campagne verso l'estero e il Nord Italia. Con il decadimento della civiltà contadina la produzione divenne poco remunerativa e troppo impegnativa: per fare il pecorino, infatti, oltre ad accudire le pecore, c'era il duro lavoro della mungitura a mano.
Si arrivò così agli anni Ottanta con la produzione di Pecorino destinata esclusivamente all'autoconsumo e al ristretto mercato locale. In questo periodo nessuno poteva immaginare che a 700 chilometri da Farindola un gruppo di persone decidesse di costituire una associazione, Slow Food (allora Arcigola), che contro la moda imperante del fast-food, si proponesse di rivalutare la grande tradizione alimentare e la civiltà del cibo, e che tale associazione sarebbe stata la salvezza del Pecorino di Farindola.
Dopo la Ventricina Vastese e la Mortadella di Campotosto, nel 2001 Slow Food, Parco Nazionale Gran Sasso e Monti della Laga, ARSA e Comune di Farindola costituirono il Presidio del Pecorino di Farindola. Il primo atto fu quello di riconoscere come territorio di origine del prodotto

tutta l'area vestina, estendendo i confini ad alcune zone nella limitrofa provincia di Teramo, storicamente e geograficamente univoca con il versante pescarese.
La considerazione e l'esaltazione del ruolo del contadino produttore di cibo fu la chiave di volta di un nuovo atteggiamento verso la propria condizione di vita, un incoraggiamento a continuare con nuove prospettive su una strada che avrebbe portato a sbocchi positivi. I lusinghieri risultati raggiunti stimolarono i responsabili del Presidio a proporre un passo successivo: la costituzione di un consorzio di tutela e valorizzazione. La proposta trovò subito l'approvazione del Parco Nazionale Gran Sasso e Monti della Laga. Con queste premesse, nell'ottobre del 2002 venne stilato lo statuto del Consorzio di Tutela del Pecorino di Farindola con la firma dei rappresentanti dei nove Comuni, del Presidente del Parco citato e di alcuni produttori come soci fondatori.
Da lì in poi la notorietà del Pecorino di Farindola si è incrementata sempre più, sono aumentate le richieste e, di conseguenza, il suo mercato. Anno dopo anno si sono avvertiti gli effetti positivi sull'economia rurale. Alcuni contadini che da tempo non producevano più formaggio ma solo agnelli da carne, tornarono a mungere le loro pecore. Si invertì la cronica diminuzione dei capi allevati e si aprì uno spiraglio di economia positiva per i contadini produttori.
Il punto più elevato del grande lavoro di valorizzazione svolto è risultato senz'altro l'obiettivo di far rappresentare al Pecorino di Farindola la tipicità alimentare dei Parchi Abruzzesi in Casa Italia, sede ufficiale del Comitato Olimpico Nazionale delle Olimpiadi di Atene 2004.
L'idea alla base della "Operazione Pecorino di Farindola" è stata, senz'altro, la valorizzazione del "particolare" per sviluppare nel complesso le potenzialità del territorio di pertinenza, coinvolgendo tutte le attività legate allo sviluppo sostenibile: agricoltura, ambiente e turismo.
Cosa si può fare di più oggi di quanto è stato fatto? Intanto si può, e si deve, incrementare ulteriormente la produzione di pecorino rilanciando l'allevamento degli ovini. Questo incremento può essere incentivato se ci si pone l'obiettivo di valorizzare la pecora per la produzione di agnelli e arrosticini di qualità. La creazione di un consorzio per la produzione di agnelli locali con la loro identificazione e tracciabilità fino al banco vendita delle carni potrebbe rappresentare una strategia decisiva per il rilancio zootecnico degli ovini, garantendo al consumatore qualità e sicurezza del prodotto e all'allevatore il giusto prezzo.
L'impegno è quello di ripetere l'esperienza positiva ed encomiabile del Consorzio di Tutela del Pecorino di Farindola, estendendola ai prodotti citati, facendo riferimento ad un'area di eccellenza, per produzioni di qualità. Da non dimenticare, inoltre, che l'area di produzione del Pecorino di Farindola e buona parte dell'Area Vestina ricadono nel perimetro del Parco Nazionale del Gran Sasso e Monti della Laga, questo aspetto rappresenta assolutamente e indiscutibilmente un ulteriore valore aggiunto per lo sviluppo dei relativi prodotti e, quindi, del territorio. L'obiettivo principale è di effettuare una promozione unica dei prodotti del Parco, concentrando sinergicamente tutte le valenze positive per una commercializzazione globale di qualità che vada a vantaggio dei consumatori e degli stessi produttori.
Per attuare questo piano di sviluppo, ovvero per promuovere e tutelare i prodotti tipici abruzzesi realizzati nel rispetto della tradizione, è fondamentale il coinvolgimento attivo degli enti amministrativi, in particolare della Regione Abruzzo. Il Pecorino di Farindola, pur essendo un prodotto già "riconosciuto", ha urgente bisogno del riconoscimento formale e ufficiale della Regione Abruzzo. Solo con questa azione sarà possibile salvaguardare il nome e la tipicità del suo processo produttivo, che devono entrare di diritto nel patrimonio legislativo della Regione Abruzzo. Tale riconoscimento formale oltre ad essere un'azione di fiducia verso tutti i produttori sarebbe una leva motivazionale che, estesa ad altre realtà consortili abruzzesi, configurerebbe una scelta concreta di agricoltura di qualità nella "Regione Verde d'Europa": l'Abruzzo.

Presidente
"Consorzio di Tutela del Pecorino di Farindola"
Dott. Ugo Ciavattella

Il Progetto PecoPlus

Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale.
La Misura si propone di sostenere lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nel settore agricolo, alimentare e forestale anche per rafforzare i rapporti tra le imprese del settore primario, industria di trasformazione e mondo della ricerca, al fine di promuovere la modernizzazione, l'innovazione tecnologica e l'integrazione lungo le filiere.
Il progetto ha riguardato un prodotto a forte valenza territoriale: il Pecorino di Farindola che è un formaggio unico nel patrimonio caseario abruzzese anche per la presenza delle condizioni ideali per verificare l'applicabilità di un sistema di documentazione scientifica sull'identità del prodotto. Il formaggio è stato sottoposto ad una serie di studi per valutare: modalità di produzione, caratteristiche intrinseche (chimiche, fisiche, microbiologiche, organolettiche), potenziale nutrizionale, sicurezza alimentare e legame con il territorio.

Il progetto ha avuto inizio con l'acquisizione dei dati sul processo di produzione mediante l'esecuzione di sopralluoghi e interviste a 10 produttori aderenti al relativo Consorzio di Tutela. Lo studio ha avuto l'obiettivo di acquisire informazioni dettagliate e rappresentative su caratteristiche del prodotto, lavorazione e caglio suino impiegato. Informazioni necessarie anche per la riproduzione in laboratorio della lavorazione del formaggio e indispensabili per l'esecuzione di challenge test di contaminazione artificiale con microrganismi patogeni per il consumatore.
L'indagine è proseguita con la rilevazione dei parametri chimico-fisici e della flora microbica autoctona di maggior interesse per la caseificazione durante il processo di produzione. Pertanto, per lo studio sono state selezionate 3 aziende, rappresentative della stragrande maggioranza della produzione del Consorzio, in cui sono state effettuate, con frequenze prestabilite, analisi per rilevare le variazioni dei parametri e delle popolazioni microbiche durante il processo di produzione e stagionatura. Lo studio è stato integrato con la determinazione degli stessi parametri su campioni di formaggio posti in vendita nella casera consortile.
I microrganismi selezionati sono stati ulteriormente valutati sperimentalmente in uno studio che ha avuto lo scopo di verificare la loro effettiva azione probiotica rilevando le capacità antibatteriche, di sopravvivenza alla barriera gastrica e di adesione alle cellule intestinali.
Le popolazioni microbiche del Pecorino di Farindola sono state, in seguito, identificate e caratterizzate geneticamente mediante tecniche analitiche tradizionali e innovative. Sono stati selezionati enterococchi, lattobacilli e lattococchi, isolati in tutte le fasi di lavorazione, in grado di conferire al prodotto elementi di funzionalità e protezione. Questi microrganismi sono stati valutati in relazione alle loro potenzialità patogenetiche e probiotiche. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto e per migliorare la sicurezza alimentare del prodotto, sono stati selezionati ceppi batterici da impiegare come innesti in produzioni sperimentali di pecorino con l'obiettivo di ottenere un prodotto "fortificato" ancora migliore.
In un ulteriore studio, in formaggi preparati in laboratorio secondo il processo di produzione del Pecorino di Farindola, è stata verificata la capacità di due ceppi di *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, isolati nel lavoro precedente, di contrastare lo sviluppo e la sopravvivenza di microrganismi patogeni.
Di questi ultimi, *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157, *Salmonella tiphymurium e*

Staphylococcus aureus, che frequentemente contaminano i formaggi e in grado di determinare malattia nell'uomo, sono stati impiegati in un ulteriore studio che ha previsto l'esecuzione di challenge test microbiologici per verificarne la sopravvivenza e/o la proliferazione nel corso del processo produttivo e della successiva shelf-life.
Per approfondire ulteriormente le conoscenze su questo formaggio, il progetto ha previsto uno studio per delineare il valore nutrizionale del Pecorino di Farindola mediante la valutazione di componenti come: proteine, grassi, sale, acidi grassi, amminoacidi liberi, zuccheri ed elementi. Ulteriore obiettivo è stato quello di confrontare i risultati ottenuti, integrati con le conoscenze scientifiche attualmente disponibili, con quelli di altri pecorini per verificare eventuali aspetti peculiari del Pecorino di Farindola in grado di distinguerlo da altri pecorini. Questa esigenza ha guidato lo studio basato sulla spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare ad Alta Risoluzione del Protone abbinata all'analisi statistica multivariata per costruire un modello di classificazione pilota in grado di dimostrare l'appartenenza del prodotto al territorio di origine. Per caratterizzare geograficamente il prodotto è stato anche effettuato uno studio basato sui rapporti isotopici $^{87}Sr/Sr^{86}$. Ambedue gli studi hanno previsto analisi su pecorini provenienti da diversi territori italiani.
Vista l'importanza del latte come matrice primaria, è stato realizzato uno studio con l'obiettivo di rilevare le principali essenze foraggere e i loro livelli di abbondanza nelle zone di pascolo per verificare la presenza di specie botaniche caratteristiche, capaci di influenzare la composizione chimica del formaggio e il profilo sensoriale.
Aspetto, quest'ultimo, preso in esame nello studio che ha avuto il fine di identificare gli eventuali attributi che meglio contribuiscono alla caratterizzazione del Pecorino di Farindola. Nello studio si è voluto verificare l'esistenza di differenze sensoriali apprezzabili tra i formaggi prodotti dalle tre diverse aziende considerate, tali da renderli distinguibili. Sono state anche ricercate eventuali percezioni odorose o aromatiche da poter associare alle essenze foraggere dei pascoli del territorio di origine.

Le caratteristiche di identità e qualità, la tracciabilità e la sicurezza alimentare sviluppate e documentate nel corso degli studi effettuati sono state inserite nel sistema informativo "FoodAbruzzo". Sistema di riferimento per coloro che intendono avvalersi di tali conoscenze per commercializzare o acquistare il prodotto, orientando operatori commerciali e consumatori nella scelta consapevole dei prodotti tipici. Sistema per promuovere e valorizzare le numerose eccellenza alimentari abruzzesi.

Studio del processo di produzione del Pecorino di Farindola

Diana Neri, Gino Angelo Santarelli, Gabriella Centorotola, Federica De Berardinis, Violeta Di Marzio, Luigi Iannetti, Francesco Pomilio, Romina Romantini, Anna Franca Sperandii, Patrizia Tucci, Giacomo Migliorati

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, 64100 Teramo - Italia
* Corrispondenza: Diana Neri, d.neri@izs.it

Parole chiave
Azienda,
Caglio,
Commercializzazione,
Intervista,
Latte,
Pecorino di Farindola,
Processo di produzione.

Riassunto
Lo studio ha previsto l'acquisizione di dati sul processo di produzione del Pecorino di Farindola mediante l'esecuzione di sopralluoghi e interviste a 10 produttori aderenti al relativo Consorzio di Tutela. I dati sono stati raccolti in una scheda appositamente predisposta. È stato rilevato che le aziende commercializzano il Pecorino di Farindola dopo almeno 90 giorni di stagionatura con un mercato di riferimento provinciale/regionale e, in pochissimi casi, nazionale/internazionale. Il processo di produzione è risultato artigianale e tradizionale con impiego costante di caglio suino prodotto dalle stesse aziende. È stata rilevata un'apprezzabile variabilità interaziendale che ha permesso, comunque, di definire le fasi principali comuni del processo produttivo sia del Pecorino di Farindola che del caglio suino impiegato.

Introduzione

Il Pecorino di Farindola viene prodotto secondo un processo artigianale e tradizionale arricchito da variabili che non ne compromettono la tipicità. Le sue particolari caratteristiche organolettiche sono dovute proprio alle consuetudini tramandate, all'unicità dell'ambiente di produzione e all'impiego di caglio suino prodotto dalle stesse aziende. Caglio, il cui utilizzo a livello industriale non è praticabile a causa della sua instabilità e del ristretto intervallo di pH in cui agisce (1, 2). La valorizzazione del Pecorino di Farindola non può prescindere da una sua adeguata riconoscibilità da parte del consumatore. Lo studio ha avuto, quindi, l'obiettivo, nonostante le inevitabili variabili interaziendali, di contribuire alle informazioni sulle sue caratteristiche, raccogliendo, in particolare, dati sul processo di produzione e sul caglio suino impiegato. Informazioni necessarie anche per le simulazioni in laboratorio e l'esecuzione di challenge test di contaminazione artificiale, previsti dalla normativa in vigore sulla sicurezza alimentare. Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Aziende

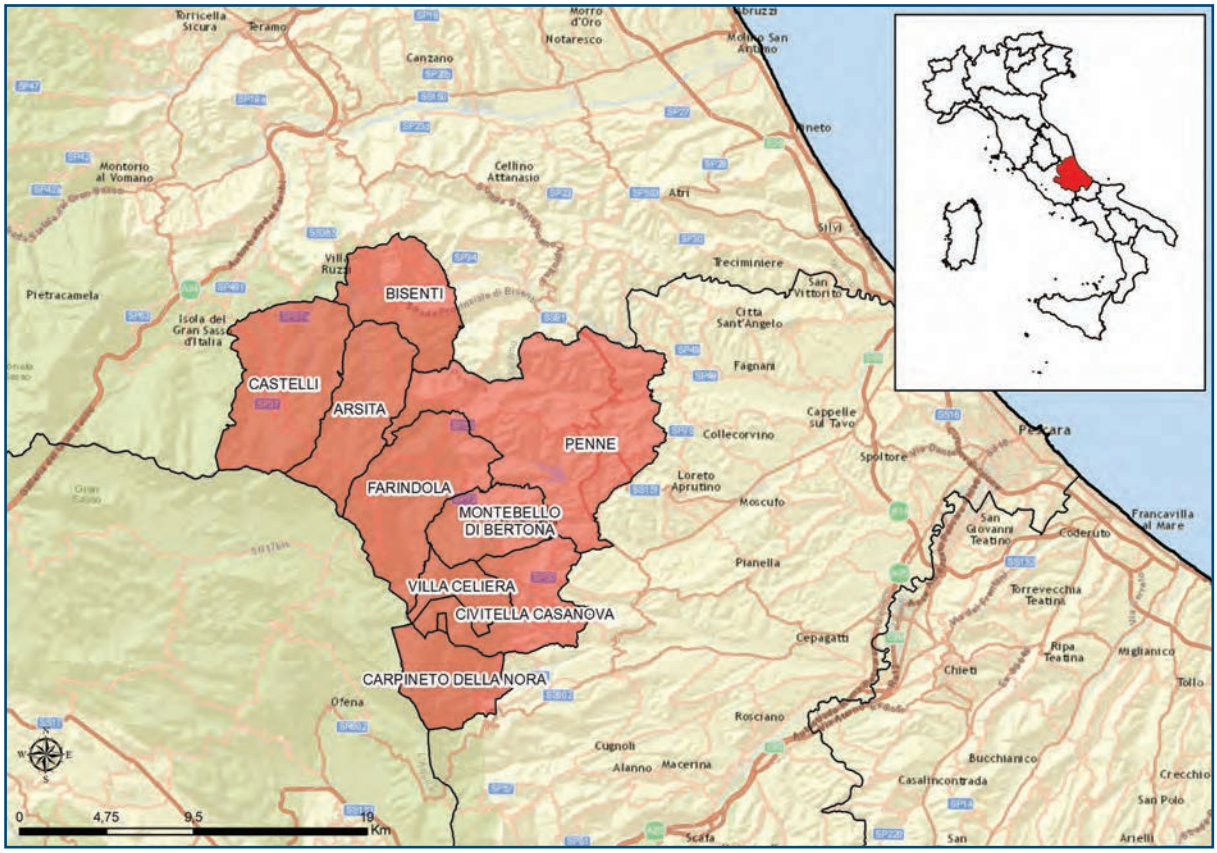
Lo studio ha previsto l'acquisizione di dati su 10 aziende produttrici aderenti al Consorzio di Tutela del Pecorino di Farindola, localizzate in 3 comuni dell'area di produzione prevista dal disciplinare: Arsita (TE), Penne (PE) e Farindola (PE) (Figura 1). Le aziende sono state identificate con numeri progressivi da 1 a 10.

Sopralluoghi e interviste

I dati sul processo di produzione sono stati rilevati mediante l'esecuzione di sopralluoghi e interviste ai produttori, effettuati nel periodo compreso tra il 29/04/2013 e il 15/05/2013. Per lo studio è stata redatta una scheda con la richiesta delle seguenti informazioni:

- generalità dell'azienda;
- produzione annuale/mercato di riferimento/distribuzione/periodo di produzione;
- peso delle forme/confezionamento;
- ingredienti;
- caratteristiche del caglio;
- descrizione delle fasi del processo di produzione: approvvigionamento e stoccaggio latte, riscaldamento latte, aggiunta caglio, rottura/

Figura 1. Area di produzione del Pecorino di Farindola.



riscaldamento/estrazione cagliata, spurgo, salatura, asciugatura, stagionatura;

- descrizione delle caratteristiche del prodotto finito.

Risultati

I risultati ottenuti hanno permesso di individuare le variabili riguardanti il processo di produzione di cui si riportano gli aspetti più rilevanti. Tutti i produttori hanno dichiarato di commercializzare il Pecorino di Farindola in un intervallo compreso tra 90 e 360 giorni di stagionatura. I volumi produttivi sono risultati variare in maniera importante tra le diverse aziende. Infatti, le aziende 1, 2 e 3 hanno concentrato il 96% della produzione totale del Pecorino di Farindola. In particolare, l'azienda 1 ha prodotto il 77,5% della produzione annuale: 60 tonnellate/anno, su un totale di circa 78 tonnellate. Le aziende 2 e 3 hanno prodotto singolarmente circa 7 tonnellate/anno pari al 9% della produzione totale. Tutte le altre aziende hanno evidenziato una produzione molto limitata, inferiore alla tonnellata/anno. Dai volumi produttivi è dipeso, inevitabilmente, anche il mercato di riferimento delle singole aziende. Questo, infatti, per cinque aziende è stato rappresentato esclusivamente dalla vendita diretta al consumatore finale all'interno dello spaccio aziendale o nella casera consortile di Farindola. Per altre due aziende il mercato è risultato solo provinciale e regionale. Per le restanti tre aziende, con la produzione più elevata, il prodotto è stato commercializzato anche tramite le reti della grande distribuzione in tutta Italia e per due di queste anche all'estero (Unione Europea e USA).

Processo di produzione del Pecorino di Farindola

Dallo studio, per quanto riguarda le variabili del processo di produzione, è emerso che il latte utilizzato è risultato di produzione propria. La produzione è stata, per la maggioranza delle aziende, legata alla stagione dei parti delle pecore e non è risultata costante nell'arco dell'anno solare. Solo due aziende sono riuscite a garantirla tutto l'anno ricorrendo alla sincronizzazione degli estri delle pecore. Gli ingredienti utilizzati non sono risultati differenti tra i produttori: latte intero ovino, sale e caglio suino tranne per l'azienda 1 che ha impiegato anche il siero innesto. I dati del processo di produzione raccolti nelle 10 aziende sono riportati in Allegato 1.

Dopo l'approvvigionamento, il latte prima di essere trasferito in caldaia polivalente o pentola da cucina, viene filtrato con filtri di "tessuto non

tessuto" (prodotto ottenuto con procedimenti diversi dalla tessitura) e riscaldato a 30-36°C . In seguito, si procede all'aggiunta del caglio suino (Figura 2) nella quantità variabile di 0,3-2ml per

Figura 2. Caglio suino.

litro di latte. La coagulazione si realizza in 20-60 minuti. Formato il coagulo, si procede alla sua rottura in granuli, delle dimensioni di chicchi di mais/grano, che nel loro insieme vengono riscaldati solo da alcune aziende. La cagliata viene estratta e trasferita nelle fuscelle. Le forme vengono pressate e rivoltate per favorire lo spurgo del siero, quindi, si procede alla salatura che avviene a secco cospargendo di sale grosso le facce delle forme. La salatura, nelle diverse aziende, può avere una durata da 16 a 48h. Per allontanare il sale residuo le forme vengono lavate con acqua o siero tiepidi e poste ad asciugare su graticci di legno o teli di stoffa. Si procede con la stagionatura su scaffali in legno, durante la quale le forme vengono rivoltate e trattate con olio, o olio/aceto, un numero variabile di volte a seconda delle necessità individuate dal produttore. La stagionatura prosegue in casse o armadi in legno di faggio. In questa fase rivoltamenti e ungitura diventano meno frequenti. Dalle interviste ai produttori, le forme di Pecorino prodotto sono risultate del peso medio di 2kg con forme da 0,5 a 12kg. Dallo studio, quindi, le fasi del processo di produzione sono risultate le seguenti: approvvigionamento latte, stoccaggio latte, pulitura o filtrazione latte, riscaldamento latte, aggiunta caglio, coagulazione, rottura cagliata, riscaldamento cagliata, estrazione cagliata, trasferimento in fuscella, spurgo siero e rivoltamento forme, stufatura, lavaggio presalatura, salatura a secco, lavaggio, asciugatura, stagionatura fasi 1-2-3 (Figura 3).

Figura 3. Diagramma di flusso del processo di produzione del Pecorino di Farindola. Le fasi di stufatura e lavaggio presalatura, evidenziate in giallo, sono eseguite, rispettivamente, dall'azienda 1 e dall'azienda 2.

Processo di produzione del caglio

Per quanto concerne il caglio, dallo studio è emersa l'importanza di questo componente per le caratteristiche peculiari del prodotto finale. Di conseguenza, si è proceduto ad una verifica accurata della sua composizione e della modalità di produzione, rilevandone le relative differenze. Si è potuto constatare che alcuni ingredienti sono sempre presenti: mucosa gastrica di suino, vino bianco e sale. Cinque produttori su dieci aggiungono peperoncino, quattro pepe e un produttore un pezzo di Pecorino dell'anno precedente. Il processo prevede che la mucosa gastrica di suino venga separata dagli strati più esterni della parete e lavata in acqua o aceto e sale, quindi, asciugata sotto sale a temperatura ambiente o di refrigerazione. In seguito la mucosa viene posta in infusione in vino bianco con l'aggiunta degli ingredienti citati, per un periodo che, a seconda delle aziende, varia da 10 a 365 giorni. In seguito si procede alla filtrazione, in alcuni casi alla diluizione in acqua e, quindi, all'utilizzo. Lo studio ha permesso, quindi, di definire il processo di produzione anche per il caglio le cui fasi sono risultate le seguenti: lavaggio mucosa, disidratazione sotto sale, refrigerazione, infusione in vino, diluizione in acqua, filtrazione, stoccaggio (Figura 4).

Discussione

Lo studio ha mostrato numerose variabili del processo di produzione che risulta, comunque, riconducibile a fasi di lavorazione che si ripetono secondo un ordine consolidato. Variabilità del processo produttivo confermata da Schirone *et al.* (4) e messa in evidenza anche negli studi effettuati da Scatassa *et al.* sul pecorino siciliano (3). L'utilizzo di temperature di cagliata relativamente basse è risultato, comunque, un fattore comune a tutte le aziende, distinguendo il processo di lavorazione del Pecorino di Farindola dagli altri pecorini italiani. La durata e le modalità di stagionatura sono altre componenti del processo che presentano minime differenze tra le aziende. Infatti, solo 3 aziende (di dimensioni maggiori) utilizzano celle a temperatura controllata, in tutte le altre viene impiegata la tradizionale "cantina". Il periodo di maturazione, risultando sempre superiore ai 60 giorni, come già riportato in passato da Di Giacomo *et al.*(2) e Schirone *et al.*(4), può ritenersi garanzia di un prodotto microbiologicamente sicuro per l'assenza di forme vegetative. Le maggiori differenze nel processo di produzione, come prevedibile, sono state riscontrante tra l'unica azienda con caratteristiche semi-industriali (azienda 1) e le altre, soprattutto quelle a conduzione familiare. L'azienda 1 è risultata, infatti, l'unica a utilizzare il siero-innesto e tra le pochissime ad impiegare la caldaia polivalente invece della tradizionale pentola da cucina. Il processo produttivo resta, comunque, artigianale e permette anche a questo produttore di conferire al formaggio caratteristiche proprie. Per quanto riguarda il caglio suino, ingrediente impiegato solo nella limitata area geografica prevista dal disciplinare di produzione, lo studio ha permesso di rilevarne le variabili di produzione confermando l'esecuzione delle fasi principali da parte di tutte le aziende studiate.

Conclusioni

L'identificazione dei processi di produzione e del caglio suino ha fortemente contribuito alla conoscenza del Pecorino di Farindola e al suo contesto produttivo. Lo studio è testimonianza di procedure comuni e consolidate che sono garanzia dell'unicità del prodotto. I risultati ottenuti sono anche utili per la riproduzione in laboratorio di questo tipo di pecorino per l'esecuzione di challenge test di contaminazione artificiale.

Figura 4. Diagramma di flusso del processo di produzione del caglio di suino. Le fasi di refrigerazione e diluizione in acqua, evidenziate in giallo, sono eseguite, rispettivamente, dall'azienda 6 e dall'azienda 2.

Bibliografia

1. Di Giacomo F., A. Del Signore and M. Giaccio, 2009. Farindola sheepcheese. J. Commodity Sci. Tech. Qual., 48(2): 177-197.
2. Di Giacomo F., N. Casolani and A. Del Signore, 2014. Cheese making using pig and calf rennet: microrganisms and volatile compounds in Farindola ewe cheese. Italian Journal Food Sci., 26: 153-161.
3. Scatassa M.L., A. Costa, P.S. Ciaccio e A.M. Di Noto, 2005. Formaggio Pecorino siciliano: processo produttivo ed indagine. XIII Congresso Internazionale Fe.Me.S.P.Rum. 1-3 Settembre 2005, Bari, Italia.
4. Schirone M., R. Tofalo, G. Mazzone, A. Corsetti and G. Suzzi, 2011. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. Food Microbiol., 28: 128-136.

Allegato 1. Risultati delle interviste sul processo di produzione del Pecorino di Farindola.

Fase	Azienda									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Approvvigionamento latte										
Provenienza latte	pp	pp	pp	pp	pp	pp	pp	pp	pp	pp
Stoccaggio latte										
Tank refrigerato	si	si	si	no	no	no	no	no	no	no
Frigorifero domestico	no	no	no	no	no	no	no	si	si	no
Temperatura di conservazione (°C)	4	4	4	/	ambiente	18	ambiente	4	4	/
Monitoraggio temperatura	si	si	si	no	no	no	no	si	no	no
Durata (h)	12	48	12	/	12	12	12	48	12	/
Pulitura o Filtrazione										
	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Riscaldamento latte										
Caldaia polivalente	si	si	no	no	no	no	no	no	no	no
Fornello + pentola	no	no	si	no	si	si	si	si	si	no
Temperatura (°C)	32	35	36	ambiente	30	35	34	35	35	34
Monitoraggio temperatura	si	si	no	no	no	no	si	si	no	si
Utilizzo innesto	si	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Aggiunta caglio										
Temperatura latte all'immissione (°C)	32	35	36	ambiente	30	35	34	35	35	34
Quantità (ml/l)	1	1,2	nd	2	1	2	1	nd	0,3	1,3
Coagulazione										
Durata (min)	30	45	35	45	45	20	30	25	60	nd
Rottura cagliata										
Meccanica	no	si	no	no	no	no	no	no	no	no
Manuale	si	no	si	si	si	si	si	si	si	si
Lira	si	si	no	no	no	no	no	no	no	no
Spino	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Mani	no	no	si	si	no	si	si	si	si	no
Altro	no	no	no	no	si	no	no	no	no	si
Durata (min)	10	15	nd	nd	nd	nd	15	10	nd	nd
Dimensione grani (cm)	mais	mais	mais	chicco di caffè	nd	mais	mais	mais	mais	grano
Riscaldamento cagliata										
Aggiunta siero	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Temperatura siero (°C)	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Aggiunta acqua	no	no	si	no	si	no	si	no	si	si
Temperatura acqua (°C)	/	/	100	/	nd	/	37	/	37	38
Fornello	no	no	no	no	no	si	no	si	no	no
Caldaia polivalente	no	si	no	no	no	no	no	si	no	no
Temperatura (°C)	/	35	/	/	/	/	/	40	/	/
Rimescolamento cagliata	no	si	no	no	no	no	no	no	nd	no
Sosta	no	no	no	si	no	no	no	no	nd	no
Estrazione cagliata										
Manuale	no	no	si	si	si	si	si	si	si	si
Meccanica	si	si	no	no	no	no	no	no	no	no
Fuscella	no	no	no	si	si	no	si	si	si	si

pp = produzione propria; nd = dato non disponibile; qb = quanto basta; / = operazione non eseguita o valore assente.

segue

Allegato 1. Risultati delle interviste sul processo di produzione del Pecorino di Farindola.

Fase	Azienda									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
Trasferimento in fuscella										
Fuscella vimini	no	si	si	si	si	si	no	no	si	si
Fuscella plastica	si	si	si	si	no	si	si	si	no	no
Spurgo siero e rivoltamento forme										
Durata (min)	1	60	180	45	nd	30	nd	120	15	25
Rivoltamenti forme (n/gg)	1	3	nd	>3	nd	no	nd	nd	nd	si
Pressatura manuale	si	si	nd	nd	nd	si	nd	nd	nd	si
Produzione ricotta	si	si	si	si	no	si	no	nd	nd	nd
Stufatura										
Temperatura (°C)	36	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Durata (min)	90	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Lavaggio pre-salatura										
	no	si	no	no	no	no	no	no	no	no
Salatura										
A secco	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
In salamoia	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
Durata (h)	48	18	36	48	16	48	24	48	24	24
Numero salature (numero)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Rimozione forma dalle fuscelle (h)	48	24	36	48	48	nd	48	48	24	24
Lavaggio post-salatura										
	si	si	si	si	si	nd	si	si	si	si
Asciugatura										
Durata (giorni)	15	/	65	12	20	15	1	<7	nd	10
Temperatura (°C)	9	/	16	nd	15	15	15	nd	17	14
Umidità relativa (%)	80	/	nd	nd	nd	nd	60	80	70	70
Scaffali in legno	si	/	si	nd	nd	nd	nd	nd	si	si
Griglie acciaio	si	/	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Teli stoffa	no	/	si	nd	nd	nd	nd	nd	no	si
Rivoltamenti forme (n/gg)	1	/	nd	2/1	nd	1/4	no	no	1/1	nd
Stagionatura										
Numero fasi	3	2	1	1	1	1	1	1	2	3
Fase 1										
Durata (gg)	45	20	80	nd	150	nd	nd	nd	45	30
Cella frigo	si	si	no	nd	no	si	no	no	no	no
Grotta	no	no	no	nd	no	no	no	no	no	no
Cantina	no	no	no	nd	si	no	si	si	si	si
Scaffali in legno	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
Temperatura (°C)	10	13	16	nd	15	15	17	15	17	14
Umidità relativa (UR) (%)	nd	65	no	nd	no	no	60	80	65	70
Frequenza rivoltamenti (n/gg)	1/3	1/1	nd	1/8	1/7	1/7	qb	qb	1/1	1/1
Spazzolatura superficie esterna	si	si	no	nd	no	si	si	si	no	si
Lavaggio	no	si	no	nd	no	si	no	si	no	si
Applicazione olio di oliva	no	no	no	no	si	si	si	si	si	no
Applicazione olio + aceto	no	no	si	si	no	no	si	si	no	no
Frequenza applicazioni (n/gg)	/	/	1/8	1/8	1/7	1/7	1/15	qb	1/20	/

pp = produzione propria; nd = dato non disponibile; qb = quanto basta; / = operazione non eseguita o valore assente.

segue

Allegato 1. Risultati delle interviste sul processo di produzione del Pecorino di Farindola.

Fase	Azienda									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase 2										
Durata (gg)	150	nd	/	/	/	/	/	/	nd	15
Cella frigo	si	si	/	/	/	/	/	/	no	no
Grotta	no	no	/	/	/	/	/	/	no	no
Cantina	no	no	/	/	/	/	/	/	si	si
Scaffali in legno	si	si	/	/	/	/	/	/	no	si
Temperatura (°C)	12	16	/	/	/	/	/	/	nd	nd
Umidità relativa (UR)(%)	nd	70	/	/	/	/	/	/	nd	nd
Frequenza rivoltamenti (n/gg)	nd	1/10	/	/	/	/	/	/	1/15	nd
Spazzolatura superficie esterna	no	no	/	/	/	/	/	/	no	no
Applicazione olio di oliva	no	si	/	/	/	/	/	/	si	si
Applicazione olio + aceto	si	no	/	/	/	/	/	/	nd	no
Frequenza applicazioni (n/gg)	1/7	nd	/	/	/	/	/	/	1/15	1/7
Fase 3										
Durata (gg)	180	/	/	/	/	/	/	/	/	da 45
Cella frigo	si	/	/	/	/	/	/	/	/	no
Grotta	no	/	/	/	/	/	/	/	/	no
Cantina	no	/	/	/	/	/	/	/	/	si
Scaffali in legno	no	/	/	/	/	/	/	/	/	no
Armadi in faggio	si	/	/	/	/	/	/	/	/	si
Temperatura (°C)	16	/	/	/	/	/	/	/	/	nd
Umidità relativa (UR)(%)	nd	/	/	/	/	/	/	/	/	nd
Frequenza rivoltamenti (n/gg)	no	/	/	/	/	/	/	/	/	nd
Spazzolatura superficie esterna	no	/	/	/	/	/	/	/	/	no
Applicazione olio di oliva	no	/	/	/	/	/	/	/	/	si
Applicazione olio + aceto	no	/	/	/	/	/	/	/	/	si
Frequenza applicazioni (n/gg)	1/7	/	/	/	/	/	/	/	/	1/7

pp = produzione propria; nd = dato non disponibile; qb = quanto basta; / = operazione non eseguita o valore assente.

Studio chimico-fisico e microbiologico del Pecorino di Farindola

Diana Neri, Romina Romantini, Gabriella Centorotola, Federica De Berardinis, Luca Candeloro, Violeta Di Marzio, Luigi Iannetti, Francesco Pomilio, Gino Angelo Santarelli, Anna Franca Sperandii, Patrizia Tucci, Giacomo Migliorati

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, Teramo, 64100 - Italia
Corrispondenza: Diana Neri, d.neri@izs.it

Parole chiave
Acqua libera (a_w), Biocompetizione, Carica batterica, Determinazione pH, Flora microbica, Pecorino di Farindola, Stagionatura.

Riassunto
Lo studio ha avuto l'obiettivo di rilevare i parametri chimico-fisici (pH e a_w) e la flora microbica autoctona di maggior interesse per la caseificazione durante il processo di produzione del Pecorino di Farindola. Le valutazioni sono state effettuate su 107 campioni (9 di latte e 9 di cagliata prelevati in azienda, e 89 di formaggio prelevati durante la stagionatura nella casera consortile) ai giorni 0 (latte e cagliata), 7, 14, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 121 e 150 per un totale di 2104 determinazioni analitiche. Lo studio è stato integrato con la determinazione degli stessi parametri su 101 campioni di formaggio in vendita prelevati nella casera consortile per un totale di 2018 determinazioni analitiche. E' stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra i campioni delle aziende riguardo alla numerazione di: carica batterica mesofila totale, Lattobacilli, Lattococchi e Stafilococchi coagulasi positivi. Dalle analisi è emerso che la quasi totalità delle concentrazioni batteriche sono risultate influenzate significativamente dalla riduzione dell'attività dell'acqua nel corso della stagionatura. In particolare, quella degli Stafilococchi coagulasi positivi è risultata rilevante, tanto da mostrare, tra 35 e 49 giorni di stagionatura, una riduzione della concentrazione al di sotto del limite di rilevamento del metodo anche in presenza di elevate cariche iniziali. La rilevazione di concentrazioni elevate in alcuni campioni di latte impiegato come materia prima è una criticità da tenere in considerazione, in quanto potrebbe comportare la produzione di tossine e la loro conseguente presenza nel prodotto finito. Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Introduzione

Il Pecorino di Farindola è un prodotto di nicchia, i cui valori dei parametri chimico-fisici e microbiologi sono strettamente legati al territorio e al processo di produzione, quest'ultimo completamente artigianale nel rispetto della tradizione e del relativo disciplinare. La caratterizzazione di un prodotto tradizionale e la valutazione del suo grado di sicurezza non può prescindere dalla conoscenza della flora microbica autoctona, come i microrganismi lattici, in particolare, quelli pro-tecnologici (che determinano cambiamenti). Lo studio delle dinamiche di crescita dei microrganismi patogeni, deve tener sempre conto della biocompetizione messa in atto dalla flora microbica autoctona, che può variare in funzione dei differenti processi di lavorazione. In considerazione della mancata aggiunta di colture starter, la flora lattica presente nel latte utilizzato per la produzione del Pecorino di Farindola contribuisce alla maturazione del formaggio e al conferimento delle caratteristiche proprie del prodotto (2). La quantità e le specie batteriche appartenenti alla flora microbica autoctona del formaggio sono fortemente influenzate dai microrganismi che contaminano il latte, provenienti dalle operazioni di mungitura e caseificazione, inclusi quelli patogeni e indicatori di igiene.

Lo studio ha avuto l'obiettivo di rilevare i parametri chimico-fisici (pH e a_w) e la flora microbica autoctona di maggior interesse per la caseificazione durante il processo di produzione del Pecorino di Farindola. Il lavoro è stato integrato con la determinazione degli stessi parametri su campioni di formaggio in vendita, prelevati nella casera consortile.

Lo studio, è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", finanziato

dalla Regione Abruzzo nell'ambito del Programma Operativo Regionale (POR) del Fondo Europeo di Sviluppo Regionale (FESR) 2007-2013.

Materiali e metodi

Campionamento

Lo studio ha previsto l'analisi di 107 campioni (9 di latte e 9 di cagliata prelevati in azienda, e 89 di formaggio prelevati durante la stagionatura nella casera consortile) provenienti da 3 lotti di prodotto per ciascuna delle 3 aziende che nel 2012 hanno contribuito in misura maggiore alla produzione di Pecorino di Farindola (96% del totale). Le tre aziende sono state nominate con numeri progressivi da 1 a 3. Il latte e la cagliata sono stati prelevati in azienda il giorno 0 (giorno della produzione). Per ciascun lotto, sono stati prelevati 1000ml di latte e 500g di cagliata. I prelievi di formaggio, pari ad una forma, sono stati effettuati presso la casera consortile a 7, 14, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 121 e 150 giorni di stagionatura.
Successivamente, sono stati acquistati 101 campioni di Pecorino di Farindola in vendita presso la casera consortile, provenienti da 101 lotti prodotti e posti in commercio da 4 aziende aderenti al consorzio di tutela del Pecorino di Farindola. Di queste, 3 aziende sono state le stesse precedentemente nominate con numeri progressivi da 1 a 3, e una quarta identificata come azienda 4. Complessivamente sono stati prelevati 31 formaggi prodotti dall'azienda 1 con tempo medio di stagionatura di 283 giorni (245 - 404); 48 dall'azienda 2 con tempo medio di 333 giorni (206 - 444); 10 dall'azienda 3 con tempo medio di 109 giorni (101 - 119); 12 formaggi prodotti dall'azienda 4 con tempo medio di stagionatura di 214 giorni (124 - 264). Il peso medio delle forme da cui sono stati prelevati i campioni è stato di 1400 g, il minimo di 820 g e il massimo di 2500 g. Le forme con un peso inferiore a 1400g sono state prelevate per intero, nel caso di forme più grandi ne è stata prelevata metà.
I campioni sono stati trasportati alla Sede Centrale dell'Istituto Zooprofilattico dell'Abruzzo e del Molise (IZSAM) e conservati a temperatura di 3°C ± 2°C fino al momento dell'esecuzione delle analisi di laboratorio.

Analisi di laboratorio

Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio per un totale di 2104 determinazioni analitiche sui campioni prelevati durante il processo di produzione e 2018 determinazioni analitiche sui campioni prelevati alla vendita. Al fine di eseguire le determinazioni sono stati dapprima preparati campioni di 100g di peso, ottenuti prelevando dall'intera forma o parte di essa, diverse porzioni di circa 5g ognuna. Il quantitativo prelevato è stato sottoposto a macinazione e omogeneizzazione mediante Grindomix™ GM 200 (Retsch, Haan, Germania). Successivamente 10g del campione omogeneizzato sono stati posti in 90ml di acqua peptonata e miscelati in stomacher (Stomacher™ 400 Circulator PBI International, Milano, Italia). In seguito sono state allestite diluizioni decimali fino alla diluizione 10^{-8}. L'aliquota da sottoporre a prova, la sospensione iniziale e le diluizioni decimali sono state preparate secondo le norme ISO 6887-1:1999 (12), ISO 6887-5:2010(E)(18) e ISO 707:2008(E)(17).
Per quanto riguarda le determinazioni dei parametri chimico-fisici e microbiologici, per il latte è stata determinata la carica batterica mesofila (CBM) secondo il DM 26 marzo 1992 (6), per cagliata e formaggio la carica batterica mesofila a 30°C (ISO 4833:2006) (19). In tutti i campioni di latte, cagliata e formaggio, si è provveduto alla conta dei batteri lattici a 30°C (ISO 15214:1998) (10), alla determinazione dell'attività dell'acqua (a_w) (ISO 21807:2004) (20), alla numerazione delle Enterobacteriaceae (ISO 21528-2:2004) (14), numerazione di Enterococchi (NMKL No. 68, 4th Ed. 2004) (21), numerazione di *Lactococcus* (Rapporti ISTISAN 08/36) (1), numerazione di lieviti e muffe in campioni con $a_w > 0,95$ (ISO 21527-1:2008) (15), numerazione di lieviti e muffe in campioni con $a_w < 0,95$ (ISO 21527-2:2008) (16), numerazione di stafilococchi coagulasi positivi (SCP) (ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003) (11, 13).
La determinazione del pH e la numerazione delle Micrococcaceae sono state effettuate con l'impiego di metodi interni. In particolare, la determinazione del pH è stata realizzata con l'impiego di pH-metro (Seven Easy Mettler Toledo, Columbus, USA) mediante una soluzione costituita da 10g di campione e 90ml di acqua deionizzata. La miscela è stata omogeneizzata in stomacher (Stomacher™ 400 Circulator PBI International), trasferita in provetta e centrifugata (Multifuge 3 L-R Kendro, Heraeus, Hanau, Germania) a 1500 giri per 5 minuti. Al termine il surnatante è stato filtrato mediante carta da filtro. La misurazione del pH è stata effettuata immergendo l'elettrodo nel filtrato.
Per la numerazione delle Micrococcaceae, le diluizioni dei campioni sono state seminate per spatolamento su piastre di agar Baird Parker. Le piastre sono state, quindi, incubate a 37°C±1°C per 48h±2h. Successivamente dalle piastre sono state selezionate colonie nere, grigio lucide e colonie le piccole senza alone di chiarificazione e senza anello opalescente. Le colonie selezionate sono state sottoposte a colorazione di Gram e a fermentazione del glucosio in agar glucosio. Sono stati, quindi, considerati appartenenti alla famiglia delle Micrococcaceae tutti i cocchi gram positivi, catalasi positivi e non in grado di fermentare il glucosio in anaerobiosi. Tutti i campioni sono stati analizzati in doppio. I risultati ottenuti sono stati tradotti in istogrammi, indicando per ogni azienda e per ogni tempo di prelievo la media e i valori minimo e massimo

Analisi di statistica

L'analisi statistica dei risultati degli esami su latte e cagliata è stata effettuata mediante analisi della varianza. I risultati degli esami sui formaggi sono stati analizzati costruendo un modello lineare multiplo in cui la variabile dipendente è stata il logaritmo della determinazione microbiologica e le variabili indipendenti sono state il parametro "1-a_w" (utilizzato per convezione, in modo da rappresentare graficamente l'andamento dell'attività dell'acqua nel tempo), l'azienda e la loro interazione. La significatività dei coefficienti stimati è stata valutata mediante t-test (ipotesi nulla: coefficiente = 0) e considerando un errore di prima specie (alfa) pari al 5%. Tutti i parametri sia fisico-chimici che microbiologici sono stati confrontati in funzione dell'attività dell'acqua ad eccezione di quest'ultima la cui analisi è stata effettuata in relazione al tempo.

Risultati

Rilevamento dei parametri chimico-fisici e microbiologici durante il processo di produzione

Determinazione del pH

I valori di pH rilevati in latte, cagliata e formaggio ai diversi giorni di stagionatura sono riportati in Figura 1. Il valore medio del pH osservato nel latte è stato di 6,72 (6,63 - 6,80), nella cagliata di 6,61 (6,56-6,69). Nel formaggio i valori medi di pH hanno mostrato una lieve variabilità, andando da 5,39 a T7 fino a 5,70 a T150.

Determinazione dell'a_w

I valori di a_w rilevati nel formaggio durante la stagionatura sono riportati in Figura 2. Come prevedibile, i valori di a_w hanno mostrato una diminuzione con il procedere della stagionatura. Nelle aziende 1 e 2 l'andamento è risultato pressoché sovrapponibile, il risultato medio a T7 è stato di 0,986 (0,975-0,995). Nell'azienda 3 il valore medio rilevato a T7 è stato di 0,963 (0,966–0,981), inferiore ai valori ottenuti nei formaggi prodotti dalle aziende 1 e 2. La differenza è rimasta tale fino a fine stagionatura (T150), quando la media dei valori rilevati nelle aziende 1 e 2 è stata di 0,906 e per l'azienda 3 di 0,867.

Carica batterica mesofila (CBM)

I valori della carica batterica mesofila sono riportati in Figura 3. Il risultato medio della CBM ottenuto nel latte è stato di 6,42 log_{10}UFC/ml (5,39 - 7,94), nella cagliata di 7,47 log_{10}UFC/g (5,79 - 8,07). Per i nove lotti di formaggio valori massimi di CBM sono stati raggiunti tra T7 e T14. In particolare, il valore più alto è stato rilevato nel lotto 2 dell'azienda 3 a T7, pari a 9,11 log_{10}UFC/g. Successivamente la CBM ha mostrato una riduzione graduale raggiungendo a T150 valori medi di 6,70 log_{10}UFC/g (6,10 - 7,02).

Figura 1. Rappresentazione grafica dei risultati di pH in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.

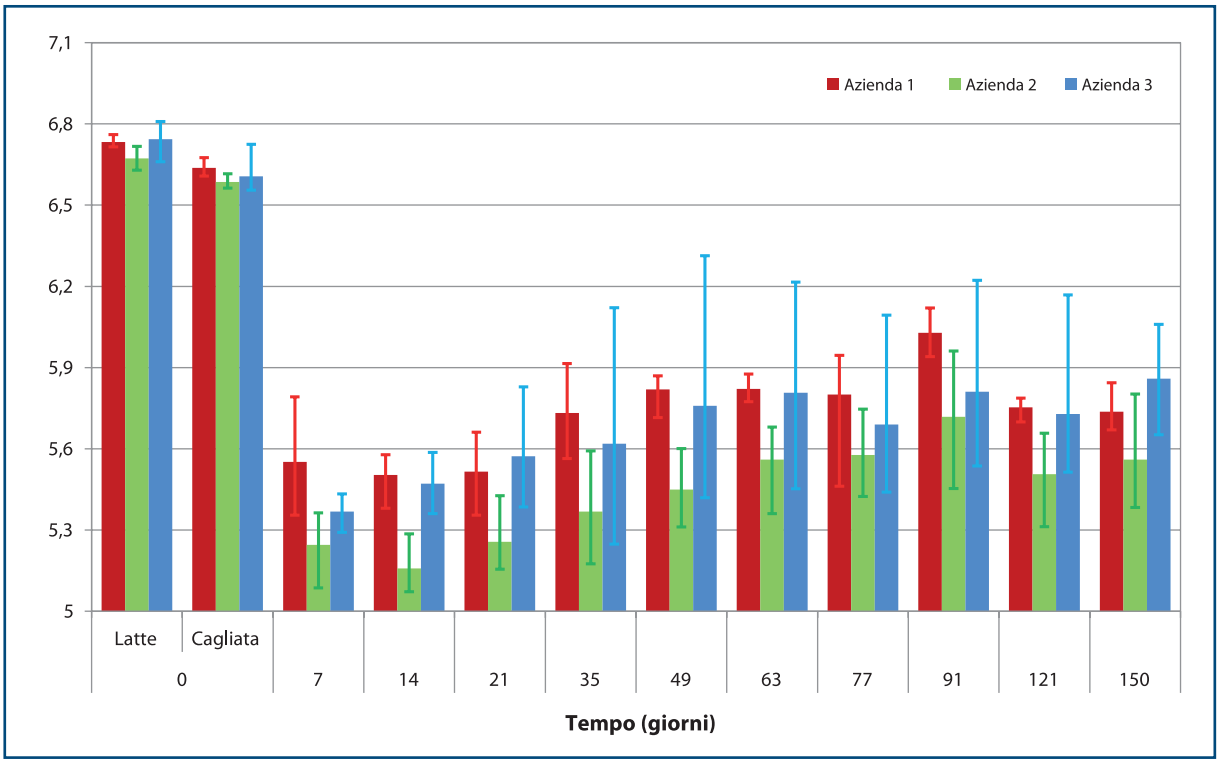


Figura 2. Rappresentazione grafica dei risultati di aw in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.

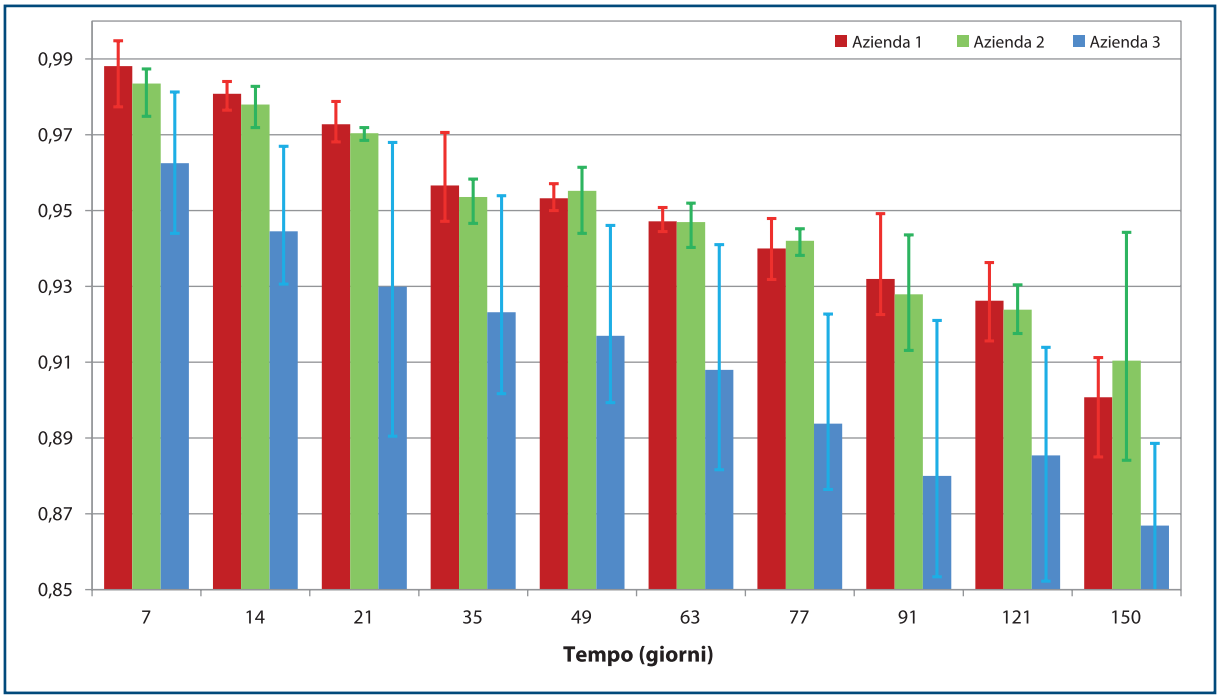
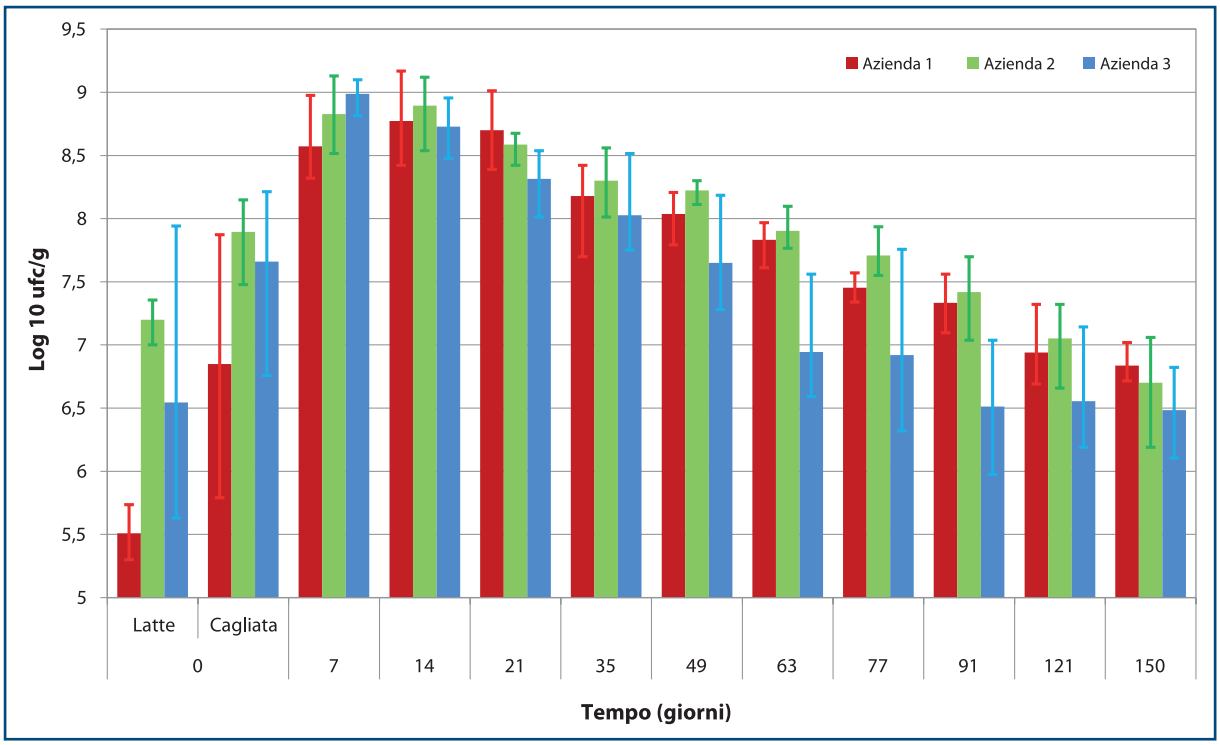


Figura 3. Rappresentazione grafica dei risultati di CBM in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.



Numerazione Enterobacteriaceae

I risultati della numerazione delle Enterobacteriaceae sono riportati in Figura 4. Il valore medio rilevato nel latte è stato di 3,97 log_{10}UFC/ml (3,19 - 5,54), nella cagliata di 5,46 log_{10}UFC/g (3,99 - 6,62). Nel formaggio il valore più elevato per tutti i lotti è risultato compreso tra 4,57 e 7,01 log_{10}UFC/g, raggiunto nell'intervallo di tempo T7 - T21.

Numerazione Enterococchi

I risultati della numerazione degli Enterococchi sono riportati in Figura 5. Il valore medio rilevato nel latte è stato di 4,25 log_{10}UFC/ml (2,63 - 5,99), nella cagliata di 5,46 log_{10}UFC/g (3,39 - 6,58). Nel formaggio il valore massimo per tutti i lotti è risultato compreso tra 6,78 log_{10}UFC/g e 8,03 log_{10}UFC/g, raggiunto nell'intervallo T49 - T63, ad eccezione dei lotti 2 e 3

dell'azienda 3 che hanno raggiunto il valore massimo a T35 e T7, rispettivamente. A T150, per tutti i lotti, il valore medio è risultato pari a 6,16 log_{10}UFC/g (4,96 - 7,11).

Numerazione Lattobacilli

I risultati della numerazione dei Lattobacilli sono riportati in Figura 6. Il valore medio rilevato nel latte è stato di 5,64 log_{10}UFC/ml (4,48 - 7,33), nella cagliata di

Figura 4. Rappresentazione grafica dei risultati di Enterobacteriaceae in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.

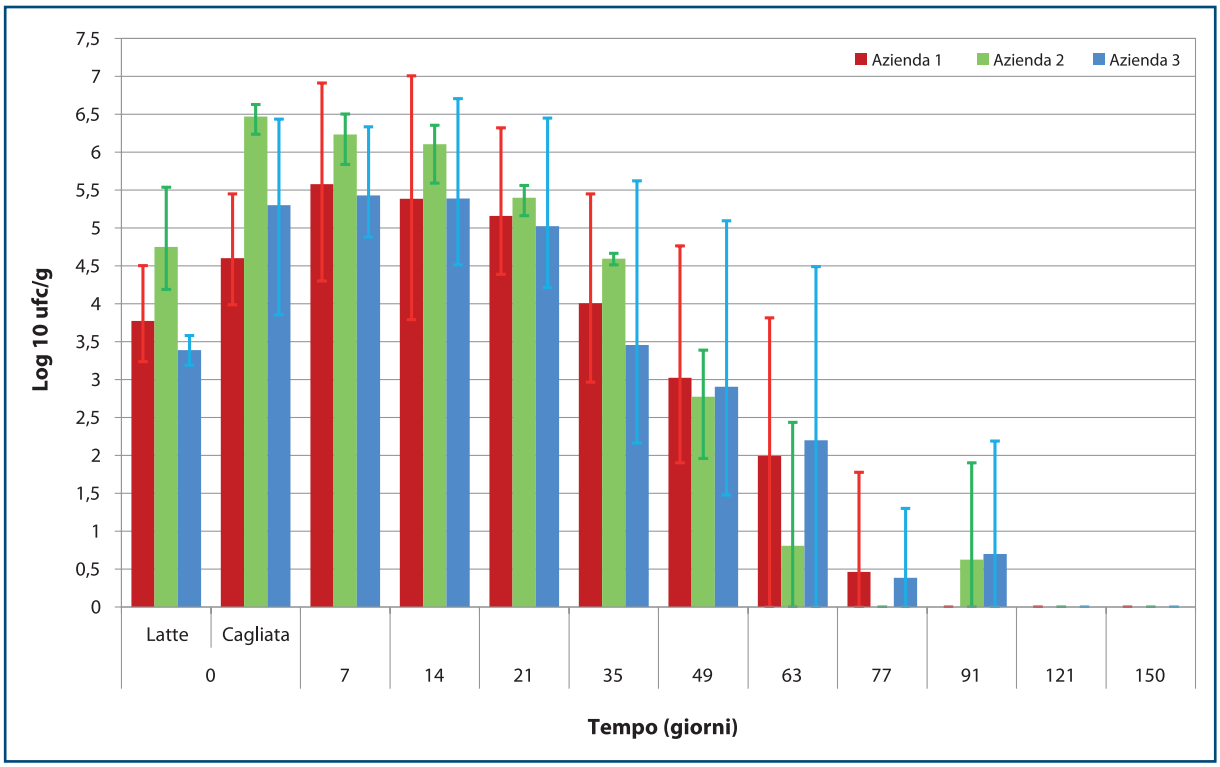
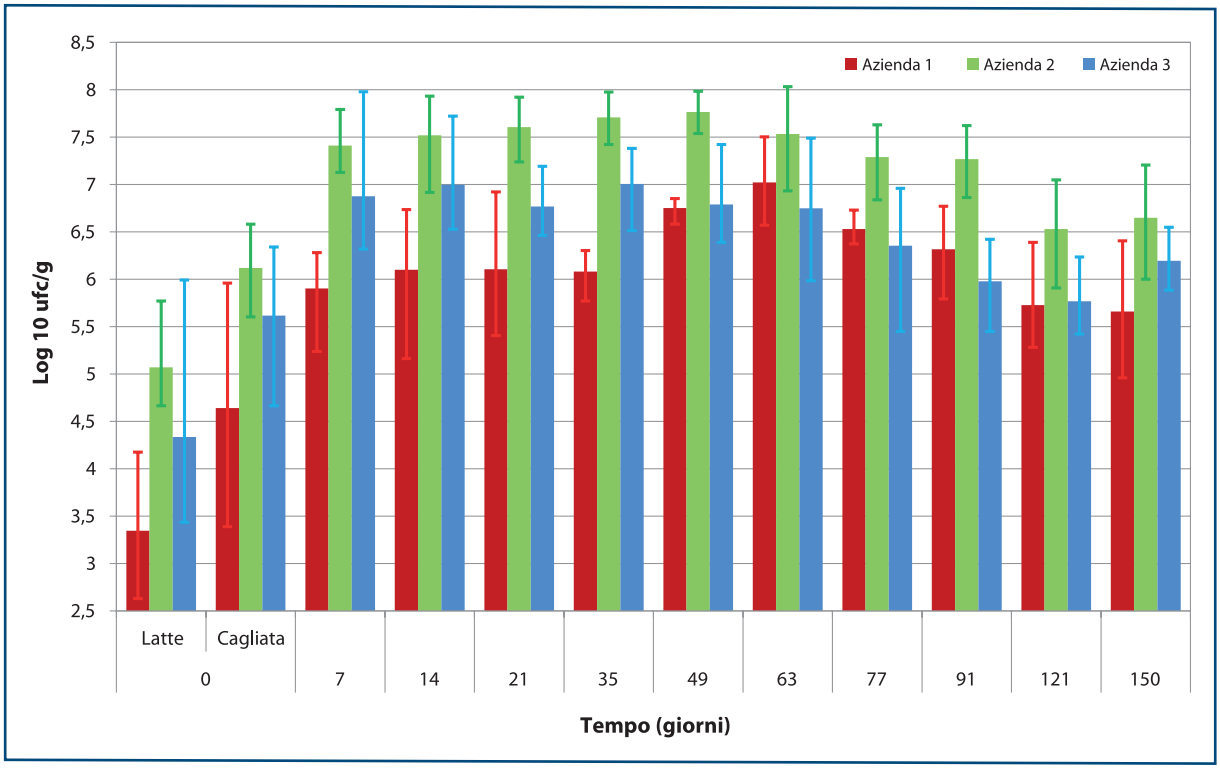


Figura 5. Rappresentazione grafica dei risultati di Enterococchi in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.



7,02 log_{10}UFC/g (4,97 - 8,11). Nel formaggio il valore massimo per tutti i lotti è risultato compreso tra 8,21 log_{10}UFC/g e 9,13 log_{10}UFC/g raggiunto nell'intervallo T7 - T14. Il valore medio è diminuito gradualmente fino a 6,35 log_{10}UFC/g (5,37 - 6,90) a T150.

Numerazione Lattococchi

I risultati della numerazione dei Lattococchi sono riportati in Figura 7. Il valore medio rilevato nel latte è stato di 6,79 log_{10}UFC/ml (5,63 - 8,08), nella cagliata

Figura 6. Rappresentazione grafica dei risultati di Lattobacilli in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.

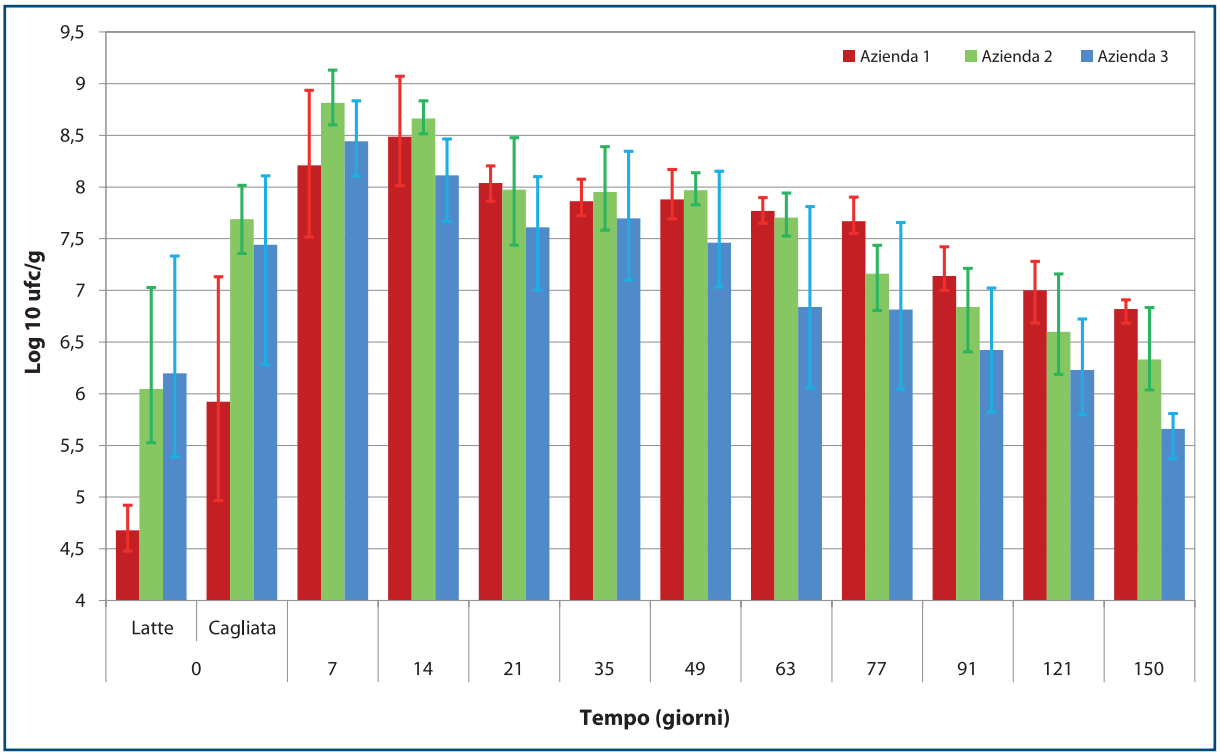
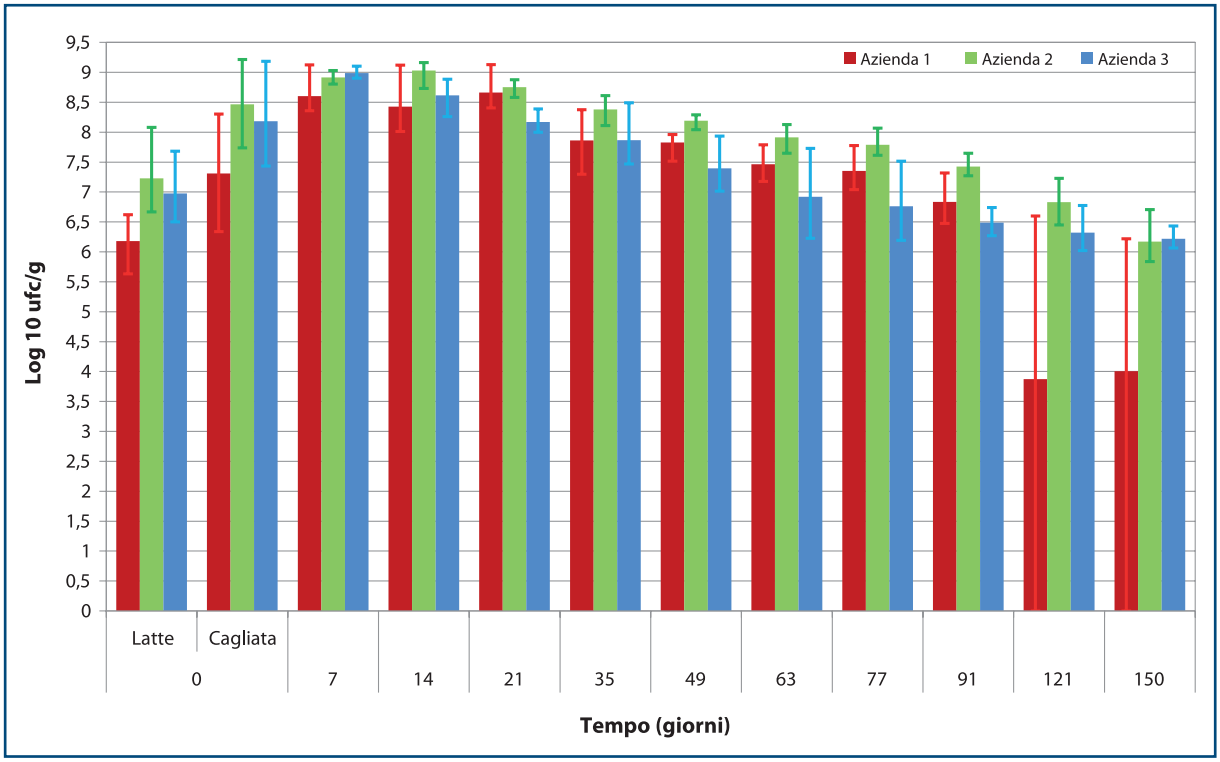


Figura 7. Rappresentazione grafica dei risultati di Lattococchi in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.



di 7,99 log_{10}UFC/g (6,34 - 9,22). Nel formaggio il valore massimo per tutti i lotti è risultato compreso tra 8,51 e 9,16 log_{10}UFC/g raggiunto nell'intervallo T7 - T21. In seguito il valore medio è progressivamente diminuito fino a raggiungere 5,37 log_{10}UFC/g (1 - 6,71) a T150, ad esclusione del lotto 1 dell'azienda 1 per cui, a T120, il valore è stato inferiore al limite di rilevabilità (LOD) pari 10UFC/g.

Numerazione Micrococcaceae

I risultati della numerazione delle Micrococcaceae sono riportati in Figura 8. Il valore medio rilevato nel latte è stato di 4,34 log_{10}UFC/g (3,59 - 5,03), nella cagliata di 5,25 log_{10}UFC/g (4,50 - 6,61). Nel formaggio il valore più elevato per tutti i lotti è risultato compreso tra 5,50 e 6,80 log_{10}UFC/g raggiunto nell'intervallo T7 - T21. Il valore rilevato tra T120 e T150 è risultato molto variabile, sono stati ottenuti risultati compresi tra valori inferiori al LOD e 5,16 log_{10}UFC/g.

Numerazione di muffe e lieviti

I risultati della numerazione di muffe e lieviti sono riportati in Figura 9. Il valore medio rilevato nel latte è stato di 3,97 log_{10}UFC/ml (3,04 - 5,42), nella cagliata di 4,40 log_{10}UFC/g (2,86 - 5,95). Nel formaggio il valore più elevato per tutti i lotti è risultato tra 4,62 e 6,27 log_{10}UFC/g raggiunto a T7. Nei formaggi del lotto 3 dell'azienda 3 è stato rilevato un valore massimo di 4,91 log_{10}UFC/g a T14. Nei formaggi di tutti i lotti è stata osservata una diminuzione del valore medio fino a 3,30 log_{10}UFC/g a T77. Successivamente è stato registrato un incremento fino a 4,26 log_{10}UFC/g (3,16–4,82) a T150.

Numerazione di stafilococchi coagulasi positivi (SCP)

I risultati della numerazione degli stafilococchi coagulasi positivi (SCP) sono riportati in Figura 10. Il valore medio rilevato nel latte è stato di 3,29 log_{10}UFC/ml (0,96 - 4,97), nella cagliata di 4,40 log_{10}UFC/g (2,68 - 5,56). Nel formaggio il valore medio rilevato in tutti i lotti a T7 è stato di 5,27 log_{10}UFC/g (4,45 - 5,76). Per quanto riguarda i campioni del lotto 1 dell'azienda 1, il valore massimo 7,84 log_{10}UFC/g è stato raggiunto a T14. Il valore medio di SCP dei lotti prodotti dalle aziende 2 e 3 è successivamente diminuito fino a valori inferiori al LOD a T49. Nei formaggi del lotto 2 dell'azienda 2 i valori inferiori al LOD sono stati raggiunti a T91, in quelli dei lotti 1 e 3 dell'azienda 1 a T77.

Analisi statistica

L'analisi statistica effettuata sui risultati delle determinazioni chimico-fisiche e microbiologiche eseguite sul latte è riportata in Tabella 1. Con valori di varianza (aov) inferiori al 5% le differenze tra le aziende non risultano statisticamente significative. Nel confronto tra le aziende 1 e 2 la differenza è risultata statisticamente significativa per la CBM,

Figura 8. Rappresentazione grafica dei risultati di Micrococcaceae in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.

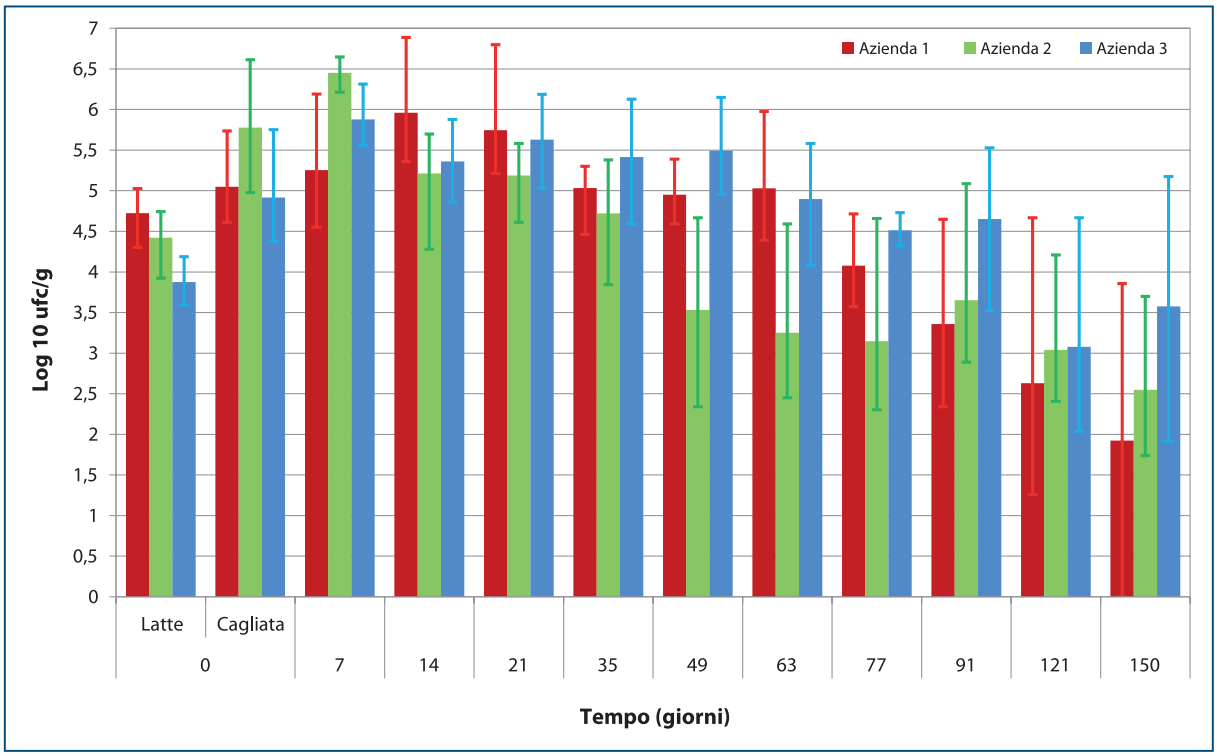


Figura 9. Rappresentazione grafica dei risultati di muffe e lieviti in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.

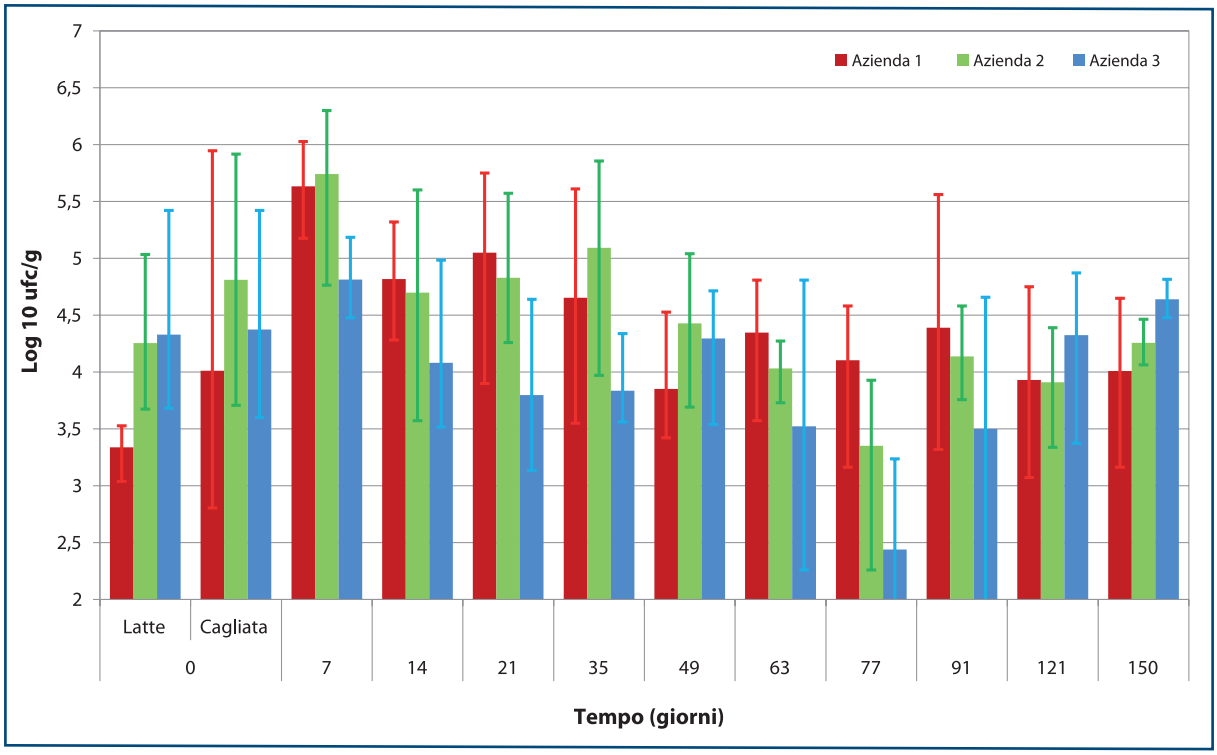
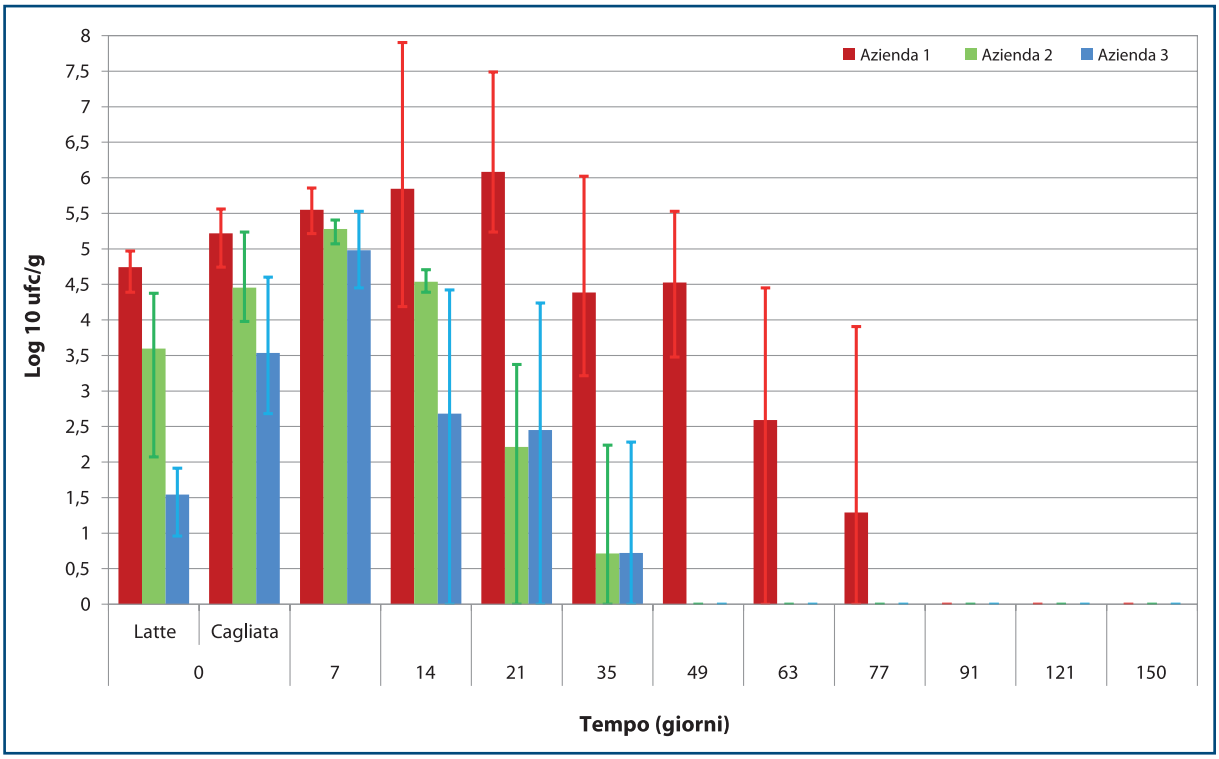


Figura 10. Rappresentazione grafica dei risultati di Stafilococchi coagulasi positivi in 9 lotti di Pecorino di Farindola, appartenenti alle aziende 1,2, 3, esaminati da T0 a T150.



la numerazione di Lattobacilli, Lattococchi ed SCP. Confrontando le aziende 1 e 3 la differenza è risultata statisticamente significativa per la numerazione di Lattobacilli, Micrococcaceae, muffe e lieviti ed SCP. Tra le aziende 2 e 3 la differenza è risultata statisticamente significativa per la numerazione delle Micrococcaceae ed SCP.

L'analisi statistica effettuata sui risultati delle analisi chimico-fisiche e microbiologiche eseguite sulla cagliata è riportata in Tabella 2. Con valori di varianza (aov) inferiori al 5% anche in questo caso le differenze tra le aziende non risultano statisticamente

Tabella 1. Analisi statistica relativa ai campioni di latte (i valori evidenziati in rosa esprimono le differenze statisticamente significative tra le aziende).

Accertamento	Confronto tra le aziende (risultati espressi in percentuale)			
	aov	1-2	1-3	2-3
pH	75,7	21,8	100,0	12,0
Carica batterica mesofila	4,8	0,9	14,5	57,4
Enterobacteriaceae	37,8	10,5	100,0	1,6
Enterococchi	11,4	3,0	34,2	68,7
Lattobacilli	0,2	1,4	0,6	100,0
Lattococchi	3,7	2,7	11,1	100,0
Micrococcaceae	0,0	31,8	0,1	2,4
Muffe e lieviti	1,2	5,3	3,5	100,0
Stafilococchi coagulasi positivi	0,0	3,3	0,0	0,0

Legenda:
aov = varianza

Tabella 2. Analisi statistica relativa ai campioni di cagliata (i valori evidenziati in rosa esprimono le differenze statisticamente significative tra le aziende).

Accertamento	Confronto tra le aziende (risultati espressi in percentuale)			
	aov	1-2	1-3	2-3
pH	29,7	28,5	89,1	100,0
Carica batterica mesofila	6,4	5,9	19,1	100,0
Enterobacteriaceae	25,3	1,8	75,9	19,9
Enterococchi	7,5	3,3	22,6	100,0
Lattobacilli	0,6	0,6	1,8	100,0
Micrococcaceae	7,6	6,9	22,9	100,0
Lattococchi	74,9	29,0	100,0	15,9
Muffe e lieviti	59,0	72,1	100,0	100,0
Stafilococchi coagulasi positivi	0,0	13,1	0,1	5,1

significative. Nel confronto tra le aziende 1 e 2 la differenza è risultata statisticamente significativa per la numerazione dei Lattobacilli. Confrontando le aziende 1 e 3 la differenza è risultata statisticamente significativa per la numerazione dei Lattobacilli ed SCP. Nel confronto tra le aziende 2 e 3 la differenza è risultata statisticamente non significativa per tutti i parametri esaminati.
L'analisi statistica effettuata sui risultati delle analisi chimico-fisiche e microbiologiche eseguite sui formaggi è riportata in Tabella 3 e nelle Figure 11 - 19. In particolare, tutti i parametri misurati sono risultati influenzati in modo statisticamente significativo dall'attività dell'acqua ad esclusione degli Enterococchi per l'azienda 1 e delle muffe e lieviti per l'azienda 3. Nel confronto tra le aziende 1 e 2 le differenze sono risultate statisticamente significative per la numerazione di Enterococchi, Lattobacilli, Lattococchi, muffe e lieviti, SCP e pH. Nel confronto tra le aziende 1 e 3 le differenze sono risultate statisticamente significative per tutti i parametri misurati. Per quanto riguarda il pH nei formaggi delle aziende 1 e 2 è stato possibile evidenziare un processo di lieve alcalinizzazione durante la stagionatura, per l'azienda 3 è stata messa in evidenza, invece, una leggera acidificazione.
I risultati dell'analisi statistica dell'a_w in funzione del tempo sono riportati in Tabella 4 e Figura 20. In particolare, emerge come il periodo di stagionatura influenzi in maniera statisticamente significativa l'attività dell'acqua. Non sono state osservate differenze statisticamente significative tra le aziende riguardo la riduzione dell'attività dell'acqua.

Rilevamento dei parametri chimico-fisici e microbiologici del prodotto in vendita

Il tempo minimo di stagionatura dei formaggi prelevati alla vendita è risultato di 101 giorni, quello medio di 282 e il massimo di 444 giorni. I risultati di tutte le analisi sui campioni prelevati alla vendita

Tabella 3. Analisi statistica relativa ai campioni di formaggio prelevati durante il processo di produzione (i valori evidenziati in rosa esprimono le differenze statisticamente significative tra le aziende).

Accertamento	Significatività (p-val)					
	Intercetta	aw.compl	Azienda2	Azienda3	aw.compl:Azienda2	aw.compl:Azienda3
pH	0%	0%	0%	5%	34%	0%
Carica batterica mesofila	0%	0%	8%	0%	27%	88%
Enterobacteriaceae	0%	0%	22%	3%	28%	1%
Enterococchi	0%	39%	0%	0%	1%	0%
Lattobacilli	0%	0%	0%	0%	0%	1%
Lattococchi	0%	0%	37%	40%	0%	0%
Micrococcaceae	0%	0%	74%	78%	64%	0%
Muffe e lieviti	0%	0%	61%	0%	52%	2%
Stafilococchi coagulasi positivi	0%	0%	0%	0%	5%	0%

Figura 11. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della carica batterica mesofila (CBM) di formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate sui campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

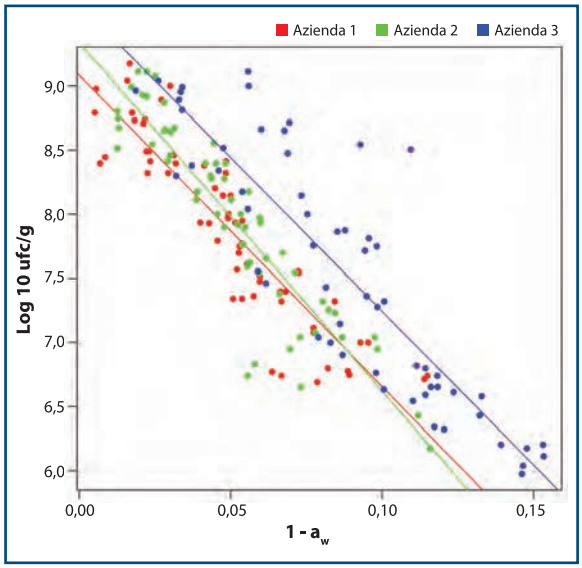


Figura 12. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione delle Enterobacteriaceae in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

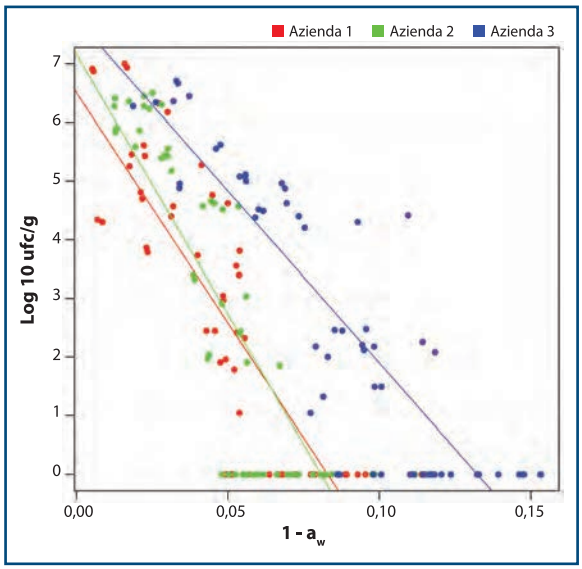


Figura 13. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Enterococchi in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

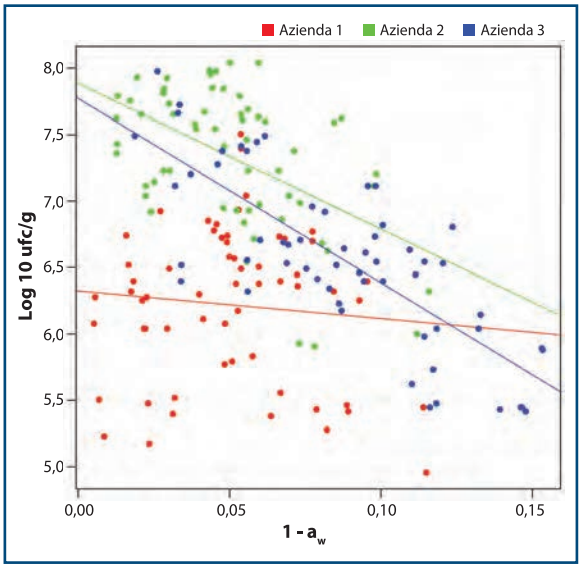
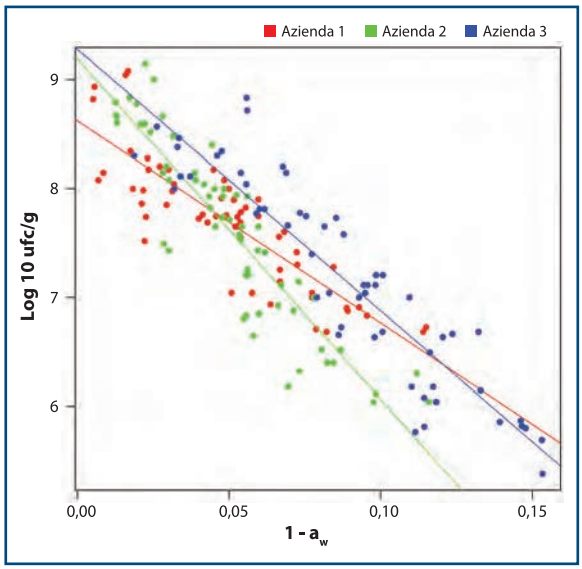


Figura 14. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Lattobacilli in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).



sono sintetizzati in Tabella 5.

Determinazione pH

I valori medi di pH nei 31 campioni di formaggio prodotti dall'azienda 1 sono stati 5,77 ± 0,18 (5,50 - 6,24), nei 48 campioni di prodotti dall'azienda 2 di 5,40 ± 0,17 (5,03 - 5,69), nei 10 campioni dell'azienda 3 di 5,55 ± 0,08 (5,39 - 5,68), nei 12 campioni di formaggio prodotto dall'azienda 4 è stato rilevato il valore medio di pH pari a 5,27 ± 0,22 (4,94 - 5,61).

Determinazione a_w

I valori medi di a_w rilevati nei 31 campioni di formaggio prodotti dall'azienda 1 sono risultati di 0,900 ± 0,021 (0,810 - 0,922), nei 48 campioni dell'azienda 2 di 0,891 ± 0,014 (0,862 - 0,952), nei 10 campioni dell'azienda 3 di 0,927 ± 0,005 (0,921 - 0,941) e nei 12 campioni di formaggio prodotti dall'azienda 4 sono stati rilevati il valore medio di a_w

Figura 15. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Lattococchi in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

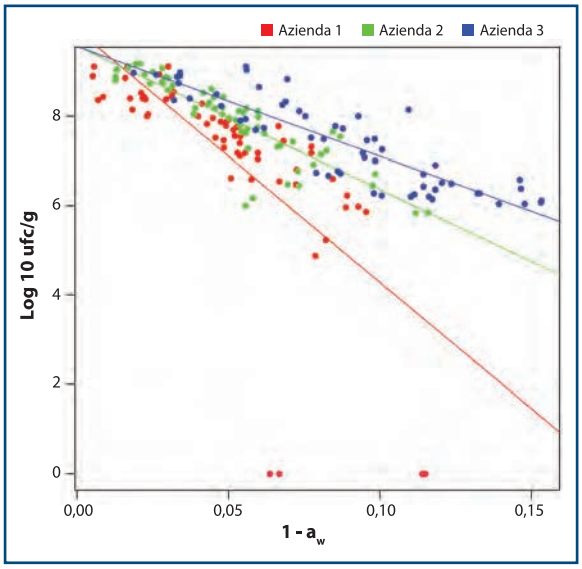


Figura 16. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Micrococcaceae in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

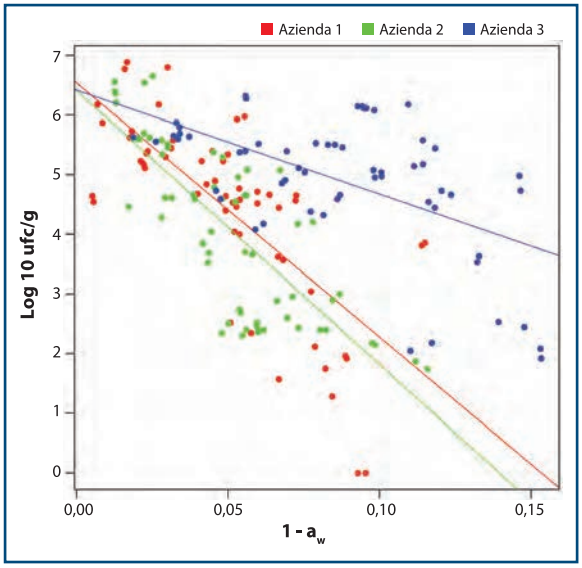


Figura 17. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di muffe e lieviti in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

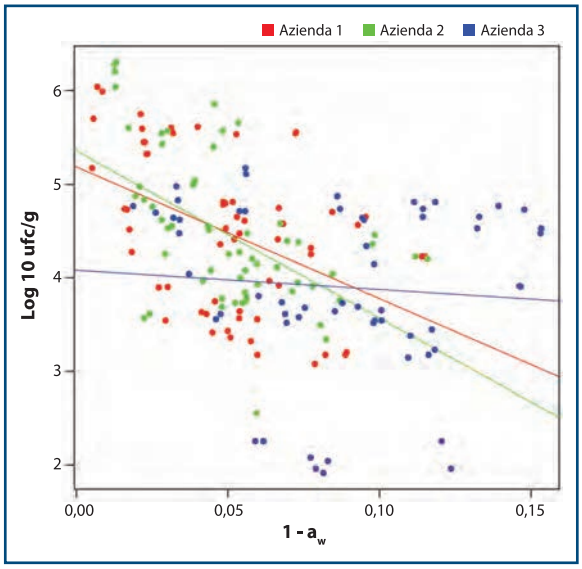
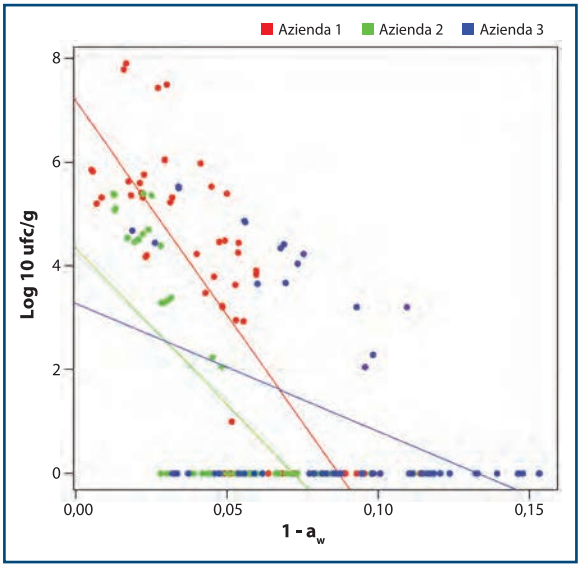


Figura 18. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Stafilococchi coagulasi positivi in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).



pari a 0,912 ± 0,009 (0,890 - 0,919).

Carica batterica mesofila

I valori medi di CBM nei 31 campioni di formaggio dell'azienda 1 e nei 48 dell'azienda 2 sono risultati di 6,42 $\log_{10}$UFC/g ± 0,62 $\log_{10}$UFC/g (4,61 - 7,73), nei 10 campioni dell'azienda 3 di 7,41 $\log_{10}$UFC/g ± 0,29 $\log_{10}$UFC/g (6,81 - 7,86), nei 12 campioni di formaggio prodotto dall'azienda 4 è stato rilevato il valore medio di CBM pari a 5,90 $\log_{10}$UFC/g ± 0,99 $\log_{10}$UFC/g (4,32 - 8,59).

Numerazione Enterobacteriaceae

Il valore medio della numerazione di Enterobacteriaceae nei 31 campioni di formaggio dell'azienda 1, nei 48 dell'azienda 2 e in 11 campioni su 12 dell'azienda 4 è risultato al di sotto del LOD. In un solo campione di formaggio, quello rimanente dell'azienda 4, è stato rilevato un valore medio pari a 0,85 $\log_{10}$UFC/g (<LOD - 1,70). Nei 10 campioni di

Figura 19. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati di pH in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

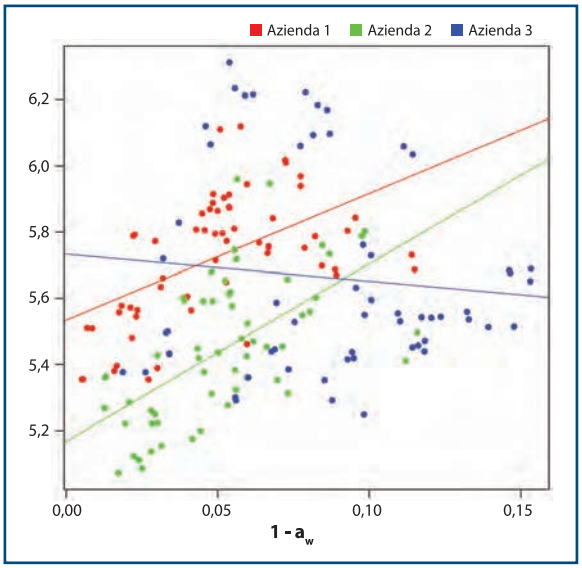


Figura 20. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati di aw in formaggi prelevati durante il processo di produzione. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu).

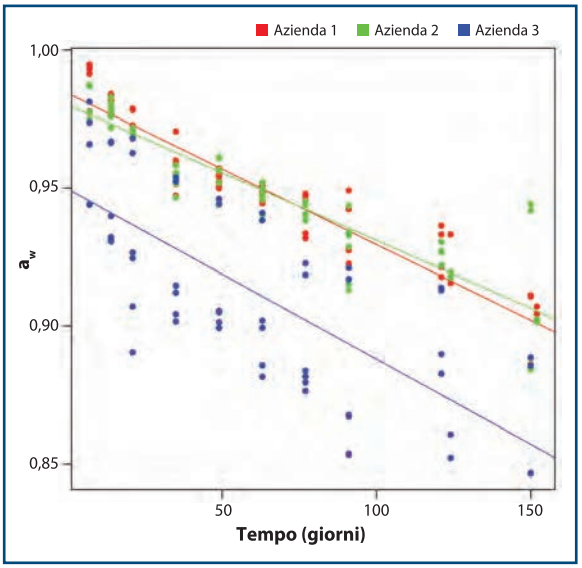


Tabella 4.. Analisi statistica relativa ai campioni di formaggio prelevati durante il processo di produzione, in relazione ai risultati dell'attività dell'acqua e il tempo di stagionatura (i valori evidenziati in rosa esprimono le differenze statisticamente significative tra le aziende).

aw vs tempo	Significatività (p-val)					
	Intercetta	aw.compl	Azienda2	Azienda3	aw.compl:Azienda2	aw.compl:Azienda3
	0%	0%	40%	0%	38%	31%

Tabella 5. Risultati degli esami microbiologici, attività dell'acqua (a_w) e pH eseguiti sui campioni di formaggio prelevati alla vendita.

Descrizione della prova e unità di misura	Valore minimo	Valore medio	Valore massimo	SD
Determinazione del pH	4,94	5,2	6,23	0,25
Determinazione dell'attività dell'acqua (a_w)	0,89	0,919	0,93	0,019
Conta delle colonie a 30°C - (log_{10} UFC/g)	4,32	7,08	8,59	0,74
Numerazione delle Enterobatteriaceae (log_{10} UFC/g)	1	2,38	3,11	0,5
Numerazione di Enterococchi (log_{10} UFC/g)	3,58	6,78	8,32	0,87
Numerazione di Lattobacilli (log_{10} UFC/g)	4,6	7,86	9,71	0,94
Numerazione di Lattococchi (log_{10} UFC/g)	4,38	7,18	8,76	0,78
Numerazione delle Micrococcaceae (log_{10} UFC/g)	1,9	5,32	6,93	1,17
Numerazione di lieviti e muffe (log_{10} UFC/g)	1	3,85	5,18	0,99
Numerazione di Stafilococchi coagulasi positivi (log_{10})	<LOD	<LOD	<LOD	0

formaggio prodotto dall'azienda 3 il valore medio è risultato pari a 1,21 log_{10}UFC/g ± 1,07 log_{10}UFC/g (<LOD - 3,11).

Numerazione Enterococchi

Il valore medio della numerazione di Enterococchi nei 31 campioni di formaggio dell'azienda 1 e nei 48 dell'azienda 2, è stato di 6,10 log_{10}UFC/g ± 0,73 log_{10}UFC/g (4,11 - 7,76). Nei 10 formaggi dell'azienda 3 è risultato di 6,30 log_{10}UFC/g ± 0,34 log_{10}UFC/g (5,76 - 7,18) e nei 12 dell'azienda 4 è stato di 5,12 log_{10}UFC/g ± 1,27 log_{10}UFC/g (3,58 - 8,32).

Numerazione Lattobacilli

Il valore medio della numerazione di Lattobacilli nei 31 campioni di formaggio dell'azienda 1 è stato 7,12

log_{10}UFC/g ± 0,53 log_{10}UFC/g (6,23 - 8,53), nei 48 dell'azienda 2 di 5,78 log_{10}UFC/g ± 0,54 log_{10}UFC/g (4,60 - 7,04). Nei 10 formaggi dell'azienda 3 è risultato di 7,59 log_{10}UFC/g ± 0,70 log_{10}UFC/g (6,49 - 8,70) e nei 12 dell'azienda 4 è stato di 6,81 log_{10}UFC/g ± 1,03 log_{10}UFC/g (5,72 - 9,71).

Numerazione Lattococchi

Il valore medio della numerazione di Lattococchi nei 31 campioni di formaggio dell'azienda 1 è stato di 7,00 log_{10}UFC/g ± 0,41 log_{10}UFC/g (5,79 - 8,45) e nei 48 dell'azienda 2 di 6,32 log_{10}UFC/g ± 0,70 log_{10}UFC/g (4,96 – 7,71). Nei 10 formaggi dell'azienda 3 è risultato di 7,07 log_{10}UFC/g ± 0,22 log_{10}UFC/g (6,70 - 7,53) e nei 12 dell'azienda 4 è stato di 5,80 log_{10}UFC/g ± 1,1 log_{10}UFC/g (5,72 – 8,76).

Numerazione Micrococcaceae

Il valore medio della numerazione di Micrococcaceae nei 31 campioni di formaggio dell'azienda 1, nei 48 dell'azienda 2 e nei 12 dell'azienda 4 è risultato di 3,93 log_{10}UFC/g ± 1,18 log_{10}UFC/g (<LOD - 6,93). Nei 10 campioni di formaggio dell'azienda 3 è stato di 5,50 log_{10}UFC/g ± 0,41 log_{10}UFC/g (4,74 - 6,18).

Numerazione muffe e lieviti

Il valore medio della numerazione di muffe e lieviti è stato di 3,21 log_{10}UFC/g ± 0,95log_{10}UFC/g (<LOD e 5,18) negli 86 campioni di formaggio con stagionatura compresa tra T100 e T405. Nei 15 campioni con stagionatura compresa tra T405 e T444 il valore ha mostrato una diminuzione fino a 1 log_{10}UFC/g.

Analisi statistica

L'analisi statistica dei risultati chimico-fisici e microbiologici dei formaggi prelevati alla vendita è riportata in Tabella 6 e Figure 21 - 28. L'effetto dell'attività dell'acqua è risultato statisticamente significativo per la numerazione di muffe e lieviti nei campioni di tutte le aziende e per il pH nei campioni delle aziende 1, 2 e 3, ma non statisticamente significativo per gli altri parametri. Il confronto tra i campioni delle aziende 1 e 2 ha permesso di rilevare una differenza statisticamente significativa per la CBM e per la numerazione di Enterococchi, Lattobacilli e Lattococchi. Il confronto tra i campioni delle aziende 1 e 3 ha evidenziato una differenza statisticamente significativa per la sola numerazione delle Enterobacteriaceae. Tra i campionwwwwi delle aziende 1 e 4 una differenza statisticamente significativa è stata riscontrata per il pH e la numerazione dei Lattobacilli. L'analisi ha, inoltre, permesso di rilevare che l'effetto del tempo di stagionatura sull'a_w è stato statisticamente significativo come si evince in Tabella 7 e Figura 29. I risultati relativi all'a_w, messi a confronto, hanno evidenziato differenze statisticamente significative tra le aziende 1 e 2 e tra le aziende 1 e 4.

Discussione

Nello studio i valori di pH osservati nel latte e nella cagliata sono risultati simili a quelli ottenuti da Randazzo *et al.* (23) nel pecorino siciliano, rilevando valori di pH pari a 6,70 nel latte e 6,60 nella cagliata. I valori medi di pH a T7 e T90 sono risultati ugualmente simili a quanto osservato da Tofalo *et al.* (26) che hanno riportato nel Pecorino di Farindola a T7 un pH di 5,32 ± 0,03 e a T90 5,48 ± 0,14. Schirone *et al.* (25) nel Pecorino di Farindola hanno invece rilevato a T90 valori compresi tra 5,13 e 5,72, quindi solo leggermente inferiori a quelli ottenuti in questo studio. Coda *et al.* (4) hanno rilevato in altri pecorini

Tabella 6.. Analisi statistica relativa ai campioni di formaggio prelevati alla vendita (i valori evidenziati in rosa esprimono le differenze statisticamente significative tra le aziende).

Accertamento	Significatività (p-val)							
	Intercetta	a_w. compl:	Azienda 2	Azienda 3	Azienda 4	aw.compl: Azienda2	aw.compl: Azienda3	aw.compl: Azienda3
pH	0,0%	3,4%	10,6%	88,3%	0,0%	65,6%	69,6%	0,0%
Carica batterica mesofila	0,0%	24,4%	6,3%	47,3%	75,2%	0,3%	63,8%	61,9%
Enterobacteriaceae	100,0%	100,0%	100,0%	0,0%	39,6%	100,0%	0,0%	44,5%
Enterococchi	0,0%	57,6%	3,0%	37,6%	77,6%	0,5%	44,1%	29,8%
Lattobacilli	0,0%	18,1%	93,9%	67,3%	0,1%	3,4%	80,7%	0,0%
Lattococchi	0,0%	22,2%	0,5%	68,0%	12,6%	0,0%	65,5%	53,0%
Micrococcaceae	0,0%	31,4%	28,4%	39,8%	31,4%	43,3%	59,6%	12,0%
Muffe e lieviti	0,0%	0,0%	99,0%	58,0%	69,4%	85,6%	68,6%	86,9%
Stafilococchi coagulasi positivi	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Figura 21. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della carica batterica mesofila in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero)

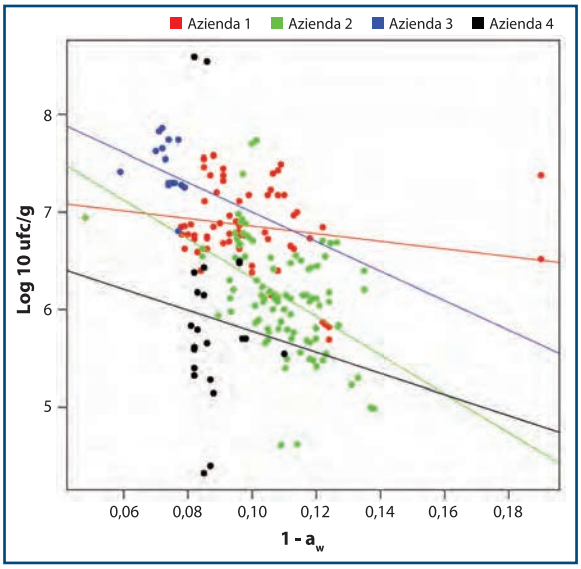


Figura 22. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Enterobacteriaceae in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).

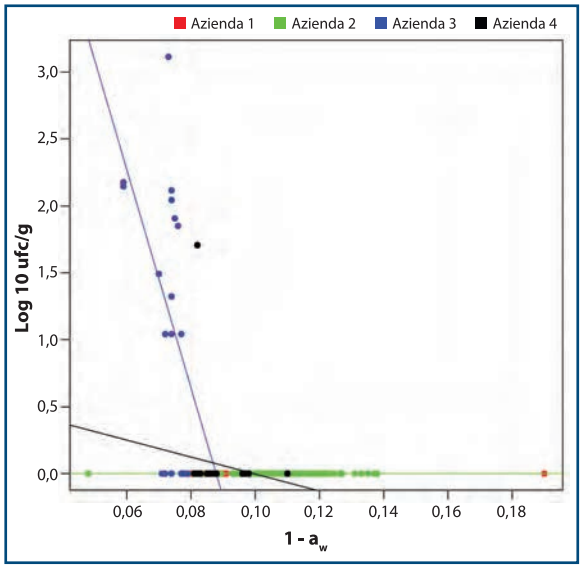


Figura 23. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Enterococchi in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).

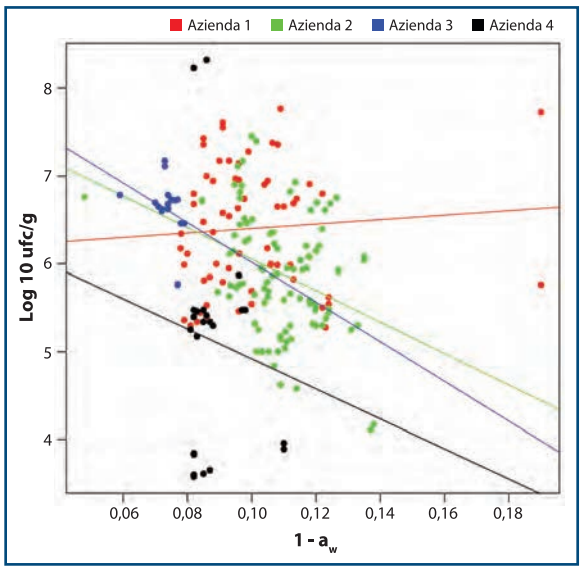
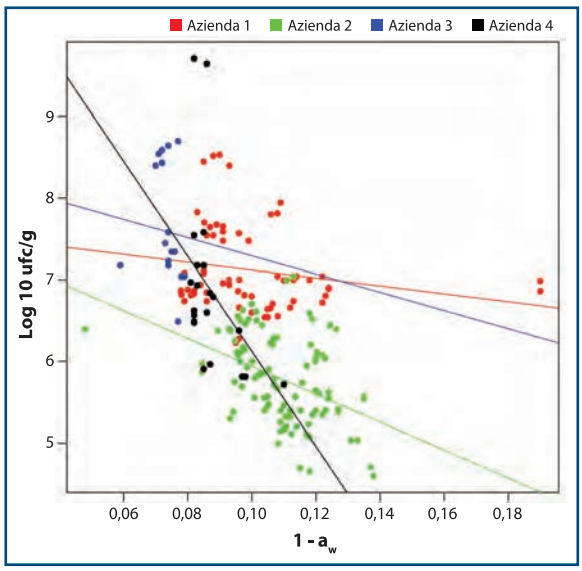


Figura 24. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Lattobacilli in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).



italiani valori di pH a T150 compresi tra 4,68 e 5,80 vicini a quelli osservati in questo lavoro.

Per quanto riguarda l'a_w dopo 90 giorni di *stagionatura*, il presente studio ha ottenuto risultati analoghi a quelli riportati in letteratura da Schirone *et al.* (25), che nel Pecorino di Farindola dopo lo stesso periodo di stagionatura hanno rilevato valori compresi tra 0,89 e 0,97.

In relazione alla CBM in latte e cagliata i dati indicano una maggiore contaminazione della materia prima nel pecorino di Farindola rispetto a quanto riportato da Proroga *et al.* (22) che hanno rilevato valori medi di 4,26 - 4,90 log_{10}UFC/ml nel latte e di 5,78 log_{10}UFC/g nella cagliata nel pecorino di Laticauda. Nello stesso studio, i valori di CBM sono aumentati in maggior misura, raggiungendo a T4 il valore di 9,23 log_{10}UFC/g, che diminuiva fino a 8,27 log_{10}UFC/g a T101. Anche nel presente studio, la CBM ha mostrato

Figura 25. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Lattococchi in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).

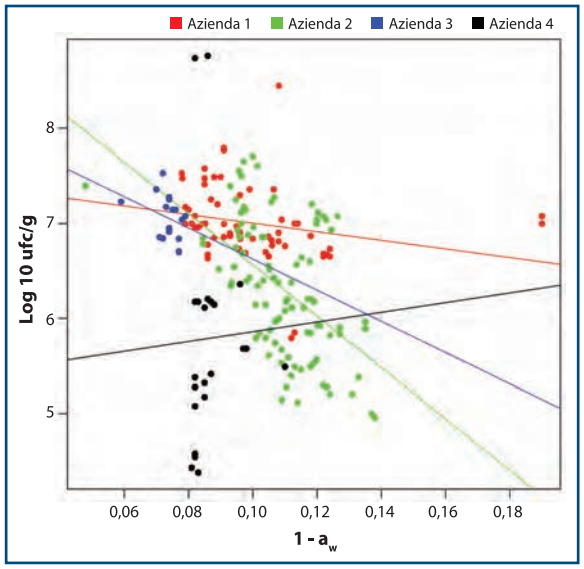


Figura 26. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di Micrococcaceae in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).

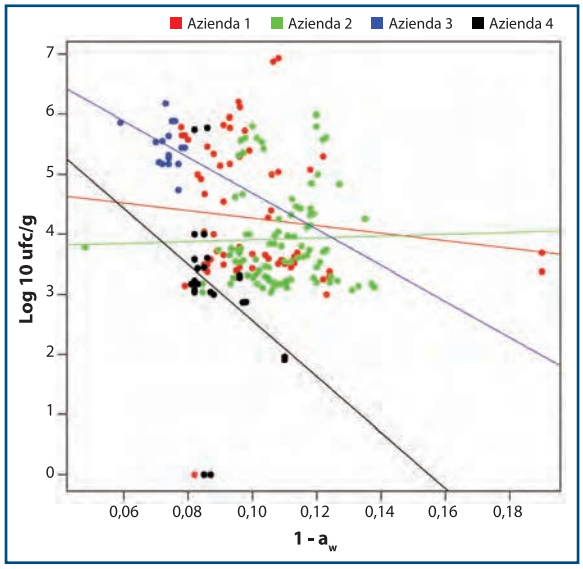


Figura 27. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati della numerazione di muffe e lieviti in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).

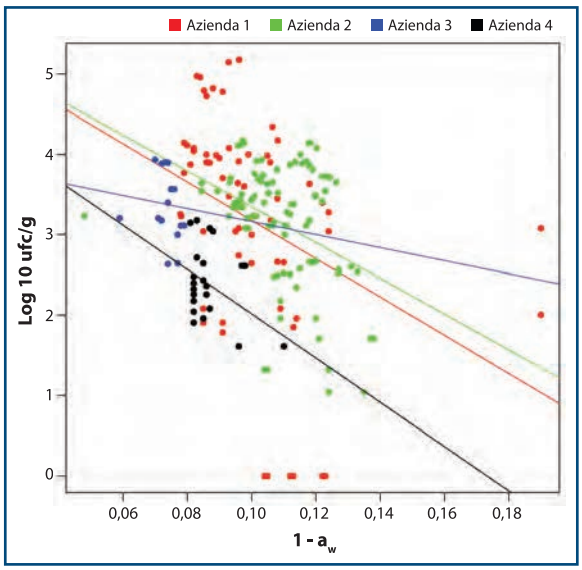
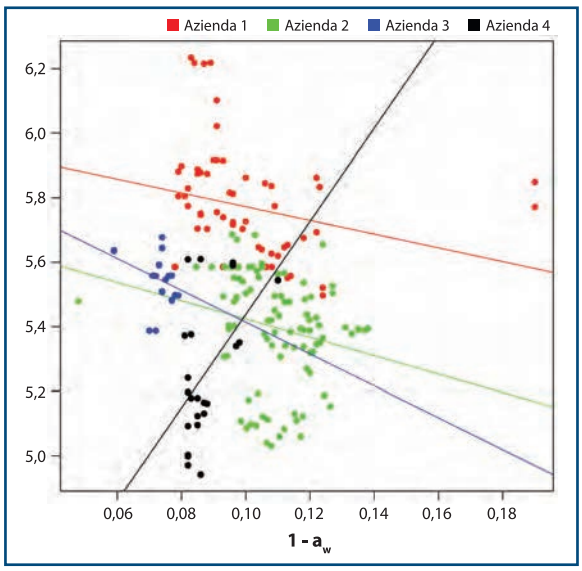


Figura 28. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati di pH in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).



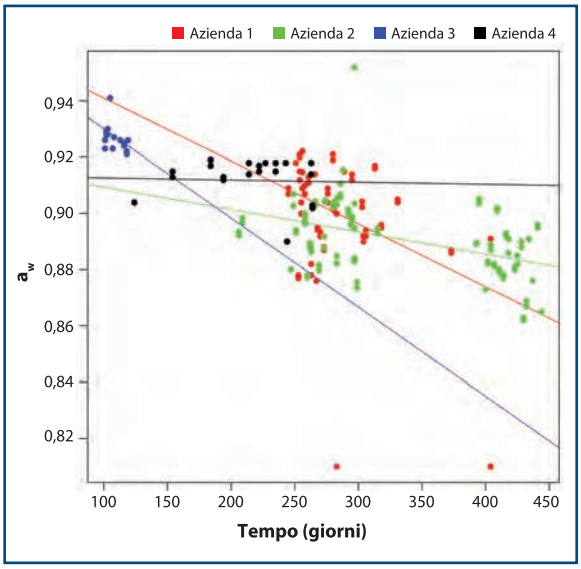
una riduzione graduale nel corso della stagionatura con risultati simili anche a quelli ottenuti da Coppola *et al.* (5) nel pecorino Carmasciano prodotto con latte crudo e senza aggiunta di colture starter. In questo stesso studio sul pecorino Carmasciano gli autori hanno osservato un aumento della CBM nell'intervallo di tempo T3 - T8 fino a 9 $\log_{10}$UFC/g cui seguiva un lento decremento fino a T240. Tofalo *et al.* (26) hanno seguito la stagionatura di tre differenti lotti di Pecorino di Farindola, prodotti con tre tipi di caglio, l'andamento della CBM nel lotto prodotto con caglio suino è risultato sovrapponibile all'andamento dei 9 lotti di prodotto studiati nel corso di questa sperimentazione, ad eccezione del prelievo a T90 in cui i risultati ottenuti da Tofalo *et al.* (26) sono risultati più elevati.

Per quel che riguarda le Enterobacteriaceae, i risultati ottenuti mostrano un valore massimo tra T7 e T21,

Tabella 7. Analisi statistica relativa ai campioni di formaggio prelevati alla vendita, in relazione ai risultati dell'attività dell'acqua e il tempo di stagionatura (i valori evidenziati in rosa esprimono le differenze statisticamente significative tra le aziende). I risultati sono espressi in p-val.

aw vs tempo	Intercetta	a_w. compl:	Azienda 2	Azienda 3	Azienda 4	aw.compl: Azienda2	aw.compl: Azienda3	aw.compl: Azienda3
	0,0%	0,0%	0,5%	98,0%	1,9%	0,9%	85,0%	1,4%

Figura 29. Analisi statistica: rappresentazione grafica dei risultati di aw in formaggi prelevati alla vendita. Le rette rappresentano la regressione lineare delle numerazioni effettuate su campioni delle tre aziende (azienda1 in rosso, azienda 2 in verde, azienda 3 in blu, azienda 4 in nero).



similmente a Randazzo *et al*. (23) che nel Pecorino Siciliano hanno osservato a T10 valori di 8,83 log_{10}UFC/g, che però sono risultati notevolmente superiori a quelli evidenziati nel presente studio. I prodotti analizzati, infatti, si sono generalmente mostrati sfavorevoli alla sopravvivenza delle Enterobacteriaceae, con una diminuzione in tutti i lotti nel corso della stagionatura fino al di sotto del LOD tra T91 e T120, diversamente da quanto rilevato da Coppola *et al*. (5) nel pecorino Carmasciano che a T180 giorni hanno continuato a dimostrare la presenza di Enterobacteriaceae. Giammanco *et al* (8) in campioni di Pecorino Siciliano DOP "primosale" hanno rilevato concentrazioni di Enterobacteriaceae comprese tra 2,77 e 9,88 log_{10}UFC/g nei formaggi di tutte le aziende coinvolte nel loro studio. Bisogna comunque segnalare che in un precedente lavoro di Schirone *et al*. (25) nel Pecorino di Farindola sono stati rilevati a T90 valori compresi tra 3 e 4 log_{10}UFC/g in formaggi provenienti da due aziende su dieci. Nelle restanti 8 aziende il valore rilevato è risultato inferiore al LOD. Dal lavoro di Chaves-Lopez *et al*. si evince che la graduale diminuzione della concentrazione delle Enterobacteriaceae nel corso della stagionatura può essere attribuita all'abbassamento del pH in combinazione con altri fattori come l'aumento del contenuto di NaCl e la riduzione di a_w (3).

Gli Enterococchi hanno mostrato di adattarsi meglio all'ambiente del Pecorino di Farindola con valori costantemente elevati nel corso dell'intera stagionatura. Proroga *et al*. (22) hanno riportato valori medi nel latte di 1,50 - 2,30 log_{10}UFC/ml e di 3,92 log_{10}UFC/g nella cagliata, valori inferiori a quelli riscontrati nel presente studio. Schirone *et al*.(25) nel Pecorino di Farindola hanno rilevato a T90 valori compresi tra 6,04 e 8,21 log_{10}UFC/g, simili a quelli rilevati nel presente studio. Proroga *et al*. (22) hanno osservato nel pecorino di Laticauda concentrazioni medie alla salatura di 4,78 log_{10}UFC/g, con successivo aumento della concentrazione fino al valore medio di 6,82 log_{10}UFC/g a T15 e successiva diminuzione fino a 6,36 log_{10}UFC/g a T101. Di Giacomo *et al*. (7) hanno osservato nel Pecorino di Farindola, all'inizio della stagionatura valori di 2,70 log_{10}UFC/g, a T90 valori di 2,40 log_{10}UFC/g, a T180 valori di 1,70 log_{10}UFC/g e valori di 2,54 log_{10}UFC/g a T270. Anche Tofalo *et al*. (26) nel Pecorino di Farindola hanno ottenuto risultati simili a quelli del presente studio e andamenti sovrapponibili, mettendo in evidenza una concentrazione di Enterococchi pressoché costante. La persistenza di questi microrganismi durante la stagionatura potrebbe essere correlata alla capacità di moltiplicarsi a temperature basse (25), alla loro tolleranza a calore, pH acido (4,0 - 9,6) e contenuto di sale nell'alimento fino al 6,5% (9).

Lattobacilli e Lattococchi sono le popolazioni microbiche autoctone con maggior sviluppo e persistenza nel Pecorino di Farindola, particolarmente durante la stagionatura. La concentrazione media di Lattobacilli nel latte è risultata di 5,64 log_{10}UFC/ml (4,48 - 7,33). Rispetto ai dati riportati da Proroga *et al*. (22) nel pecorino di Laticauda, che hanno rilevato valori medi nel latte di 1,50 - 2,20 log_{10}UFC/ml e nella cagliata di 2,5 log_{10}UFC/ml, i Lattobacilli nel Pecorino di Farindola nel presente studio sono stati rilevati a concentrazioni più elevate fin dalla materia prima utilizzata per la produzione. L'andamento di Lattobacilli e Lattococchi nel corso della stagionatura nel presente studio ha mostrato per entrambe le popolazioni di microrganismi un iniziale incremento seguito da una graduale e

lieve riduzione, pur restando a livelli normalmente superiori a 6 log_{10}UFC/g. I valori riscontrati nel corso stagionatura sono risultati simili a quelli rilevati in altri studi svolti sia sul Pecorino di Farindola che su altri pecorini italiani. In particolare, Schirone *et al*. (25) nel Pecorino di Farindola hanno rilevato a T90 valori di Lattobacilli mesofili compresi tra 5,31 e 7,27 log_{10}UFC/g. Di Giacomo *et al*. (7) hanno osservato valori a inizio stagionatura di 7,15 log_{10}UFC/g a T90 di 7,92 log_{10}UFC/g a T180 di 6,65 log_{10}UFC/g e di 5,18 log_{10}UFC/g a T270. Proroga *et al*. (22) nel pecorino di Laticauda hanno seguito due lotti fino a 100 giorni di stagionatura ottenendo concentrazioni medie di Lattobacilli comprese tra i valori di 3,0 log_{10}UFC/g alla salatura e aumento progressivo fino 8 log_{10}UFC/g a T71. Coda *et al*. (4) hanno rilevato concentrazioni di Lattobacilli mesofili alla fine della stagionatura comprese tra 3,2 e 8,27 log_{10}UFC/g, i valori più bassi sono stati rilevati nel pecorino umbro e in quello di Pienza (rispettivamente 3,2 log_{10}UFC/g e 5,28 log_{10}UFC/g), gli unici tra quelli studiati prodotti con latte pastorizzato. In tutti gli altri pecorini i valori rilevati sono stati sempre superiori a 6 log_{10} UFC/g.

Per i Lattococchi, Proroga *et al*. (22) nel pecorino di Laticauda hanno riportato valori medi nel latte e nella cagliata di 1,8-4,5 log_{10}UFC/ml e 4 log_{10}UFC/ml, rispettivamente. L'andamento della concentrazione dei Lattococchi osservato nel nostro studio è analogo a quanto osservato da Scatassa *et al*. (24) che hanno rilevato valori compresi tra 4 e 8 log_{10}UFC/g fino a 9 settimane di stagionatura nel Pecorino Siciliano. Schirone *et al*. (25) nel Pecorino di Farindola hanno rilevato a T90 valori compresi tra 5,17 e 7,27 log_{10}UFC/g. Di Giacomo *et al*. (7) hanno ottenuto valori medi a inizio stagionatura di 8,38 log_{10}UFC/g, a T90 di 7,38 log_{10}UFC/g, a T180 di 6,75 log_{10}UFC/g e a T270 di 6,30 log_{10}UFC/g. Proroga *et al*. (22) hanno seguito due lotti di pecorino di Laticauda fino a 100 giorni di stagionatura ottenendo concentrazioni medie di Lattococchi nel formaggio dopo salatura di 8,0 log_{10}UFC/g, successivamente hanno osservato un aumento della concentrazione fino a T4 con valori di 9,2 log_{10}UFC/g e successivamente diminuzione fino a T71 con concentrazioni medie pari a 7,2 log_{10}UFC/g.

Per le Micrococcaceae la concentrazione ha presentato un andamento simile a quello di Lattobacilli e Lattococchi, con valori più bassi, oscillanti tra 2 e 6,5 log_{10}UFC/g. In letteratura sono disponibili pochi dati comparabili, in particolare, Proroga *et al*. (22) hanno riportato valori medi di "Microstafilococchi" in latte e cagliata di pecorino di Laticauda di 2-4,5 log_{10}UFC/ml nel latte e di 3,5 log_{10}UFC/g nella cagliata. Coppola *et al*. (5) nel pecorino Carmasciano hanno riportato andamento e livelli di Micrococcaceae simili a quanto riscontrato nel presente studio. Proroga *et al*. (22) hanno, inoltre, studiato due lotti di pecorino di Laticauda fino a 100 giorni di stagionatura rilevando concentrazioni di "Microstafilococchi" nel formaggio da valori medi di 4,2 log_{10}UFC/g alla salatura, a valori compresi tra 5,7 log_{10}UFC/g e 6,2 log_{10}UFC/g a T71.

Per quanto riguarda di muffe e lieviti la concentrazione riscontrata ha mostrato livelli di circa 4 - 5 log_{10}UFC/ml durante il processo di produzione, non differenziandosi in maniera rilevante da quanto riportato in studi effettuati in precedenza sul Pecorino di Farindola e su altri pecorini. Proroga *et al.* (22) nel pecorino di Laticauda hanno riportato valori medi nel latte di 3,06 - 3,76 log_{10}UFC/ml e di 3,44 log_{10}UFC/g nella cagliata. Coppola *et al*. (5) nel pecorino Carmasciano hanno osservato valori di 4 – 5 log_{10}UFC/g nel corso del processo di produzione, con estremi di 8 log_{10}UFC/g nei primissimi giorni di stagionatura. Schirone *et al*. (25) nel Pecorino di Farindola hanno riportato solo i valori dei lieviti, rilevati a T90, ottenendo concentrazioni comprese tra 2,36 e 4,38 log_{10}UFC/g. Proroga *et al*. (22) nel pecorino di Laticauda hanno ottenuto valori medi di 2,39 log_{10}UFC/g alla salatura e valori oscillanti durante la stagionatura di circa 2 log_{10}UFC/g, con un massimo di 6,01 log_{10}UFC/g. Anche Di Giacomo *et al*. (7) hanno riportato valori simili o solo leggermente più elevati rispetto ai risultati ottenuti nel presente studio, in particolare a inizio stagionatura hanno ottenuto valori di 5,44 log_{10}UFC/g, a T90 di 7,96 log_{10}UFC/g, a T180 di 5,29 log_{10}UFC/g e a T270 di 4,36 log_{10}UFC/g.

Di particolare interesse è quanto rilevato sul comportamento degli stafilococchi coagulasi positivi (SCP). Infatti, le caratteristiche del processo di produzione del Pecorino di Farindola permettono la riduzione degli SCP a livelli inferiori al LOD normalmente tra T35 e T49, anche in presenza di concentrazioni piuttosto elevate nella materia prima (3,5 log_{10}UFC/g). E' necessario precisare che in una delle tre aziende sottoposte allo studio, in presenza di cariche iniziali decisamente più alte (4,5 - 5log_{10}UFC/g) gli SCP non sono risultati più rilevabili solo a T91. In ogni caso, la non rilevabilità di SCP dal Pecorino di Farindola è confermata da quanto osservato nei prodotti prelevati alla vendita, dove non sono stati riscontrati campioni con concentrazioni superiori al LOD. In letteratura, per quanto riguarda gli SCP, sono disponibili risultati solo su altri pecorini. Proroga *et al*. (22) hanno rilevato nel pecorino di Laticauda valori di SCP sotto il LOD tra T71 e T100, anche in presenza di concentrazioni

iniziali nel latte (1,58 - 1,68 log_{10}UFC/g) molto più basse rispetto a quelle osservate nel presente studio. Giammanco *et al*. (8) in campioni di Pecorino Siciliano DOP "primosale" hanno rilevato, in 49 su 50 campioni acquistati al dettaglio, concentrazioni di SCP superiori a 3,78 log_{10}UFC/g e nel 50% dei campioni superiori a 7 log_{10}UFC/g.

Conclusioni

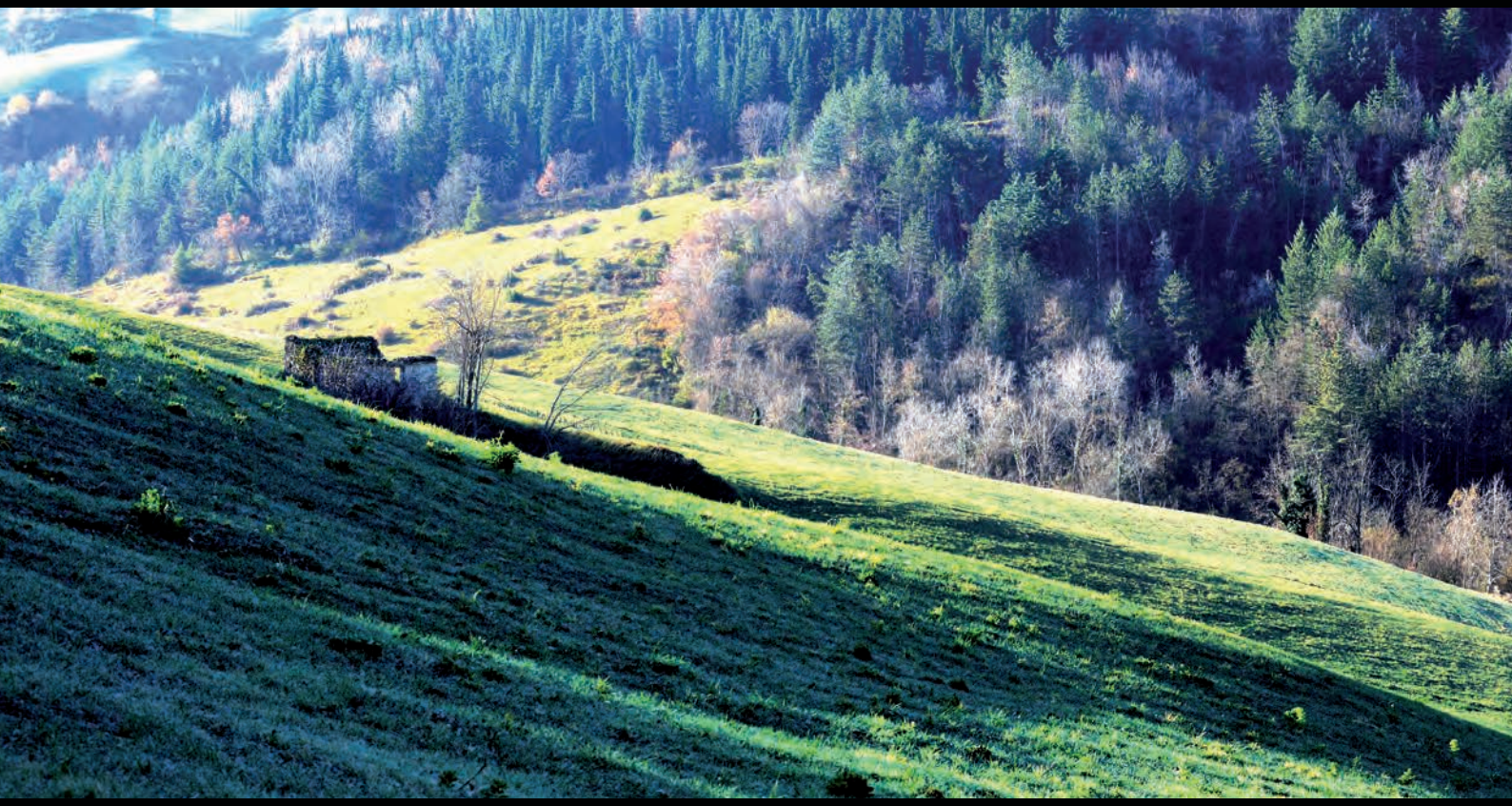
Le differenze statisticamente significative dei risultati microbiologici relativi alla materia prima utilizzata dalle diverse aziende, rilevate anche nella cagliata e in maniera ancor più evidente nel formaggio, inducono a ritenere questo aspetto determinante per le caratteristiche igienico-sanitarie e organolettiche del Pecorino di Farindola. Può essere considerata rassicurante, per la sicurezza alimentare e, quindi, per il consumatore, l'assenza di stafilococchi coagulasi positivi riscontrata nei prodotti in commercio. L'eventuale produzione di tossine da parte di questi microrganismi, soprattutto in presenza di concentrazioni elevate in alcuni campioni di latte impiegato, non può, comunque, essere esclusa. Visto che il processo di produzione del Pecorino di Farindola, formaggio a latte crudo, non può determinare drastiche azioni risananti, gli autori auspicano il rispetto delle prassi corrette di mungitura e la loro introduzione nel piano di autocontrollo aziendale.

Bibliografia

1. Aureli P., A. Fiore, C. Scalfaro e G. Franciosa, 2008. Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 08/36).
2. Beresford T.P., N.A. Fitzsimons, N.L. Brennan and T.M. Cogan, 2001. Recent advances in cheese microbiology. Int. Dairy J., 11: 259-274.
3. Chaves-Lopez C., M. De Angelis, M. Martuscelli, A. Serio, A. Paparella and G. Suzzi, 2006. Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). J. Appl. Microbiol., 101: 353-360.
4. Coda R., E. Brechany, M. De Angelis, S. De Candia, R. Di Cagno and M. Gobbetti, 2006. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and Volatile profile characteristics of nine italian ewes'milk cheeses. J. Dairy Sci., 89: 4126-4143.
5. Coppola R., M. Succi, S. Pacifico, P. Tremonte, A. Reale e E. Sorrentino, 2006. Caratterizzazione microbiologica di un formaggio della tradizione irpina: il pecorino Carmasciano. Scienza e tecnica lattiero casearia, 57(3): 147-162.
6. Dcreto ministeriale 26 marzo 1992. Attuazione della decisione n. 91/180/CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente. (GU Serie Generale n.90 del 16-4-1992 - Suppl. Ordinario n. 67).
7. Di Giacomo F., N. Casolani and A. Del Signore, 2014. Cheese making using pig and calf rennet: microrganisms and volatile compounds in Farindola ewe cheese. Italian Journal Food Sci., 26: 153-161.
8. Giammanco G.M., A. Pepe, A. Aleo, V. D'Agostino, S. Milone and C. Mammina, 2011. Microbiological quality of Pecorino Siciliano "primosale" cheese on retail sale in the street markets of Palermo, Italy. New Microbiol., 34(2): 179-85.
9. Giraffa G., 2003. Functionally of enterococci in dairy products. Int. J. Food Microbiol., 88: 215-222.
10. International Organization For Standardization (ISO), 1998. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C.
11. International Organization For Standardization (ISO), 1999. ISO 6888-2. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species) - Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.
12. International Organization for Standardization (ISO), 1999. ISO6887-1:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
13. International Organization for Standardization (ISO), 2003. ISO 6888-2:1999/Amd 1:2003 Inclusion of precision data.
14. International Organization for Standardization (ISO), 2004. ISO21528-2 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method.
15. International Organization For Standardization (ISO), 2008. ISO21527-1:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,95.
16. International Organization for Standardization (ISO), 2008. ISO21527-2:2008 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds - Part 2: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.
17. International Organization For Standardization

(ISO), 2008. ISO707:2008(E) Milk and milk products - Guidance on sampling.

18. International Organization For Standardization (ISO), 2010. ISO6887-5:2010. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.
19. International Organization For Standardization (ISO), 2013. ISO 4833-1:2013. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 degrees C by the pour plate technique.
20. International Organization For Standardization (ISO), 2004. ISO 21807:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Determination of water activity.
21. Nordic Committee on Food Analysis, 2004. NMKL 68. Enterococcus. Determination in foods and feeds. Enterococcus. NMKL Edition: 2004, 4 ed.
22. Proroga Y.T.R., A. Cerrone, O. Valvini, S. Castellano, M.R. Carullo, D. Bove, A. Guarino e G. Iovane, 2009. Caratterizzazione microbiologica di un formaggio tipico italiano: pecorino di laticauda (parte 1). A.I.V.I. Settembre 2009 n. 5.
23. Randazzo C.L., R.T. La Cava, C. Restuccia, A.D. Romano e C. Caggia, 2003. Evoluzione della popolazione microbica durante il processo di caseificazione. Scienza e tecnica lattiero casearia, 54 (1): 5-21.
24. Scatassa M.L., A. Costa, P.S. Ciaccio e A.M. Di Noto, 2005. Formaggio pecorino siciliano: Processo produttivo ed indagine XIII Congresso Internazionale Fe.Me.S.P.Rum. 1 - 3 settembre 2005 Bari - Italia.
25. Schirone M., R. Tofalo, G. Mazzone, A. Corsetti and G. Suzzi, 2011. Biogenic aminecontent and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. Food Microbiol., 28: 128-136.
26. Tofalo R., M. Schirone, G. Fasoli, G. Perpetuini, F. Patrignani, A. C. Manetta, R. Lanciotti, A. Corsetti, G. Martino and G. Suzzi, 2015. Influence of pig rennet on proteolysis, organic acids content and microbiota of Pecorino di Farindola, a traditional italian ewe's raw milk cheese. Food Chemistry, 175: 121-127.



Caratterizzazione della flora autoctona del Pecorino di Farindola

Lorena Sacchini[1], Alessandra Alessiani[1], Giuseppe Aprea[2], Arianna Boni[2], Gabriella Centorotola[2], Diana Neri[2], Francesco Pomilio[2], Elisabetta Di Giannatale[1], Giacomo Migliorati[2]

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, Teramo, 64100 - Italia
[1]Batteriologia e Igiene delle produzioni lattiero casearie
[2]Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale
Corrispondenza: Lorena Sacchini, lo.sacchini@izs.it

Parole chiave
Batteri acidi lattici (LAB),
Batteriocina,
Coltura starter,
Enterococcus,
Lactobacillus,
Patogenicità,
Probiotico

Riassunto
Sono state studiate le popolazioni batteriche caratteristiche del Pecorino di Farindola al fine di valutarne il potenziale patogeno e probiotico. Sono stati identificati e caratterizzati gli enterococchi e i batteri acidi lattici (LAB) isolati da lotti di produzione relativi a tutte le fasi di lavorazione (latte, cagliata, 7, 14, 21, 35, 49, 63, 77, 91, 121 e 150 giorni di stagionatura). Tra la popolazione di enterococchi caratterizzante la produzione aziendale del Pecorino di Farindola il 54,78% è risultato rappresentato da Enterococcus faecium e il 41,74% da *E. faecalis.* La popolazione dei LAB è risultata costituita prevalentemente da *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (34,07%), *L. brevis* (19,78%) e *L. plantarum* (19,78%). Nonostante la presenza di diversi LAB positivi per batteriocine (nisina e enterocine) sono stati selezionati solo due *L. paracasei* subsp. *paracasei* (entB$^+$ ed entAS48$^+$) con potenziale attività probiotica da impiegare nella produzione sperimentale. Lo studio di popolazione della produzione sperimentale ha evidenziato la presenza di ceppi strettamente correlati a quelli utilizzati con funzione probiotica.

Introduzione

I batteri acidi lattici costituiscono un gruppo di microrganismi naturalmente presenti in alimenti di origine animale, come i prodotti lattiero caseari (12). Risultano essere i principali responsabili dei processi di fermentazione e sono ampiamente studiati come potenziali adiuvanti e conservanti naturali. Inoltre, molti studi dimostrano la consistente attività inibitoria che i LAB esplicano nei confronti di microrganismi patogeni (11). Essi possono essere aggiunti deliberatamente come colture starter o essere selezionati all'interno della popolazione autoctona durante i processi di fermentazione (13).
Il Pecorino di Farindola presenta caratteristiche organolettiche uniche derivanti dalla lavorazione tipica del prodotto. I microrganismi occasionali rappresentati dai LAB non-starter presenti in latte e ambiente di lavorazione, giocano un ruolo importante durante la stagionatura per le caratteristiche organolettiche e per la sicurezza del prodotto stesso. Tuttavia l'estrema variabilità nella manifattura di prodotti di nicchia rende necessaria l'armonizzazione dei processi di produzione (17). A questo fine si ritiene indispensabile la valutazione della flora lattica autoctona, sia in termini di sicurezza alimentare che di capacità probiotiche.
Diversi studi hanno dimostrato che i LAB presenti negli alimenti esplicano la loro azione antibatterica prevalentemente attraverso la produzione di batteriocine (4, 10, 11).
Le batteriocine sono piccoli peptidi ad attività battericida. Esse rivestono particolare interesse per le industrie alimentari in quanto rappresentano un'alternativa naturale per migliorare la sicurezza e la qualità dei prodotti alimentari. Le batteriocine attualmente permesse in commercio come additivi alimentari sono soltanto due: nisina e pediocina (11).
La flora microbica presente nei prodotti lattiero caseari (LAB, enterococchi, etc.) può tuttavia veicolare geni di virulenza (8), determinare antibiotico resistenza (1) o codificare per ammine biogene (istamina, putrescina e tiramina) (5, 12), rappresentando un possibile rischio per il consumatore.
Il Pecorino di Farindola è già stato oggetto di studi (6, 17, 18, 19) che hanno permesso di individuare alcune caratteristiche peculiari di questo prodotto e allo stesso tempo evidenziato alcuni aspetti da approfondire.

Nello specifico lo scopo di questo studio è stato quello di studiare le popolazioni caratteristiche del Pecorino di Farindola, mediante l'identificazione di specie microbiche in grado di conferire al prodotto elementi di funzionalità e protezione. Sono stati caratterizzati gli enterococchi, i lattobacilli e i lattococci isolati da lotti di produzione relativi a tutte le fasi di lavorazione. Sono state valutate le potenzialità patogenetiche e probiotiche al fine di selezionare dei ceppi da poter impiegare come starter in una produzione sperimentale di pecorino. L'andamento della popolazione dei LAB della produzione sperimentale è stato studiato per monitorare la permanenza dei ceppi selezionati in tutte le fasi del processo produttivo.

Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 - Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Ceppi batterici

Per lo studio delle popolazioni caratteristiche sono stati analizzati 206 ceppi batterici, isolati da tre lotti di produzione, relativi a tutte le fasi di lavorazione (latte, cagliata, T7, T14, T21, T35, T49, T63, T77, T91, T121e T150), in aziende appartenenti al Consorzio di Tutela del Pecorino di Farindola.

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA dai ceppi è stata eseguita con lo strumento Maxwell® Systems-Automated Sample Processing utilizzando il kit Maxwell® 16 Tissue DNA Purification Kit secondo le istruzioni del produttore (Promega Italia S.r.l., Milano - Italia).

Identificazione dei ceppi batterici

I ceppi batterici riferibili a *Enterococcus* spp. sono stati sottoposti a multiplex PCR per l'identificazione delle 4 specie ritenute rilevanti *(E. faecalis, E. faecium, E. casseliflavus* ed *E. gallinarum*) e l'identificazione dei geni di resistenza alla vancomicina (7). La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando il Multiplex PCR kit (Qiagen, Leipzig - Germany) secondo le istruzioni della ditta produttrice, con il Thermal cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA - USA) alla temperatura di annealing di 54°C. Gli amplificati sono stati sottoposti a elettroforesi capillare con il QIAxcel® Advanced System (Qiagen). Come controlli positivi sono stati utilizzati i seguenti microrganismi: *E. faecalis vanB* NCTC 13379, *E. faecium vanA* ATCC 51559, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. gallinarum van*C1 ATCC 49573 ed *E. casseliflavus* ATCC 25788.

I ceppi non identificati in multiplex PCR e i ceppi riferibili a *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp. sono stati sottoposti a identificazione tramite sequenziamento della regione ipervariabile costituita dalle prime 500 bp del frammento del gene codificante il 16S dell'rRNA (16). Per la reazione di amplificazione è stata utilizzata la Master mix 2X (Promega Italia S.r.l., Milano - Italia). Per la purificazione del prodotto PCR è stato impiegato il kit Illustra™ ExoProStar™ 1-Step (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont - UK). Per la preparazione della miscela necessaria per la reazione di sequenza è stato adoperato il BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA - USA). Per la purificazione della reazione di sequenza è stata impiegata la resina Sephadex® G-50 (Sigma Aldrich - USA). Per il sequenziamento è stato adottato il sequenziatore ABI-Prism® 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA - USA). Le sequenze sono state confrontate con quelle presenti nella banca dati BLAST (9) scegliendo quelle con il "Total score" più alto. I ceppi utilizzati come controllo di prova sono riportati in Tabella 1.

I ceppi identificati tramite sequenziamento come *L. paracasei* subsp. *paracasei* o *L. casei* sono stati sottoposti a PCR per la discriminazione delle due specie (21). La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando la Master mix 2X (Promega

Tabella 1. Provenienza dei ceppi batterici impiegati come controllo positivo per il genere *Lactococcus* spp e *Lactobacillus* spp.

Ceppo batterico	Provenienza
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	NCTC 6681
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*	ATCC 19257; DSM 20069
Lactobacillus casei	ATCC 393
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*	DSM 5622
Lactobacillus fermentum	ATCC 55884
Lactobacillus brevis	NCTC 13386
Lactobacillus rhamnosus	NCTC 12953; DSM 20021
Lactobacillus delbrueckii subsp. *lactis*	NCTC 13361
Lactobacillus plantarum	ATCC 55883; DSM 20174
Lactobacillus delbruekii subsp. *bulgaricus*	DSM 20081

LEGENDA:
- ATCC American Type Culture Collection;
- DSM Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures;
- NCTC: National Collection of Type Cultures.

Italia S.r.l.) e il thermal cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Gli amplificati sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare con il QIAxcel® Advanced System (Qiagen). I ceppi di *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *L. casei* utilizzati come controllo positivo sono riportati in Tabella 1.

Rilevazione di geni codificati per batteriocine e ammine biogene

La presenza di geni codificanti per batteriocine e ammine biogene è stata rilevata tramite PCR per la ricerca dei geni target indicati in letteratura e riportati in Tabella 2. I ceppi utilizzati come

Tabella 2. Elenco di primers sequenze, pesi molecolari attesi, geni target e riferimenti bibliografici.

Primer	Sequenza (5'-3')	Peso molecolare (bp)	Gene target	Riferimento bibliografico
lanB_f	TATGATCGAGAARYAKAWAGATATGG	400-500	Lantibiotico B	11
lanB_r	TTATTANRCANATGNAYDAWACT			
lanC_f	TAATTTAGGATWNSYNMAYGG	200-300	Lantibiotico C	
lanC_r	ACCWGKNNNNCCRTRRCACCA			
lanM_f	ATGCWAGWYWTGCWCATGG	200-300	Lantibiotico M	
lanM_r	CCTAATGAACCRTRRYAYCA			
nis_f	GGATAGTATCCATGTCTG	250	Nisina	
nis_r	CAATGATTTCGTTCGAAG			
entA_f	CATCATCCATAACTATATTTG	126	Enterocina A	
entA_r	AAATATTATGGAAATGGAGTGTAT			
entB_f	GAAAATGATCACAGAATGCCTA	162	Enterocina B	
entB_r	GTTGCATTTAGAGTATACATTTG			
entP_f	TATGGTAATGGTGTTTATTGTAAT	120	Enterocina P	
entP_r	ATGTCCCATACCTGCCAAAC			
entL50AB_f	STGGGAGCAATCGCAAAATTAG	98	Enterocina L50AB	
entL50AB_r	ATTGCCCATCCTTCTCCAAT			
entAS48_f	GAGGAGTNTCATGATTTAAAGA	340	Enterocina AS48	
entAS48_r	CATATTGTTAAATTACCAAGCAA			
gelE_f	TATGACAATGCTTTTTGGGAT	213	Gelatinasi	12
gelE_r	AGATGCACCCGAAATAATATA			
cylA_f	ACTCGGGGATTGATAGGC	688	Citolisina	
cylA_r	GCTGCTAAAGCTGCGCTT			
hyl_f	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG	276	Ialuronidasi	
hyl_r	GACTGACGTCCAAGTTTCCAA			
asa1_f	GCACGCTATTACGAACTATGA	375	Sostanza di aggregazione	
asa1_r	TAAGAAAGAACATCACCACGA			
esp_f	AGATTTCATCTTTGATTCTTG	510	Proteina di superficie enterococcale	
esp_r	AATTGATTCTTTAGCATCTGG			
efaA_f	GCCAATTGGGACAGACCCTC	688	Antigene dell'endocardite	
efaA_r	CGCCTTCTGTTCCTTCTTTGGC			
ace_f	GAATTGAGCAAAAGTTCAATCG	1008	Proteina di adesione al collagene	
ace_r	GTCTGTCTTTTCACTTGTTTC			
hdc1_f	AGATGGTATTGTTTCTTATG	367	Istidina decarbossilasi	
hdc1_r	AGACCATACACCATAACCTT			
hdc2_f	AAYTCNTTYGAYTTYGARAARGARG	534	Istidina decarbossilasi	
hdc2_r	ATNGGNGANCCDATCATYTTRTGNCC			
tdc_f	GAYATNATNGGNATNGGNYTNGAYCARG	924	Tirosina decarbossilasi	
tdc_r	CCRTARTCNGGNATAGCRAARTCNGTRTG			
odc_f	GTNTTYAAYGCNGAYAARCANTAYTTYGT	1446	Ornitina decarbossilasi	
odc_r	ATNGARTTNAGTTCRCAYTTYTCNGG			

controlli positivi sono riportati in Tabella 3. Sono state eseguite PCR simplex per la ricerca dei geni codificanti la produzione dei lantibiotici, della nisina e dell'enterocina A. Per la reazione di amplificazione i primers sono stati utilizzati alla concentrazione di riferimento (16) ed è stata utilizzata la Master mix 2X (Promega Italia S.r.l.). Per la ricerca della presenza degli altri geni sono state eseguite PCR multiplex secondo lo schema riportato in Tabella 4. Per le reazioni di amplificazione i primers sono stati utilizzati alla concentrazione riportata negli articoli di riferimento (Tabella 2) ed è stato utilizzato il Multiplex PCR kit (Qiagen) seguendo il ciclo di amplificazione riportato dalla ditta produttrice, impostando la temperatura di annealing come riportato in Tabella 4. Tutte le reazioni di amplificazione sono state effettuate con il Thermal cycler GeneAmp 9700 (Applied Biosystems) e i prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare con il QIAxcel® Advanced System (Qiagen).

Tabella 3. Provenienza dei ceppi batterici impiegati come controllo positivo per il genere Lactococcus, Enterococcus e Lactobacillus.

Ceppo batterico	Provenienza
Lactobacillus sp. 30a	ATCC 33222
Lactobacillus brevis	ATCC 367
Enterococcus faecium	ATCC 700221
Enterococcus faecium	ATCC 19434
Enterococcus faecalis EFS2	ATCC 202014
Enterococcus faecalis	ATCC 47077
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	ATCC 11454
Enterococcus faecium C68	CRA
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*	DSM 20069

Legenda:
- ATCC American Type Culture Collection; CRA: Consiglio per la Ricerca e la sperimentazione in Agricoltura;
- DSM: Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures.

Tabella 4. Multiplex PCR e temperatura di annealing.

Multiplex PCR	Temperatura di annealing
entB+entP+entL50AB+entAS48+efaA+tdc+odc	60°C
gelE+esp+ace+hdc1	57°C
cylA+hyl+asa1+hdc2	57°C

Rep-PCR per lo studio di popolazioni batteriche

Nella fase di produzione sperimentale di pecorino sono stati analizzati 340 ceppi di LAB per monitorare la permanenza dei ceppi con caratteristiche probiotiche usati come innesto. Il DNA è stato estratto e i ceppi sottoposti a PCR, per l'identificazione di *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei,* come indicato nei paragrafi precedenti. I ceppi risultati positivi alla PCR per *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* sono stati sottoposti a Rep-PCR per valutarne l'appartenenza ai ceppi utilizzati come innesto. La metodica (16) è stata eseguita utilizzando per la preparazione della miscela di amplificazione la Master mix 2X (Promega Italia). Per il ciclo di PCR è stato impiegato il Thermal cycler GeneAmp 9700 (Applied Biosystems). I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi capillare con il QIAxcel® Advanced System (Qiagen). L'analisi dell'immagine è stata eseguita con il software Bionumerics v. 7.5 (Applied Maths N.V., Sint Martens Latem - Belgio).

Risultati

La fase sperimentale ha permesso di identificare 63 ceppi di *E. faecium*, 48 di *E. faecalis*, 31 di *L. paracasei* subsp. *paracasei*, 18 di *L. brevis,* 18 di *L. plantarum*, 7 di *L. lactis* subsp. *lactis*, 5 di *L. lactis* subsp. *cremoris* e altri batteri in numero minore. I risultati relativi all'identificazione dei 206 ceppi caratterizzati sono riportati in Tabella 5. Nello specifico, il 54,78% degli enterococchi è risultato rappresentato da *E. faecium*, il 41,74% da *E. faecalis*, il resto da *E. durans, E. casseliflavus* ed *E. gallinarum* (Figura 1). Tutti gli *E. faecalis* ed *E. faecium* sono risultati negativi per i geni che conferiscono resistenza alla vancomicina. E' stato evidenziato come i ceppi di enterococchi abbiano mostrato una distribuzione differente durante le diverse fasi, permettendo l'isolamento di diversi ceppi in relazione ai tempi di lavorazione: nel latte e nella cagliata sono stati isolati 5 ceppi di *E. faecalis*; a T7 3 di *E. faecalis* e 2 di *E. faecium*; a T14 7 di *E. faecium*, 4 di *E. faecalis* e uno di *E. durans*; a T21 8 di *E. faecium* e 5 di *E. faecalis*; a T35 6 di *E. faecium*, 9 di *E. faecalis* e uno di *E. durans;* a T49 7 di *E. faecium* e 6 di *E. faecalis*; a T63 11 di *E. faecium*, 3 di *E. faecalis* e uno di *E. casseliflavus*; a T77 5 di *E. faecium* e 3 di *E. faecalis;* a T91 5 di *E. faecium* e 1 uno *E. gallinarum*; a T121 6 di *E. faecium* e 2 di *E. faecalis*; a T150 6 di *E. faecium* e 3 di *E. faecalis* come riportato in Figura 2. Oltre agli enterococchi sono stati identificati altri batteri appartenenti alla flora autoctona del Pecorino di Farindola. Come mostrato in Figura 3 le specie maggiormente rappresentate sono *L. paracasei* subsp. *paracasei* (34,07%), *L. brevis*

(19,78%), L. *plantarum* (19,78%), *L. lactis* subsp. *lactis* (7,69%) e *L. lactis* subsp. *cremoris* (5,49%). Come nel caso degli enterococchi anche nell'andamento della popolazione dei lattobacilli (Figura 4) si è potuta notare una differenza fra la popolazione iniziale, costituita prevalentemente da *L. lactis* subsp. *lactis* e *L. lactis subsp. cremoris*, e quella finale costituita prevalentemente da *L. paracasei* subsp. *paracasei* e *L. brevis*. Nel latte, nella cagliata e a T7 sono risultati presenti, rispettivamente, 2, 2 e 3 ceppi di *L. lactis* subsp. *lactis,* dal T14 in poi questi ceppi sono scomparsi e contestualmente si è potuto rilevare un numero crescente di *L. paracasei* subsp. *paracasei*: 3 a T14, 3 a T21, 2 a T35, 4 a T49, 2 a T63, 5 a T77, 4 a T91, 3 a T121 e 5 a T150. L'andamento degli altri batteri è riportato in Figura 4.

Tutti i ceppi sono stati sottoposti a PCR per l'identificazione di geni codificanti per batteriocine, ammine biogene e fattori di virulenza (Tabella 6). Per quanto riguarda i fattori di virulenza e le ammine

Tabella 5. Risultati dell'identificazione di specie ottenuta mediante PCR e sequenziamento

Specie	Numero di isolati
Enterococcus faecium	63
Enterococcus faecalis	48
Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*	31
Lactobacillus brevis	18
Lactobacillus plantarum	18
Lactococcus lactis subsp. *lactis*	7
Lactococcus lactis subsp. *cremoris*	5
Leuconostoc mesenteroides	3
Lactococcus garvieae	2
Leuconostoc pseudomesenteroides	2
Enterococcus durans	2
Enterococcus casseliflavus	1
Lactobacillus coryniformis	1
Streptococcus infantarius	1
Streptococcus lutetiensis	1
Streptococcus sp.	1
Enterococcus gallinarum	1
Staphylococcus sp.	1

Figura 2. Distribuzione degli Enterococchi nelle varie fasi di prelievo.

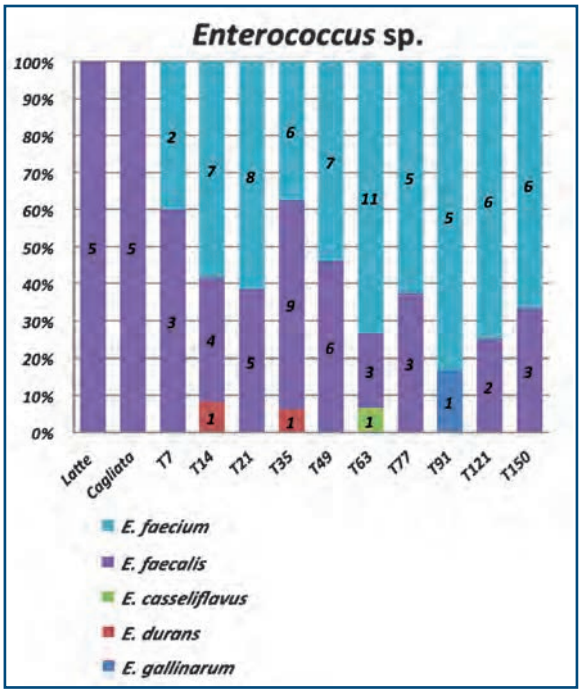


Figura 1: Distribuzione percentuale degli enterococchi identificati.

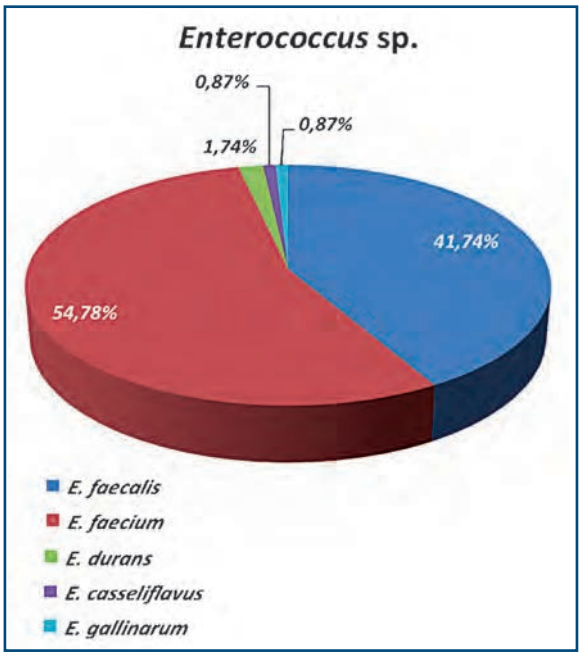


Figura 3. Distribuzione percentuale dei presunti batteri acidi lattici identificati.

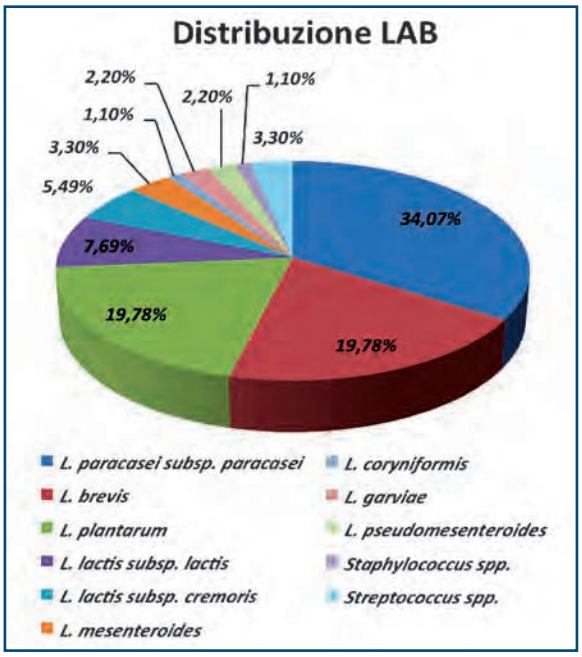
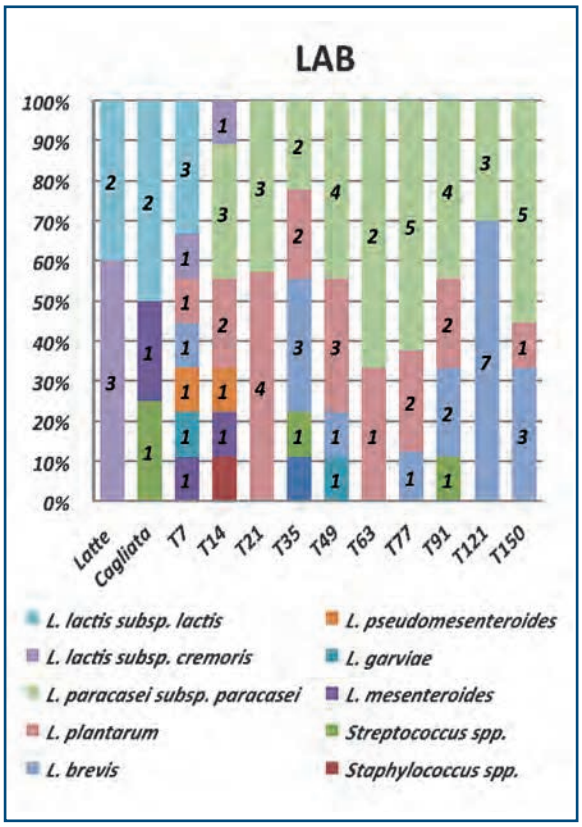


Figura 4. Distribuzione dei batteri acidi lattici nelle varie fasi di prelievo.



biogene sono risultati positivi: 21 enterococchi per *gelE*, 32 per *ace*, 1 per *efaA*, 45 per *tdc*, 7 per *asa*; 1 LAB per *odc* e 1 per asa1. Per quanto riguarda le batteriocine sono risultati positivi: 12 enterococchi per *entL50AB*, 6 per *entB* e 11 per *entP*; 5 LAB per *nis*, 4 per *entL*50AB, 1 per *ent*AS48 e 1 *per ent*B.
In Figura 5 è rappresentato il contributo percentuale di ciascuna specie. Tra i *Lactococcus* spp. isolati 5 *L. lactis* subsp. *lactis* sono risultati possedere il gene codificante per la nisina. Il gene per l'enterocina P è risultato presente in 11 *E. faecium*. L'enterocina B è stata rilevata in 6 *E. faecium* e 1 *L. paracasei*. L'enterocina AS48 è stata evidenziata unicamente in 1 *L. paracasei*, la L50AB in 1 *S. lutetiensis*, in 2 *L. paracasei*, 1 *L. brevis* e 12 *E. faecium*. Quasi tutti i geni codificanti per le ammine biogene sono risultati appartenenti a *E. faecalis*, con l'unica eccezione di *odc*, il cui portatore è risultato un isolato appartenente alla specie *L. brevis*.

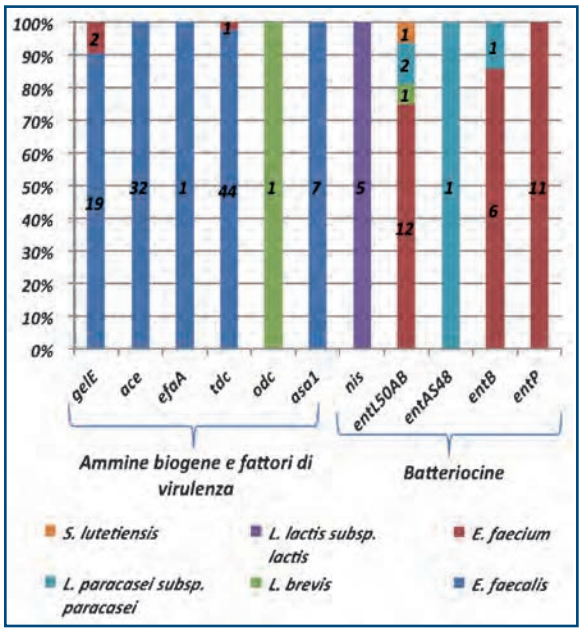
Caratterizzazione dei LAB isolati dalla produzione sperimentale di pecorino

Per la produzione sperimentale di pecorino con innesto di colture a carattere probiotico sono stati scelti due *L. paracasei* subsp. *paracasei* (IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48) ad accertata attività

Tabella 6. Positività dei ceppi per i geni indagati.

Categoria	Target	Gene	Numero enterococchi positivi	Numero di LAB positivi
Fattori di virulenza e ammine biogene	Gelatinasi	gelE	21	0
	Proteina enterococcica di superficie	esp	0	0
	Collagene di adesione	ace	32	0
	Istidina decarbossilasi	hdc1	0	0
	Antigene per l'endocardite	efaA	1	0
	Tirosina decarbossilasi	tdc	45	0
	Ornitina decarbossilasi	odc	0	1
	Citolisina	cylA	0	0
	Ialuronidasi	hyl	0	0
	Fattore di aggregazione	asa1	7	1
	Istidina decarbossilasi	hdc2	0	0
Batteriocine	Nisina	nis	0	5
	Enterocina L50AB	entL50AB	12	4
	Enterocina AS48	entAS48	0	1
	Enterocina A	entA	0	0
	Enterocina B	entB	6	1
	Enterocina P	entP	11	0
	Lantibiotico M	lanM	0	0
	Lantibiotico B	lanB	0	0
	Lantibiotico C	lanC	0	0

Figura 5. Distribuzione delle specie per i geni considerati.



probiotica (dati non riportati nel presente studio), dotati rispettivamente dei geni codificanti per le enterocine B e AS48. Per lo studio di popolazione sono stati identificati come *L. paracasei* subsp. *paracasei* e sottoposti a Rep-PCR 222 isolati. La Rep-PCR ha evidenziato la presenza di popolazioni clonali (Figura 6), raggruppati in base al tempo di stagionatura. All'inizio del processo produttivo (latte e cagliata) la variabilità delle popolazioni è risultata alta: i ceppi IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48 hanno mostrato una similarità di circa il 90% con alcuni ceppi isolati in queste fasi. A T23 e T28 la popolazione si è presentata caratteristica e omogenea per i tempi di stagionatura, sono state ritrovate popolazioni simili fra loro all'80% circa, e subpopolazioni perfettamente identiche. A T37 la popolazione si è differenziata rispetto alle precedenti mostrandosi tipica e omogenea. Trascorsi i 58 giorni di stagionatura le popolazioni hanno perso di consistenza aumentando di nuovo in variabilità.

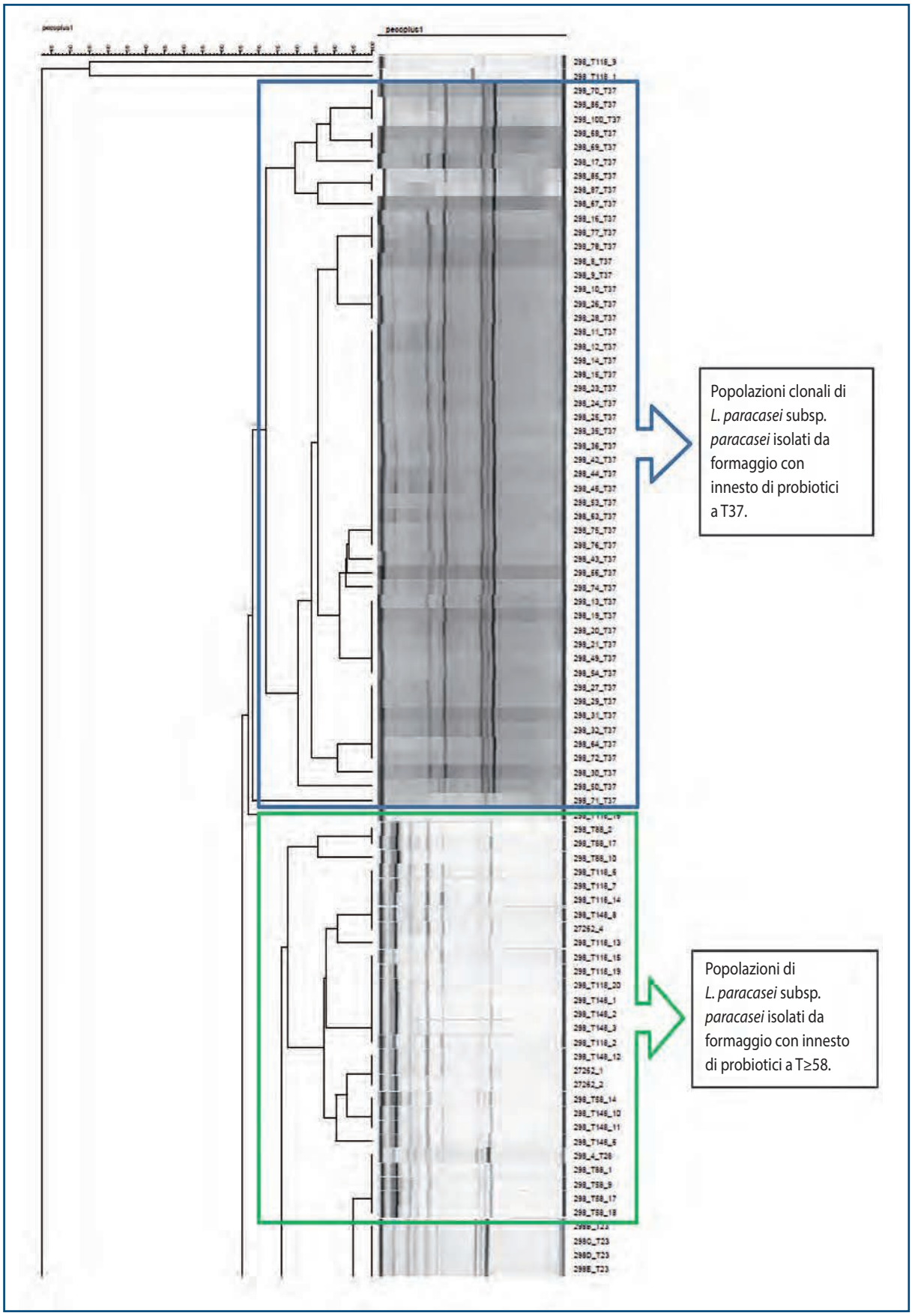
Discussione

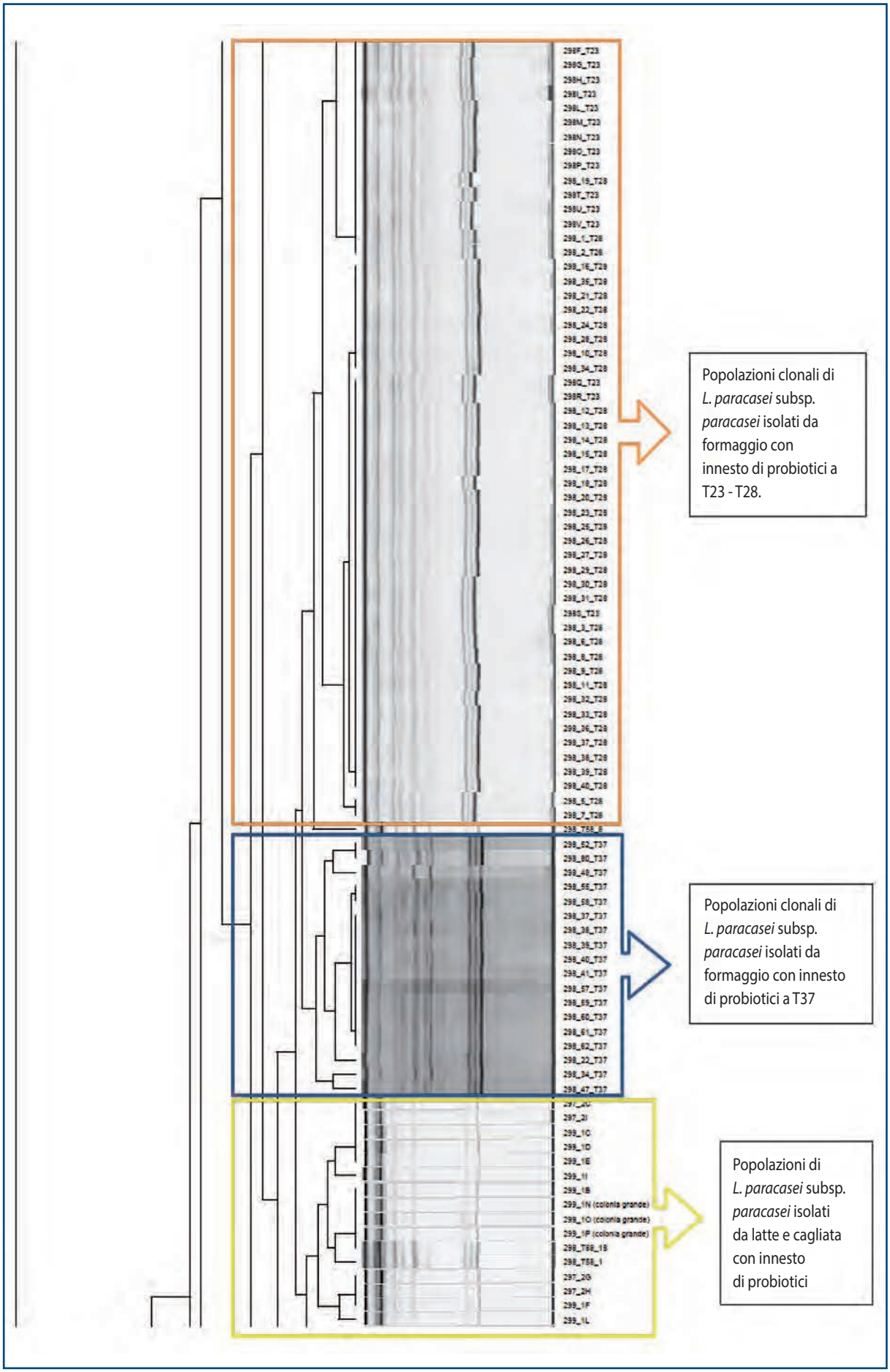
Al fine di caratterizzare la flora autoctona del Pecorino di Farindola, sono stati isolati 206 ceppi collezionati durante le diverse fasi del processo produttivo. Per quanto riguarda gli enterococchi la variabilità di specie durante le varie fasi del processo produttivo, con prevalenza di *E. faecium*, è già stata riportata (19). Altri lavori su formaggi a base di latte crudo ovino confermano la prevalenza di *L. lactis* solo durante le fasi iniziali di lavorazione per lasciar spazio alle specie *L. casei/paracasei* in fase di stagionatura avanzata (12, 14).

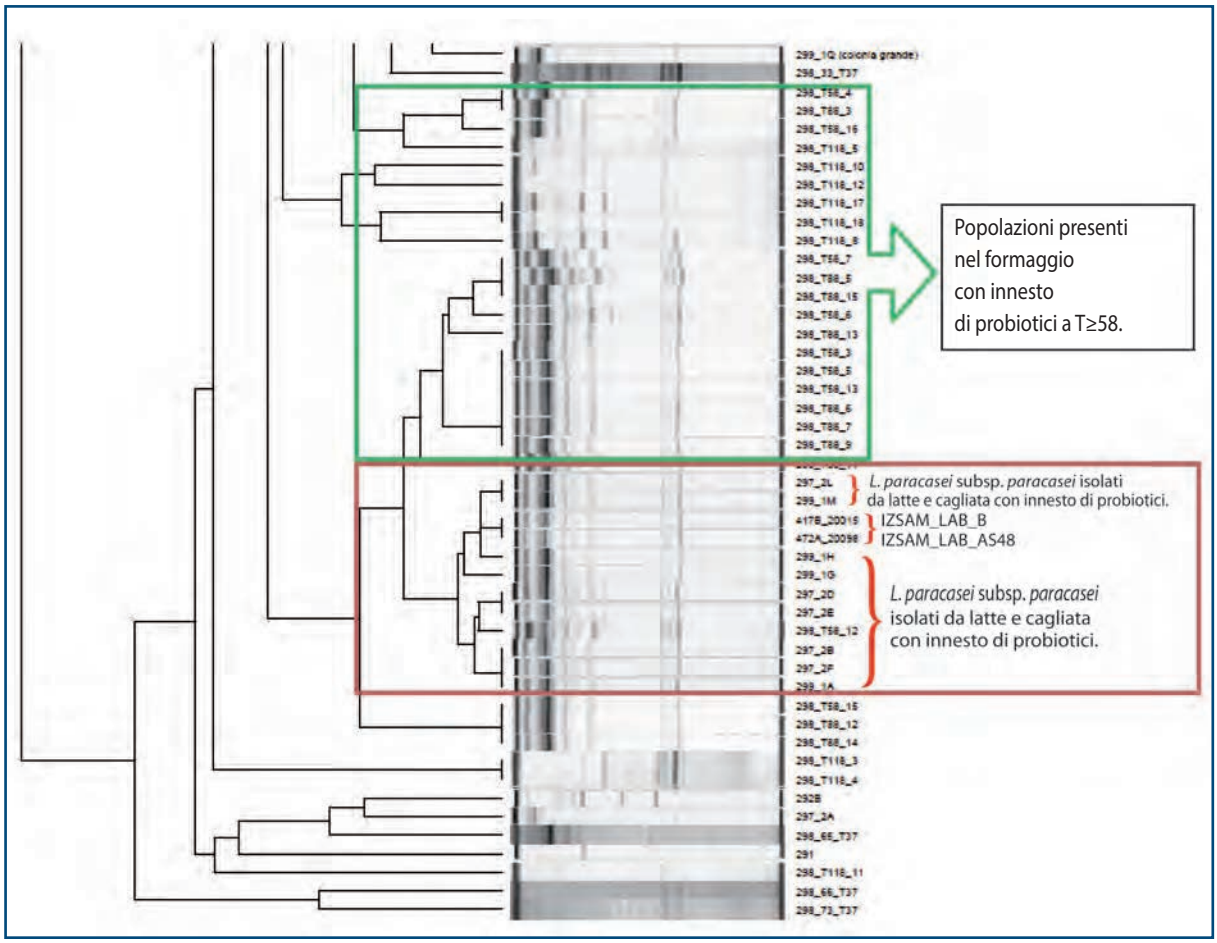
La capacità di produrre ammine biogene e batteriocine conferisce a queste specie un interesse sanitario oltre alla capacità, in alcuni casi, di conferire particolari aromi ai prodotti alimentari. Per questo motivo valutare la presenza di microrganismi produttori di ammine biogene e di batteriocine è utile al fine di valutare la sicurezza degli alimenti per il consumatore. Tutti gli enterococchi esaminati ad eccezione del ceppo di *E. casseliflavus* e di *E. gallinarum*, naturalmente resistenti alla vancomicina, sono risultati negativi per tale gene. Il 24,27% degli isolati è risultato positivo per la presenza di geni di virulenza o codificanti per ammine biogene. Nello specifico si tratta quasi esclusivamente di *E. faecalis*. I risultati del presente studio sono perfettamente in accordo con quelli condotti nel 2007 da Serio et al., dove si dimostra il basso potenziale patogeno degli enterococchi isolati dal pecorino abruzzese. Gli enterococchi, data la presenza di elementi mobili, plasmidi di coniugazione e trasposoni, possono rappresentare una possibile riserva di geni di antibiotico-resistenza e virulenza ma studi condotti sul formaggio dimostrano la bassa capacità di trasferimento genico (3). Per quanto riguarda la valutazione della presenza di geni codificanti per la produzione di batteriocine, il 18,45% dei ceppi analizzati ha mostrano almeno una positività. Nello specifico, tutti gli *E. faecalis* sono risultati negativi mentre il 44,44% di *E. faecium* (29 isolati) sono risultati positivi per almeno un'enterocina. Tra i LAB, solo 5 *L. lactis* subsp. *lactis* e 4 *L. paracasei* subsp. *paracasei* hanno mostrato positività per almeno una batteriocina. Solo due ceppi di *L. paracasei* subsp. *paracasei* IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48, uno portatore del gene codificante per la batteriocina entAS48 e uno per entB sono stati selezionati, in base a ulteriori esami, come potenziali probiotici nella produzione sperimentale di pecorino.

Lo studio delle popolazioni di *L. paracasei* subsp. *paracasei* della produzione sperimentale ha mostrato che nella fase iniziale (latte e cagliata) e in quella finale (T≥58) è presente un'alta variabilità, a differenza delle fasi intermedie (T23, T28, T37) in cui le popolazioni sono caratteristiche delle fasi stesse ma omogenee nel loro interno. L'evoluzione delle popolazioni durante la stagionatura è un processo naturale, riportato con frequenza in letteratura (2, 12). L'effetto dell'utilizzo di colture starter commerciali sulla flora microbica di formaggi a base di latte crudo o pastorizzato è già stato dimostrato da altri autori (13). Nel formaggio a base di latte crudo la coltura starter si ritrova debolmente durante la fermentazione della cagliata ma è dominante nel prodotto finito. Nel formaggio a base di latte pastorizzato, invece, la coltura starter è abbondante all'inizio della fermentazione ma non si ritrova nel prodotto finale. In entrambi i casi, comunque, la composizione della popolazione microbica finale risulta simile facendo concludere

Figura 6: Dendrogramma delle popolazioni di *L. paracasei* subsp. *paracasei* isolate nella produzione sperimentale arricchita con i ceppi probiotici IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48. Nel riquadro rosso i ceppi strettamente correlati ai ceppi inoculati come probiotici. Nei riquadri blu, verde, giallo e arancio sono evidenziate alcune delle popolazioni clonali.




Popolazioni clonali di *L. paracasei* subsp. *paracasei* isolati da formaggio con innesto di probiotici a T23 - T28.
Popolazioni clonali di *L. paracasei* subsp. *paracasei* isolati da formaggio con innesto di probiotici a T37
Popolazioni di *L. paracasei* subsp. *paracasei* isolati da latte e cagliata con innesto di probiotici



che l'utilizzo della coltura starter non abbia avuto effetto sulla composizione della popolazione. Lo studio di popolazione condotto sulla produzione sperimentale di Pecorino di Farindola ha mostrato la presenza di ceppi di *L. paracasei* subsp. *paracasei* nel latte e nella cagliata rapportabili ai ceppi IZSAM_LAB_B e IZSAM_LAB_AS48 utilizzati come innesto nella coltura starter. Nelle successive fasi di stagionatura la popolazione di *L. paracasei* subsp. *paracasei* si modifica in maniera consistente. Tale fenomeno potrebbe essere legato alla possibile competizione con la flora presente e al processo di fermentazione che genera un nuovo equilibrio favorendo la crescita di una determinata popolazione, piuttosto che di un'altra.

Conclusioni

Alla luce dei risultati ottenuti, il Pecorino di Farindola può essere considerato una buona riserva di microrganismi potenzialmente produttori di batteriocine. La produzione sperimentale con l'utilizzo di colture starter autoctone con potenziale attività probiotica necessita ulteriori indagini per meglio approfondire la dinamica delle popolazioni presenti e per valutare la patogenicità e le potenzialità benefiche dei ceppi isolati. In futuro saranno condotti studi al fine di indagare sulla possibilità di utilizzo non solo ceppi di autoctoni con potenziale attività probiotica presenti nel prodotto finito, ma anche quelli che si ritrovano nelle fasi iniziali del processo produttivo (ad esempio i *L. lactis* subsp. *lactis*), dato che è proprio in queste fasi che si presenta il maggior rischio di sviluppo di eventuali batteri patogeni. Inoltre, è bene sottolineare il potenziale probiotico dei ceppi di *E. faecium* isolati, ma si rendono necessarie ulteriori analisi per valutarne la completa innocuità. Per successivi studi sulle dinamiche di popolazione potrebbe essere di particolare interesse applicare tecniche coltura-indipendente, come la PCR-DGGE (PCR- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) e RT-PCR-DGGE, che permettono di studiare le comunità batteriche direttamente dalla matrice.

Bibliografia

1. Ammor M.S, A.B. Flórez and B. Mayo, 2007. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiol., 24: 559-570.
2. Caggia C., M. De Angelis, I. Pitino, A. Pino and C.L. Randazzo, 2015. Probiotic features of *Lactobacillus* strains isolated from Ragusano and Pecorino Siciliano cheeses. Food Microbiol., 50: 109-117.
3. Cocconcelli P.S., D. Cattivelli and S. Gazzola, 2003. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. Int. J. Food Microbiol., 88: 315-323.
4. Dal Bello B., K. Rantsiou, A. Bellio, G. Zeppa, R. Ambrosoli, T. Civera and L. Cocolin, 2010. Microbial ecology of artisanal products from North West of Italy and antimicrobial activity of the autochthonous populations. LWT-Food Sci. Technol., 43(7): 1151-1159.
5. De Las Rivas B., A. Marcobal and R. Munoz, 2005. Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines. FEMS Microbiology Letters, 244: 367-372.
6. Di Giacomo F., N. Casolani and A. Del Signore, 2014. Cheese making using pig rennet and calf rennet: microrganisms and volatile compounds in Farindola ewe chese. Ital. J. Food Sci., 26: 153-161.
7. Kariyama R., R. Mitsuhata, J.W. Chow, D.B. Clewell and H. Kumon, 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. J. Clin. Microbiol., 38(8): 3092-3095.
8. Moraes P.M., L.M. Perin, S.D.Todorov, Jr A. Silva, B.D.G.M. Franco and L.A. Nero, 2012. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. J. Appl. Microbiol., 113: 318- 328.
9. Johnson M. *et. al.*, 2008. NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Res. 1, 36 (Web Server issue): W5-9.
10. Perin L., R. Miranda, A. Camargo, M. Colombo, A. Carvalho and L. Nero, 2013. Antimicrobial activity of the Nisin Z producer *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Lc08 against *Listeria monocytogenes* in skim milk. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 65(5): 1554-1560.
11. Perin L.M. and L.A. Nero, 2014. Antagonistic lactic acid bacteria isolated from goat milk and identification of a novel nisin variant *Lactococcus lactis*. BMC Microbiology, 14: 36.
12. Perin L.M., R.O. Miranda, S.D. Todorov, B.D. Franco and L.A. Nero, 2014. Virulence, antibiotic resistance and biogenic amines of bacteriocinogenic lactococci and enterococci isolated from goat milk. Int. J. Food Microbiol., 185: 121-126.
13. Randazzo C.L., S. Torriani, A.D. Akkermans, W.M. de Vos and E.E. Vaughan, 2002. Diversity, dynamics and activity of bacterial communities during production of an artisanal Sicilian cheese as evaluated by 16S rRNA analysis. Appl. Environ Microbiol., 68(4): 1882-1892.
14. Randazzo C.L., E.E. Vaughan and C. Caggia, 2006. Artisanal and experimental Pecorino Siciliano cheese: microbial dynamics during manufacture by culturing and PCRDGGE analyses. Int. J. Food Microbiol., 109: 1-8.
15. Ricciardi A., G. Blaiotta, A. Di Cerbo, M. Succi and
16. Aponte, 2014. Behaviour of lactic acid bacteria populations in Pecorino di Carmasciano cheese samples submitted to environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract: evaluation by means of a polyphasic approach. Int. J. Food Microbiol., 179: 64-71.
17. Rossetti L. and G. Giraffa, 2005. Rapid Identification of dairy lactic acid bacteria by M13-generated, RAPD-PCR fingerprinting databases. Journal of Microbiological Methods, 63: 135-144.
18. Schirone M., R. Tofalo, G. Mazzone, A. Corsetti and G. Suzzi, 2011. Biogenic amine content and microbiological profile of Pecorino di Farindola cheese. Food Microbiol., 28(1): 128-136.
19. Schirone M., R. Tofalo, P. Visciano, A. Corsetti and G. Suzzi, 2012. Biogenic amines in italian pecorino cheese. Front Microbiol., 3: 171.
20. Schirone M., R. Tofalo, G. Fasoli, G. Perpetuini, A. Corsetti, A.C. Manetta, A. Ciarrocchi and G. Suzzi, 2013. High content of biogenic amines in Pecorino cheeses. Food Microbiol., 34(1): 137-144.
21. Serio A., A. Paparella, C. Chaves-López, A. Corsetti and G. Suzzi, 2007. Enterococcus populations in Pecorino Abruzzese cheese: biodiversity and safety aspects. J. Food Prot., 70(7): 1561-1568.
22. Ward L.J.H. and M.J. Timmins, 1999. Differentiation of *Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 29: 90-92.

Valutazione delle caratteristiche probiotiche della flora lattica del Pecorino di Farindola

Giuseppe Aprea[1], Arianna Boni[1], Lorena Sacchini[2], Alessandra Alessiani[2], Gabriella Centorotola[1], Diana Neri[1], Francesco Pomilio[1], Elisabetta Di Giannatale[2], Giacomo Migliorati[1]

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Campo Boario, Teramo, 64100 - Italia
[1]Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale
[2]Batteriologia e Igiene delle produzioni lattiero casearie
Corrispondenza: Giuseppe Aprea, aprea_giuseppe.it@libero.it

Parole chiave
Adesione cellulare,
Batteriocine,
Flora lattica,
Pecorino di Farindola,
Probiotico,
Resistenza,
Stagionatura.

Riassunto
Lo studio ha avuto l'obiettivo di valutare le caratteristiche probiotiche di 34 ceppi batterici presenti nella flora lattica del Pecorino di Farindola, verificando la loro resistenza a valori di pH acidi (2,0, 2,5 e 3,0) e a diverse concentrazioni di bile (0,3%, 0,5% e 1%), nonché la loro capacità di adesione alle cellule intestinali. I ceppi impiegati, selezionati per la loro capacità di sopravvivenza ad un lungo processo di stagionatura (121-150 giorni), sono stati identificati come *Lactobacillus* spp. (17 ceppi) e *Enterococcus* spp. (17 ceppi). Su 9 ceppi (2 di *Lactobacillus* spp. e 7 di *Enterococcus* spp.), risultati positivi alla PCR (Polymerase Chain Reaction) per la produzione di batteriocine e negativi per i geni delle ammine biogene, è stata confermata la capacità di produzione *in vitro* di batteriocine contro i seguenti batteri patogeni: *Listeria monocytogenes* ATCC7644, *Escherichia coli* O:157 VTEC 206M/13/A1, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierogruppo Typhimurium ATCC14028, *Staphylococcus aureus* ATCC33862. La valutazione dei risultati complessivi ha consentito di identificare 2 ceppi di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a potenziale attività probiotica da poter impiegare nella produzione del formaggio. Un ceppo ha mostrato una percentuale di sopravvivenza del 95,44% a pH 3, del 16,32%, 45,87% e 80,23% a concentrazioni di bile rispettivamente dell'1%, 0,5% e 0,3%, e una capacità di adesione alle cellule Caco-2 dello 0,032%. Il secondo ceppo ha mostrato una percentuale di sopravvivenza del 100% a pH 3 e del 33,09% a pH 2,5, dell'8,34%, 18,81% e 36,69% a concentrazioni di bile rispettivamente dell'1%, 0,5% e 0,3%, e una capacità di adesione alle cellule Caco-2 dello 0,080%. Entrambi i ceppi hanno mostrato inibizione della crescita *in vitro* (Deferred Antagonism Test) di *Listeria monocytogenes* attraverso la produzione di un alone con raggio di 2 mm.

Introduzione

La produzione di alimenti che garantiscono sia la salute che la sicurezza del consumatore è stimolata dalla costante richiesta da parte del mercato di prodotti "funzionali", contenenti batteri probiotici. Le moderne linee di ricerca mirano a identificare i ceppi di batteri lattici probiotici direttamente tra le flore naturali, soprattutto di prodotti lattiero-caseari. Il fine è di selezionare batteri che possano conferire al prodotto caratteristiche di sicurezza alimentare nel rispetto delle qualità organolettiche tipiche del prodotto, garanti anche di una maggiore vitalità dei ceppi probiotici impiegati (4).
Un microrganismo probiotico deve esprimere caratteristiche benefiche e antibatteriche, deve sopravvivere alla barriera gastrica, ovvero, mostrare resistenza a pH acidi e bile, ed essere in grado di aderire alle cellule intestinali (11). Lo studio ha avuto, quindi, l'obiettivo di selezionare dalla flora lattica del Pecorino di Farindola ceppi batterici a potenziale attività probiotica, valutandone la resistenza a diversi valori di pH acidi e a diverse concentrazioni di bile, e la capacità di adesione cellulare.
La selezione è stata condotta su 34 ceppi batterici scelti per la loro capacità di sopravvivere ad una stagionatura del formaggio di 121-150 giorni. Il Pecorino di Farindola, infatti, viene consumato dopo circa tre mesi dalla produzione, con una media di 4 mesi e oltre. Di questi ceppi, 17 sono stati identificati come lattobacilli e 17 come enterococchi. E' importante sottolineare che nonostante la comunità scientifica abbia espresso considerevoli perplessità sull'utilizzo degli enterococchi come probiotici (6), gli autori si sono riservati di studiarne, comunque, il potenziale probiotico, vista la loro naturale abbondanza nella flora lattica del Pecorino di Farindola a fine stagionatura.
I 9 ceppi che hanno mostrato positività a PCR

(Polymerase Chain Reaction) per la produzione di sostanze antibatteriche e assenza di geni codificanti per ammine biogene sono stati studiati per valutare la loro capacità di produzione *in vitro* di batteriocine contro batteri patogeni. La valutazione complessiva dei risultati ha consentito di identificare 2 ceppi *di Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a potenziale attività probiotica da poter impiegare nella produzione del Pecorino di Farindola. Per quanto riguarda i 7 ceppi batterici rimanenti, appartenenti al genere *Enterococcus,* gli autori si sono riservati di effettuare ulteriori indagini allo scopo di verificare la loro completa innocuità. Lo studio è parte del progetto: "Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola", Fondo europeo agricolo per lo sviluppo rurale (FEASR), P.S.R. Regione Abruzzo 2007/2013 – Misura 1.2.4. "Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nei settori agricolo e alimentare e in quello forestale".

Materiali e metodi

Ceppi batterici

Trentaquattro ceppi batterici, di cui 17 appartenenti al genere *Lactobacillus* e 17 al genere *Enterococcus* (Tabelle 1 e 2), sono stati scelti tra 206 isolati, provenienti da Pecorino di Farindola, per la loro caratteristica di sopravvivere a 121-150 giorni di stagionatura.
Su di essi sono state condotte prove di resistenza a pH acido e bile, e prove di adesione cellulare. I ceppi sono stati seminati su agar Man Rogosa Sharp (MRS) (Oxoid™, Hampshire, Inghilterra). Le colonie ottenute dopo 24h di incubazione a 37°C ± 1°C sono state prelevate e stoccate (microbank) ad una temperatura inferiore a -70°C fino al momento dell'esecuzione delle prove.
I risultati sono stati espressi confrontando i valori dei batteri sottoposti ai test con quelli prodotti dai seguenti ceppi batterici di riferimento:

- *Lactobacillus casei* ATCC393 per i test di resistenza a pH acidi e bile, e per quelli di adesione cellulare;
- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC11454 per la valutazione della produzione *in vitro* di batteriocine (Deferred Antagonism Test).

Al fine di valutare l'attività antibatterica *in vitro* dei potenziali ceppi probiotici, sono stati utilizzati i seguenti batteri patogeni:

- *Listeria monocytogenes* ATCC7644;
- *Escherichia coli* O:157 VTEC 206M/13/A1 (non verocitotossico);
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sierogruppo Typhimurium ATCC14028;
- *Staphylococcus aureus* ATCC33862.

Resistenza a pH acidi

La prova è stata condotta mediante l'utilizzo del protocollo di Sabir *et al.* (8). In particolare i ceppi batterici sono stati coltivati in brodo MRS e incubati a 37°C ± 1°C per 24h ± 1h. Dalla sospensione batterica sono stati prelevati 10µL (concentrazione finale di 10^6-10^7 UFC) per l'allestimento di diluizioni 1:100 in piastre da 24 pozzetti contenenti 990µL di tampone fosfato sterile salino (PBS) (NaCl: 9g/L, $Na_2HPO_4.2H_2O$: 9g/L, KH_2PO_4: 1,5 g/L) a pH 6,2 (pH di controllo), pH 2, pH 2,5 e pH 3. Il PBS, a diversi valori di pH, è stato ottenuto mediante aggiunta di HCl 10M. L'incubazione è stata condotta a 37°C ± 1°C per 2h ± 1h. Successivamente, al fine di determinare la popolazione batterica residua, un'aliquota di ogni pozzetto è stata sottoposta a diluizioni seriali in base 10. Cento µl di ciascuna diluizione è stata quindi seminata su piastre di agar MRS e la conta batterica è stata effettuata dopo l'incubazione per 24h ± 1h a 37°C ± 1°C. Il saggio è stato eseguito in triplicato. La percentuale di sopravvivenza dei batteri è stata calcolata mediante l'utilizzo della seguente formula:

% di sopravvivenza = [Log (UFC/mL a pH test) / Log (UFC/mL a pH controllo 6,2)] X 100.

Resistenza alla bile

La capacità dei ceppi batterici di resistere alla presenza di sali di bile (Ox-bile, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Germania) è stata determinata secondo il metodo di Vinderola & Reinheime (10).
I ceppi batterici sono stati coltivati in brodo MRS a 37°C ± 1°C per 24h ± 1h. Da ciascuno di essi è stata prelevata un'aliquota di 20µL (concentrazione finale di 10^6-10^7 UFC) e addizionata a 980µl di brodo MRS (pozzetto di controllo) e di brodo MRS addizionato con 0,3%, 0,5%, e 1% (w/v) di sali di bile in piastre da 24 pozzetti. Le piastre sono state incubate per 24h ± 1h a 37°C ± 1°C. Successivamente è stata misurata la densità ottica a 600 nm di ciascun pozzetto mediante spettrofotometro (Eppendorf, Amburgo, Germania). Il saggio è stato condotto in triplicato e i risultati sono stati espressi come percentuale di sopravvivenza dei batteri esposti alle diverse concentrazioni di sali di bile rispetto al pozzetto di controllo. La percentuale di sopravvivenza batterica è stata calcolata mediante la seguente formula:

% di sopravvivenza = [O.D. concentrazione test di bile / O.D. terreno senza bile] X 100.

Test di adesione su colture cellulari

La capacità di adesione dei batteri lattici ai villi intestinali è stata valutata mediante l'utilizzo della linea cellulare Caco-2 (ATCC, Rockville, MD, USA), utilizzando il protocollo descritto da Fernandez de

Tabella 1. Risultati relativi ai ceppi di lattobacilli. Resistenza (%) a pH acidi (2,5, 3), concentrazione di bile (0,3%, 0,5% e 1%) e capacità di adesione (%) in rapporto al ceppo batterico di controllo ATCC393.

Ceppo	Specie	Tempo di stagionatura (gg)	Resistenza pH		Resistenza bile		(%)	Adesione cellulare (%)
			2,5	3	0,3	0,5	1	
ATCC393 (controllo)	*Lactobacillus casei*		0	94,6	27	12	5	0,42
417	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	121	0	95,44	80,23	45,88	16,32	0,032
418	*Lactobacillus brevis*	121	0	80,37	48,02	24,79	23,36	0,45
419	*Lactobacillus brevis*	121	0	99,15	100	72,83	65,28	3,20
427	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	121	0	100	52,75	28,72	13,16	0,03
428	*Lactobacillus brevis*	121	73,75	92,62	58,92	19,71	9,28	1,22
429	*Lactobacillus brevis*	121	0	80,28	83,62	33,85	29,59	1,05
434	*Lactobacillus brevis*	121	48,07	93,33	51,87	24,83	14,78	0,96
435	*Lactobacillus brevis*	121	42,68	100	43,55	11,54	9,93	1,00
448	*Lactobacillus brevis*	121	0	92,45	74,58	51,55	49,43	1,58
462	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	150	0	98,59	17,71	18,14	10,02	0,03
463	*Lactobacillus brevis*	150	0	97,36	8,73	6,89	3,38	0,28
464	*Lactobacillus brevis*	150	0	91,62	80,06	41,84	26,30	1,54
472	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	150	33,09	100	36,69	18,81	8,34	0,08
473	*Lactobacillus plantarum*	150	99,89	90,87	50,42	30,04	21,77	1,33
478	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	150	78,57	94,22	9,56	4,61	4,78	0,03
479	*Lactobacillus brevis*	150	54,09	73,40	12	53,30	45	0,02
490	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	150	45,05	72,05	68,46	100	100	0,01

Palencia *et al.* (2), modificato da Garcia-Ruiz *et al.* (3). Le cellule Caco-2 sono state coltivate in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Sigma-Aldrich®) con 10% di siero fetale bovino e incubate a 37°C ± 1°C in atmosfera modificata al 5% di CO_2 e 95% di umidità. Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti (45.000 cellule/pozzetto) e incubate per 15 giorni. I 34 ceppi batterici, coltivati per 16 - 18h a 37°C ± 1°C in brodo MRS, sono stati sottoposti a centrifugazione (10.000*g* per 10 minuti a 4°C) e risospesione in PBS (10^8 UFC/mL, OD600 nm=1). Una quantità pari a 0,5 mL di tale sospensione è stata aggiunta al monostrato di cellule Caco-2 precedentemente lavato con soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco (DPBS) (Lonza Walkersville, Inc., USA), mantenendo un rapporto cellule Caco-2 / batteri di 1:100. Dopo 1h di incubazione a 37°C ± 1°C in atmosfera al 5% di CO_2, i monostrati cellulari sono stati lavati tre volte con PBS per rimuovere i batteri non adesi e disgregati utilizzando tripsina-EDTA allo 0,05%. Per la determinazione del numero di batteri adesi alle cellule, la sospensione cellulare è stata sottoposta a diluizioni seriali in base 10, semina (100uL) su agar MRS e incubazione a 37°C ± 1°C per 24h ± 1h. La capacità di adesione delle colture lattiche è stata calcolata mediante l'utilizzo della seguente formula (3):

capacità di adesione (%) = (UFC/mL batteri adesi/UFC/mL batteri concentrazione iniziale) X 100.

Produzione *in vitro* di batteriocine mediante Deferred Antagonism Test

Il test di produzione *in vitro* di batteriocine è stato condotto mediante il protocollo di Harris *et al.* (5). Le 9 colture lattiche testate (Tabella 3) sono state scelte tra i 34 ceppi di partenza per essere risultate positive alla PCR per i geni codificanti la produzione di batteriocine. I ceppi batterici sono stati coltivati in brodo MRS a 37°C ± 1°C per 24h ± 1h. Tre uL di ciascuna sospensione batterica sono stati posti su piastre di agar Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid™) e incubate a 37°C ± 1°C per 16h ±

Tabella 2. Risultati relativi ai ceppi di enterococchi. Resistenza (%) a pH acidi (3 e 2,5), concentrazione di bile (1%, 0,5% e 0,3%) e capacità di adesione (%) in rapporto al ceppo batterico di controllo ATCC393.

Ceppo	Specie	Tempo di stagionatura (gg)	Resistenza pH		Resistenza bile		(%)	Adesione cellulare (%)
			2,5	3	0,3	0,5	1	
ATCC393 (controllo)	*Lactobacillus casei*		0	94,6	27	12	5	0,42
418 B	*Enterococcus faecium*	121	0	92,80	1,93	3,39	2,79	0,34
418 A	*Enterococcus faecium*	121	0	85,10	1,50	2,81	2,71	0,35
419 A	*Enterococcus faecium*	121	0	90,38	29,18	38,76	39,10	0,21
434 A	*Enterococcus faecium*	121	42,62	83,96	93,01	78,79	73,74	0,61
435 A	*Enterococcus durans*	121	0	91,67	35,43	39,66	33,34	0,30
435 B	*Enterococcus faecium*	121	0	77,59	74,87	57,04	52,16	0,52
448 A	*Enterococcus faecalis*	121	0	90,36	46,81	19,89	14,98	0,71
462 C	*Enterococcus faecalis*	121	0	97,04	2,22	0,81	1,67	0,73
463 A	*Enterococcus faecium*	150	0	95,40	1,69	2,14	2,19	0,71
464 A	*Enterococcus faecium*	150	0	98,05	26,05	34,63	30,90	0,59
464 B	*Enterococcus faecalis*	150	0	100	25,29	16,51	21,57	1,10
472 A	*Enterococcus faecium*	150	47,22	90,82	100	100	80,01	0,52
473 A	*Enterococcus faecium*	150	0	87,08	1,37	2,31	2,33	0,97
478 A	*Enterococcus durans*	150	0	93,76	63,42	35,03	20,46	0,22
479 C	*Enterococcus faecium*	150	0	99,52	35,63	20,68	24,41	0,38
490 A	*Enterococcus faecalis*	150	0	79,32	41,64	13,10	13,32	0,29
490 B	*Enterococcus faecium*	150	0	90,96	6,76	7,24	6,56	0,47

Tabella 3. Ceppi con attività antibatterica contro *Listeria monocytogenes* e misura del raggio dell'alone di inibizione (mm).

Ceppo	Tempo di stagionatura (gg)	Specie	Deferred Antagonism Test (mm)
ATCC11454 (controllo)		*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*	8
417	121	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	2
472	150	*Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*	2
418 A	121	*Enterococcus faecium*	10
418 B	121	*Enterococcus faecium*	10
419 A	121	*Enterococcus faecium*	8
435 B	121	*Enterococcus faecium*	6
464 A	150	*Enterococcus faecium*	4
473 A	150	*Enterococcus faecium*	10
490 B	150	*Enterococcus faecium*	5

1h (9). Contemporaneamente sono state allestite in brodo BHI le colture dei batteri patogeni. Dopo incubazione a 37°C ± 1°C per 16h ± 1h, 8uL di ciascuna sospensione di batteri patogeni sono stati inclusi in 8uL di BHI soft agar (brodo BHI addizionato con 0,7% di agar), precedentemente sciolto per ebollizione e mantenuto a temperatura costante di 46°C ± 1°C in bagnomaria. Il BHI soft agar è stato, quindi, versato sulle piastre di BHI agar contenenti le colture lattiche (spot). Le piastre sono state incubate per ulteriori 24h ± 1h a 37°C ± 1°C. La potenziale attività di inibizione di crescita nei confronti di ciascun batterio patogeno è stata verificata dalla presenza di un alone intorno alla coltura lattica, il cui raggio è stato misurato in millimetri. Tutti i test sono stati condotti in triplicato.

Risultati

Nelle Tabelle 1 e 2 sono stati espressi i risultati percentuali dei 17 ceppi di lattobacilli e 17 ceppi

di enterococchi, relativi alla resistenza a differenti valori di pH acidi (2,5 e 3) e di concentrazioni di bile (0,3%, 0,5% e 1%) e alla capacità di adesione dei singoli ceppi batterici alle cellule Caco-2 .

In relazione al pH 3, il 41,17% dei lattobacilli e il 23,52% degli enterococchi testati hanno mostrano valori di resistenza superiori a quelli rilevati per il ceppo di controllo. A pH 2,5, il ceppo di controllo non ha mostrato resistenza contrariamente al 47% dei lattobacilli e all' 11,8% degli enterococchi che hanno mostrato, rispettivamente, valori di resistenza compresi tra 33,09% e 99,89% e tra 42,62% e 47,22%.

In riferimento alla bile, il 76,5% dei lattobacilli e il 52,9% degli enterococchi hanno mostrato valori di resistenza superiori al ceppo di controllo per tutte le diverse concentrazioni di bile (Tabelle 1 e 2).

Per quanto attiene alla proprietà di adesione su colture cellulari, il 52,9% dei lattobacilli e il 58,8% degli enterococchi hanno mostrato una capacità superiore rispetto al ceppo di controllo (Tabelle 1 e 2).

I ceppi sottoposti alle prove di produzione di batteriocine sono riportatati in Tabella 3 in associazione con l'estensione, espressa in millimetri, del raggio dell'alone di inibizione determinato nei confronti di *Listeria monocytogenes.* I due ceppi di lattobacilli e i 7 ceppi di enterococchi sottoposti a Deferred Antagonism Test hanno mostrato attività di produzione di batteriocine, tra i batteri patogeni testati, unicamente contro *Listeria monocytogenes.*

La valutazione complessiva dei risultati ha consentito di identificare 2 ceppi di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* a potenziale attività probiotica da poter impiegare nella produzione del formaggio. Un ceppo ha mostrato una percentuale di sopravvivenza di 95,44% a pH 3, di 16,32%, 45,87% e 80,23% a concentrazioni di bile rispettivamente dell'1%, 0,5% e 0,3%, e una capacità di adesione alle cellule Caco-2 dello 0,032%. Il secondo ceppo ha mostrato una percentuale di sopravvivenza del 100% a pH 3 e del 33,09% a pH 2,5, dell'8,34%, 18,81% e 36,69% a concentrazioni di bile rispettivamente dell'1%, 0,5% e 0,3%, e una capacità di adesione alle cellule Caco-2 dello 0,080%. Entrambi i ceppi hanno mostrato inibizione della crescita *in vitro* (Deferred Antagonism Test) di *Listeria monocytogenes* attraverso la produzione di un alone con raggio di 2 mm.

I 7 ceppi di *Enterococcus faecium* riportati in Tabella 2 e 3 hanno mostrato considerevoli potenzialità probiotiche. Tuttavia su di essi sono in corso ulteriori indagini per la valutazione della loro completa innocuità.

Discussione

In relazione alla resistenza a pH acidi e a differenti concentrazioni di sali di bile, i ceppi di lattobacilli hanno mostrato una capacità di sopravvivenza superiore ai ceppi di enterococchi.

I dati ottenuti in merito alla resistenza a pH 3 dei lattobacilli (tra 72,05% e 100%) e degli enterococchi (tra 77,59% e 100%) sono risultati in linea con quanto riportato da Sabir *et al.*, per il kefir (8) (valori di resistenza a pH 3,5 delle colture lattiche tra 88% e 96%). Tuttavia la resistenza a pH 2,5 è risultata più bassa nei ceppi testati rispetto a quanto riportato in letteratura (tra 65% e 89%)(8).

Per quanto riguarda i risultati relativi alla resistenza alla bile, essi hanno presentato un range relativamente ampio in relazione alle diverse concentrazioni di sali. In particolare, alla concentrazione di bile dello 0,5% i valori sono stati compresi tra il 4,6% e il 100% per i lattobacilli, tra lo 0,8% e il 100% per gli enterococchi e il 12% per il ceppo di controllo. I dati riferiti da Sabir *et al.* (8) mostrano un range di resistenza più ridotto, oscillante tra il 60% e il 90%. Lo stesso si è verificato alla concentrazione di bile dello 0,3%. In questo caso il range di resistenza mostrato dai lattobacilli è stato compreso tra l'8,7% e il 100%, tra l'1,4% e il 100% per gli enterococchi e il 27% per il ceppo di controllo. I dati riportati da Sabir *et al.* (8), mostrano valori di resistenza compresi tra il 68% e il 92%. Tuttavia, nell'ambito delle prove condotte, le colture lattiche testate hanno mostrato percentuali di valori di resistenza a pH acidi e bile superiori a quelli riportati dal ceppo di controllo.

Per l'adesione cellulare, il confronto con i dati presenti in letteratura non è stato possibile in quanto le tecniche utilizzate sono risultate numerose e diverse le matrici alimentari di partenza. I valori riportati in questo studio (capacità di adesione tra 0,01% e 3,20% per i lattobacilli e tra 0,21% e 1,10% per gli enterococchi) sarebbero comunque inferiori rispetto a quanto riferito da Garcia-Ruitz *et al.* per colture lattiche isolate da vini (3) (tra 0,37% e 12,2%) e Collado *et al.* per colture lattiche commerciali (1) (tra 0,9% e 20%). Ancora una volta le colture lattiche testate in questo studio hanno presentato percentuali di adesione che, in più del 50% dei ceppi, hanno superato quelli ottenuti dal ceppo di controllo. I ceppi isolati, inoltre, hanno presentato un'attività antibatterica unicamente contro *Listeria monocytogenes.* È invece riportata una più estesa attività antimicrobica da parte dei lattobacilli testati nel lavoro di Ren *et al.* (7).

E' importante sottolineare che il confronto tra i dati deve essere effettuato con accuratezza. In merito, da tenere in debita considerazione, è la provenienza in

questo studio dei ceppi batterici derivanti da una matrice specifica (formaggio di pecora a lunga stagionatura prodotto secondo un particolare disciplinare di produzione). Questa origine, infatti, indirizza notevolmente le caratteristiche dei ceppi isolati. Da considerare, inoltre, come nelle linee guida per la valutazione delle caratteristiche probiotiche dei ceppi batterici non venga riportato alcun valore limite di resistenza a pH e bile, o di adesione cellulare. Per questa ragione gli autori ritengono che il confronto più utile sia quello con ceppi di controllo certificati.

Conclusioni

In seguito alla valutazione dei risultati, due ceppi di *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* sono stati identificati come potenziali ceppi probiotici da poter impiegare nella produzione del Pecorino di Farindola allo scopo di incrementarne le caratteristiche di salute e sicurezza, a tutela del consumatore. Sui 7 ceppi di *Enterococcus faecium*, che pure hanno dimostrato una potenziale attività probiotica, sono in corso ulteriori analisi per valutarne la completa innocuità.

Bibliografia

1. Collado M.C., L. Jalonen, J. Meriluoto and S. Salminen, 2006, *Protection mechanism of probiotic combination against human pathogens: in vitro* adhesion to human intestinal mucus. Asia Pac J Clin Nutr, 15(4): 570-575.
2. de Palencia P.F., P. López, A.L. Corbí, C. Peláez and T. Requena, 2008, Probiotic strains: survival under simulated gastrointestinal conditions, *in vitro* adhesion to Caco-2 cells and effect on cytokine secretion. Eur Food Res Technol, 227(5): 1475-1484.
3. García-Ruiz A., D.G. de Llano, A. Esteban-Fernández, T. Requena, B. Bartolomé and M.V. Moreno-Arribas, 2014, Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food microbiol, 44: 220-225.
4. Gomes da Cruz A., F.C. Alonso Buriti, C.H. Batista de Souza, J.A. Fonseca Faria and S.M. Isay Saad, 2009, Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. Trends Food Sci & Technol, 20 (8): 344-354.
5. Harris L.J., M.A. Daeschel, M.E. Stiles and T.R. Klaenhammer, 1989, Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. J Food Prot, 52(6): 384-387.
6. Panel E.B., 2013, EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Scientific opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). EFSA J., 11: 3449.
7. Ren D., C. Li, Y. Qin, R. Yin, S. Du, F. Ye, C. Liu, H. Liu, M. Wang, Y. Li, Y. Sun, X. Li, M. Tian and N. Jin, 2014, *In vitro* evaluation of the probiotic and functional potential of *Lactobacillus* strains isolated from fermented food and human intestine. Anaerobe, 30: 1-10.
8. Sabir F., Y. Beyatli, C. Cokmus and D. Onal-Darilmaz, 2010, Assessment of potential probiotic properties of *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., and *Pediococcus* spp. strains isolated from kefir. J Food Sci, 75(9): M568-M573.
9. Tahara T., M. Oshimura, C. Umezawa and K. Kanatani, 1996, Isolation, partial characterization, and mode of action of Acidocin J1132, a two-component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132, Appl Environ Microbiol, 62(3): 892-897.
10. Vinderola C.G. and J.A. Reinheimer, 2003, Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "*in vitro*" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Res Int, 36(9): 895-904.
11. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations (WHO/FAO) 2001. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition Paper, 85.