

# Scotta-innesti naturali: un ponte tra il passato e il futuro del Pecorino Romano DOP

R. COMUNIAN, A. PABA, S. SCHIRRU, E. DAGA, G. COSSO, M.F. SCINTU

Agris Sardegna, Dipartimento per la ricerca nelle produzioni animali (DiRPA) – Loc. Bonassai, SS291 km 18.600 – 07100 SASSARI

**PAROLE CHIAVE: SCOTTA-INNESTO NATURALE, PECORINO ROMANO DOP**

## INTRODUZIONE

Il Pecorino Romano DOP deve essere prodotto, secondo disciplinare di produzione, “con colture di fermenti lattici naturali ed autoctone, talora integrate con ceppi provenienti dall’area di produzione”. Le innovazioni tecnologiche e il miglioramento delle condizioni igieniche di produzione di latte e formaggio, dettato dalle normative comunitarie in materia di igiene, hanno causato una riduzione della microflora utile, proveniente dall’ambiente, necessaria per garantire una corretta acidificazione ed inibire lo sviluppo di batteri indesiderati, rendendo sempre più difficile l’ottenimento del tradizionale innesto naturale (scotta-innesto). I caseifici ovinici della Sardegna fabbricano, accanto ai formaggi DOP, prodotti meno legati al territorio e alla tradizione, utilizzando fermenti selezionati da altre realtà produttive che hanno ormai da anni colonizzato l’ambiente di produzione a discapito della biodiversità della microflora naturale locale. Scopo del presente lavoro è quello di mettere a disposizione dei caseifici, uno scotta-innesto naturale, biodiverso, costituito da un numero di ceppi indefinito, fortemente legato al territorio e in linea con il disciplinare di produzione, per la fabbricazione di Pecorino Romano DOP. La soluzione prospettata è quella del recupero di colture naturali in scotta, che rispecchiano l’ambiente di produzione del passato, ancora non contaminato da ceppi selezionati, conservate *in toto*, in forma liofilizzata, nella collezione microbica di Agris, tra il 1968 e il 1970.

## MATERIALI E METODI

La collezione Agris annovera, accanto ad oltre 10.000 singoli isolati, circa 80 colture naturali miste in scotta, raccolte presso 9 caseifici sardi produttori di Pecorino Romano DOP. Sei di queste sono state inoculate, in skim milk ovino addizionato dello 0,5% di estratto di lievito e incubate overnight a 42°C, per saggiarne la vitalità e la concentrazione in cellule. Lo studio delle caratteristiche microbiologiche e delle attitudini tecnologiche delle colture riattivate è stato articolato in 2 fasi: 1) prove in laboratorio sulle singole colture; 2) caseificazioni presso un caseificio industriale. Durante la fase 1, dopo aver effettuato la conta in piastra dei principali gruppi di batteri lattici e anticaseari (Tab. 1), sono state ottenute le curve di crescita e di acidificazione delle colture ed è stato misurato il tempo da esse impiegato per raggiungere pH 5,2, in scotta e in latte ovino scremato sterili, partendo da un inoculo di 6 Log UFC/ml ed incubando a 42°C per 16 ore. Sono stati inoltre eseguiti i test di fermentazione del citrato su terreno CF (MRS agar modificato secondo Bottazzi *et al.*, 1971).

Durante la fase 2, sono stati formulati due mix starter (mix A = SR30 + SR56 e mix B = SR30 + SR63) con i quali sono state effettuate 12 caseificazioni, 6 in aprile e 6 in giugno (3 col mix A e 3 col mix B, per ciascuno dei due periodi). Per ogni caseificazione sono stati trasformati 1.200 litri di latte inocolandoli con 10<sup>6</sup> UFC/ml di coltura starter (inoculo V/V 0,625% e 0,5%, rispettivamente per il mix A e il mix B). La preparazione dei due mix starter è stata effettuata inoculando le 3 colture concentrate e congelate (SR30, SR56 e SR63), separatamente, in scotta ovina sterile, in ragione di 6 Log UFC/ml, e incubando a 42 °C, per tempi diversi, sino al raggiungimento di un pH ≤ a 5,0 (SR30 pH 5; SR56 pH 4,5 e SR63 pH 3,6). I tempi di incubazione (SR30 6h; SR56 6h; SR63 14h) sono stati stabiliti in base ai dati di concentrazione in cellule vitali e alla velocità di acidificazione ottenuti monitorando le curve di crescita e di acidificazione di ciascuna coltura (dati non riportati). Le colture madri così ottenute sono state successivamente inoculate in scotta ovina sterile per ottenere lo scotta-innesto da inoculare nel latte in caldaia (inoculo 6 Log UFC/ml).

Per ciascuna caseificazione sono stati inoltre rilevati i parametri tecnologici e sono stati raccolti campioni di latte termizzato, scotta-innesto, caglio e formaggio a 24h, 1, 3, 5 e 8 mesi dalla fabbricazione.

Per ciascun campione è stata effettuata la conta per i diversi gruppi microbici riportati in Tab. 1. I campioni sono stati preparati secondo la norma FIL-IDF standard 122C (IDF, 1996). Dai campioni di innesto e formaggio prelevati ai diversi periodi di maturazione sono state isolate, purificate ed identificate a livello di specie, tramite PCR specie specifica (Jackson *et al.*, 2004; Cremonesi *et al.* 2011) o sequenziamento del 16S rDNA (BMR Genomics, Padova, Italy), sino a 10 colonie per ciascun terreno seminato (escluso VRBA mug).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

### Fase 1

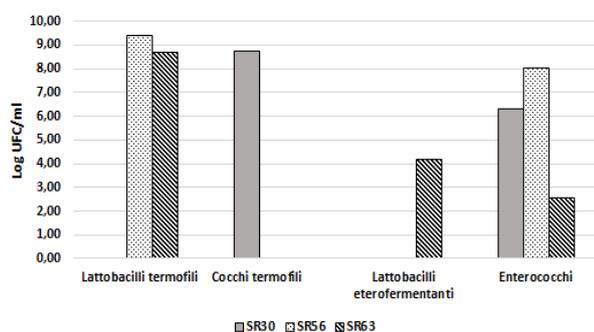
Quattro colture (SR30, SR56, SR63 e SR74) su sei si sono dimostrate attive e capaci di coagulare il latte, raggiungendo una concentrazione in cellule vitali tra 8 e 9 Log UFC/ml. L’unica scotta in cui si è evidenziata la presenza di un rilevante numero (6,10 Log UFC/ml) di citrato-fermentanti in grado di produrre CO<sub>2</sub> e, potenzialmente, difetti nel formaggio (Bottazzi *et al.*, 1971), è risultata la SR74. Pertanto si è deciso di escluderla da questa sperimentazione. I risultati delle conte relative ai principali gruppi di batteri lattici rilevati nelle tre colture scelte sono riportati in Fig. 1. Nella SR30 erano presenti cocchi termofili ed enterococchi (8,72 e 6,32 Log UFC/ml, rispettivamente).

**Tab. 1** - Condizioni di incubazione dei terreni di coltura utilizzati e gruppi microbici ricercati in scotta-innesti, latte, caglio e formaggi.

| Terreni         | Microorganismi ricercati         | Tempo incubazione   | Temperatura incubazione | Campioni analizzati             |
|-----------------|----------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------------------|
| MPCA            | Conta mesofila totale            | 72 ore aerobiosi    | 30 °C                   | latte, caglio                   |
| M17 agar        | Cocchi termofili                 | 72 ore anaerobiosi  | 45 °C                   | scotte, formaggi                |
| FH agar         | Lattobacilli mesofili            | 72 ore anaerobiosi  | 37 °C                   | scotte, latte, caglio, formaggi |
| MRS agar pH 5.4 | Lattobacilli termofili           | 72 ore anaerobiosi  | 45 °C                   | scotte, formaggi                |
| KAA             | Enterococchi                     | 18-24 ore aerobiosi | 42 °C                   | scotte, latte, caglio, formaggi |
| CF agar*        | Citrato fermentanti              | 3-9 gg anaerobiosi  | 37 °C                   | scotte, latte, caglio, formaggi |
| MSA             | Stafilococchi                    | 72 ore aerobiosi    | 30 °C                   | scotte, latte, caglio, formaggi |
| VRBA MUG        | Coliformi totali, <i>E. coli</i> | 18-24 ore aerobiosi | 37 °C                   | scotte, latte, caglio, formaggi |

\*MRS modificato secondo Bottazzi *et al.*, 1971, utilizzato a partire dalla seconda serie di lavorazioni.

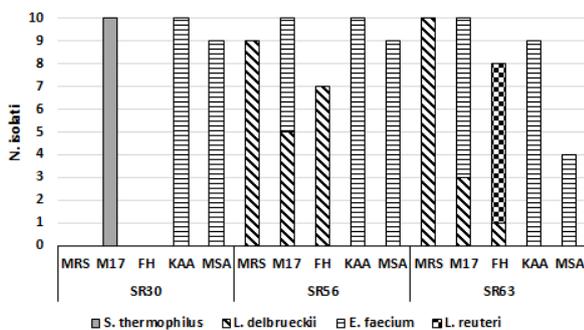
La microflora della SR56 è risultata costituita da lattobacilli termofili ed enterococchi (9,41 e 8,03 Log UFC/ml, rispettivamente), mentre nella SR63, oltre questi due gruppi (8,67 e 2,56 Log UFC/ml, rispettivamente) sono stati contati anche 4,18 Log UFC/ml di lattobacilli eterofermentanti.



**Fig. 1** – Conte (Log UFC/ml) principali gruppi di batteri lattici presenti negli scotta-innesti.

Sono state isolate e identificate, con tecniche molecolari, un totale di 115 colonie. Come si può osservare in Fig. 2, dal momento che i terreni utilizzati per la conta non sono tutti selettivi, ma solo elettivi per i diversi gruppi batterici, enterococchi sono stati isolati da KAA, M17 e MSA, e lattobacilli termofili da MRS, M17 e FH.

In particolare, dalla SR30 sono stati isolati esclusivamente cocchi appartenenti alle specie *Streptococcus thermophilus* (n. 10) ed *Enterococcus faecium* (n. 19). Dalle SR56 e SR63 sono stati isolati sia cocchi (*E. faecium*, n. 24 e n. 20, rispettivamente) che bacilli termofili omofermentanti (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, n. 21 e n. 14 rispettivamente) e, solamente dalla SR63, bacilli eterofermentanti (*Lactobacillus reuteri*, n. 7).



**Fig. 2** – Specie isolate dalle colture SR30, SR56 e SR63.

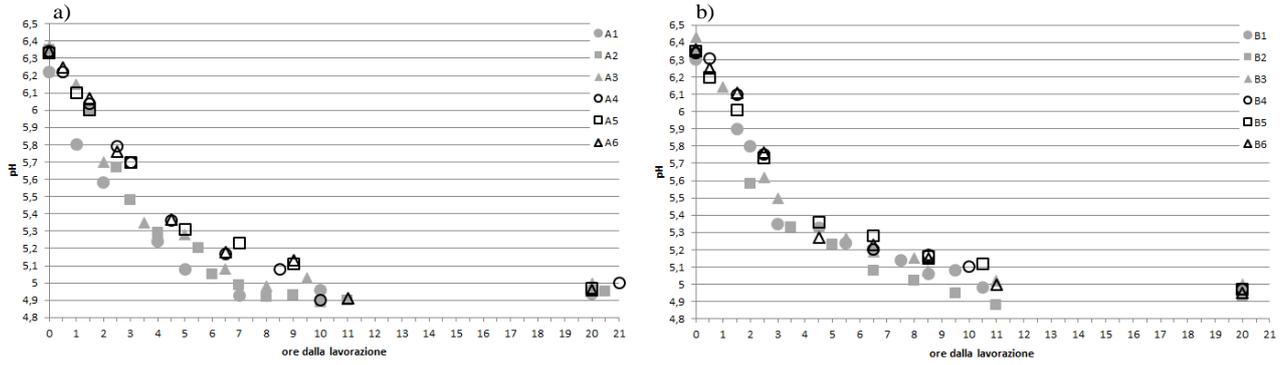
*S. thermophilus* e *L. delbrueckii* spp. *lactis* sono, insieme a *Lactobacillus helveticus* (quest'ultimo più frequentemente isolato

da scotta-innesti utilizzati nel Lazio) le specie starter tipiche dello scotta-innesto (Bottazzi e Ledda, 1967; Galistu *et al.*, 1996; Mangia *et al.* 2011). Le altre specie isolate dalle colture studiate nel presente lavoro (enterococchi e lattobacilli eterofermentanti) non hanno un ruolo determinante nell'acidificazione della cagliata, ma contribuiscono alla maturazione del formaggio durante tutto il corso della stagionatura.

In particolare, gli enterococchi, uno dei gruppi di batteri lattici maggiormente messi in discussione per la potenziale patogenicità di alcuni ceppi, sono presenti in elevate concentrazioni in molti formaggi prodotti nei paesi mediterranei, contribuendo al conferimento di sapori e aromi tipici, attraverso processi di proteolisi, lipolisi e metabolismo del citrato. Inoltre alcuni ceppi sono in grado di produrre batteriocine, altri possono anche avere attività probiotica (Folquié Moreno *et al.*, 2006; Comunian 2010; Schirru *et al.*, 2012). La presenza della specie *L. reuteri*, già individuata in precedenza nel Pecorino Romano DOP, ma non nello scotta-innesto, potrebbe avere importanti implicazioni per la qualità del formaggio (Dellaglio *et al.*, 1981). Si tratta infatti di una specie eterofermentante obbligata in grado di seguire *pathways* metabolici che conducono allo sviluppo di precursori di aromi che esaltano la qualità sensoriale del prodotto finale (Dal Bello *et al.*, 2005). A questa specie sono poi attribuite proprietà probiotiche con effetti benefici per la salute umana (Shornikova *et al.*, 1997; Casas *et al.*, 2000; Connolly, 2004; Sinkiewicz, 2010). *L. reuteri* è inoltre capace di produrre sostanze antimicrobiche, la più nota delle quali è la reuterina, capace di inibire lo sviluppo di diverse specie patogene quali *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC) (El-Ziney *et al.*, 1998), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* ssp. *choleraesuis*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* e *Campylobacter jejuni*. (Arqués *et al.*, 2004). La sua presenza potrebbe quindi contribuire a garantire una migliore qualità igienico-sanitaria dei prodotti. I risultati delle prove tecnologiche, effettuate in laboratorio sulle 3 colture scelte, hanno evidenziato una buona capacità acidificante, sia in latte che in scotta, di tutte e tre le colture saggiate. Le ore impiegate da ciascuna coltura per arrivare a valori di pH prossimi a 5,2 variavano a seconda della scotta e del mezzo di coltura (in scotta ovina: SR30 e SR56 2h, SR63 4h; in latte ovino scremato SR30 2h, SR56 3h; SR63 5,5h).

#### Fase 2

Per sfruttare l'azione sinergica delle colture starter scelte e considerando che gli scotta-innesti storicamente utilizzati per la produzione di Pecorino Romano DOP sono generalmente composti sia da cocchi che da bacilli in rapporto approssimativo 1:1 (Arrizza, 1972), si è scelto di costituire 2 miscele (mix A: SR30+SR56 e mix B: SR30+SR63) rispettando tale rapporto. Nelle 12 prove sperimentali in caseificio, la cinetica di acidificazione della cagliata si è dimostrata soddisfacente, dal punto di vista tecnologico, per entrambi i mix che hanno determinato il raggiungimento di valori di pH prossimi a 5,2 tra le 4 e le 6 h. Il pH a 24 h era compreso tra 4,93 e 5,00 (Fig. 3a, b).



**Fig. 3a, b** – Curve di acidificazione ottenute a) con Mix A (SR30+SR56) impiegato per le sei lavorazioni in caseificio (Lavorazioni aprile A1, A2 e A3; Lavorazioni maggio-giugno A4, A5 e A6); b) con Mix B (SR30+SR63) impiegato per le sei lavorazioni in caseificio (Lavorazioni aprile B1, B2 e B3; Lavorazioni maggio-giugno B4, B5 e B6).

La media delle conte mesofile totali delle soluzioni caglio utilizzate per le sei caseificazioni di aprile e le sei di maggio era rispettivamente  $3,72 \pm 0,82$  Log UFC/ml e  $3,87$  e  $0,71$  Log UFC/ml, in linea con quanto dichiarato dal produttore ( $3,75$  Log UFC/g).

I latti termizzati utilizzati per le 12 caseificazioni avevano tutti una buona qualità microbiologica. Infatti, le conte mesofile totale (CMT) in aprile erano compresa tra  $2,71$  e  $3,67$  Log UFC/ml, mentre in maggio-giugno erano lievemente più elevate, variando tra  $3,21$  e  $4,26$  Log UFC/ml.

La conta degli enterococchi è risultata sempre  $< 10$  UFC/ml.

I presunti lattobacilli mesofili eterofermentanti facoltativi (FHL) erano presenti solo nei latti di aprile e in uno dei campioni di giugno, in concentrazione intorno ai  $2$  Log UFC/ml.

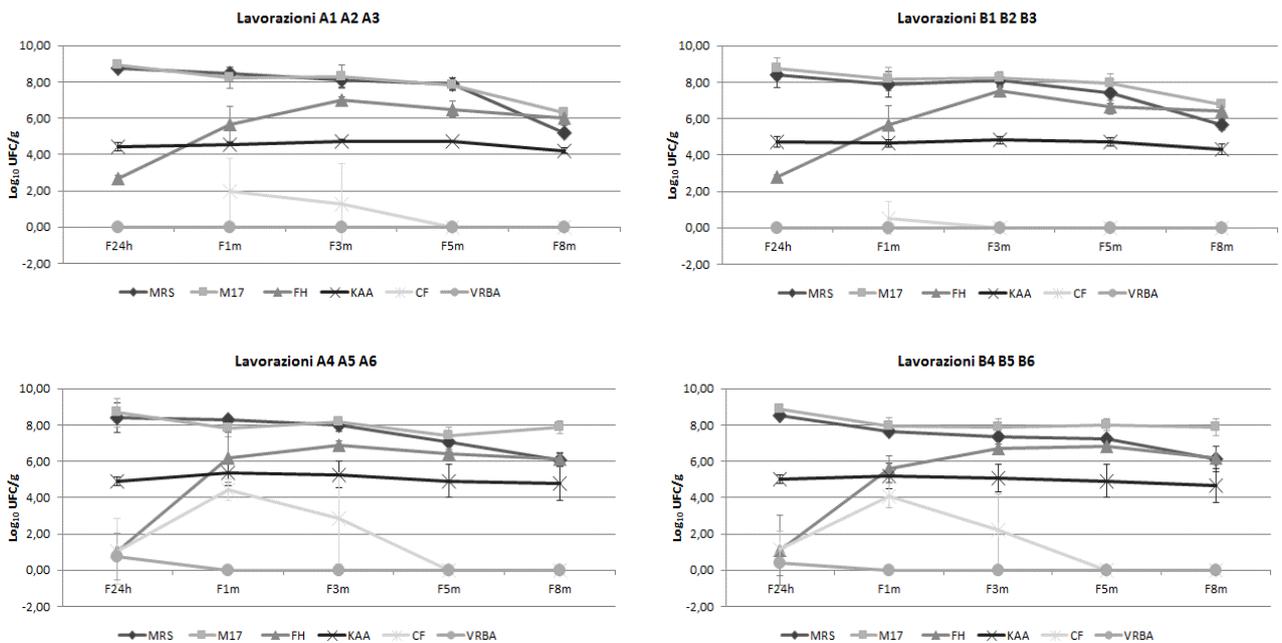
I coliformi erano assenti o  $< 10$  UFC/ml in tutti i campioni analizzati.

L'evoluzione delle conte microbiche ottenute per i campioni di formaggio, analizzati da 24 ore a 8 mesi dalla fabbricazione, è riportata nella Fig. 4.

Le specie starter (cocchi e bacilli termofili) permangono vitali ad elevate concentrazioni ( $> 6$  Log UFC/g), sino a 8 mesi di stagionatura, nei formaggi di tutte le lavorazioni, indipendentemente dal mix starter utilizzato e dal periodo di fabbricazione. In particolare, nei formaggi a 8 mesi delle lavorazioni di maggio-giugno, gli streptococchi termofili sono ancora in concentrazione intorno agli  $8$  Log UFC/g.

Gli enterococchi si mantengono costanti tra i  $4$  e i  $5$  Log UFC/g durante tutta la stagionatura, in tutti i campioni.

I presunti FHL, partendo da concentrazioni di circa  $2$  Log UFC/g nei formaggi a 24 h, prodotti ad aprile, e più basse (circa  $1$  Log UFC/g) in quelli prodotti in maggio-giugno, raggiungono la loro massima concentrazione (intorno ai  $7$  Log UFC/g) ai 3 mesi di maturazione e si mantengono pressoché costanti sino agli 8 mesi.



**Fig. 4** – Evoluzione delle conte microbiche nei formaggi analizzati da 24 ore a 8 mesi dalla fabbricazione (Lavorazioni di aprile con mix A: A1, A2, A3; con mix B: B1, B2, B3 – Lavorazioni di maggio-giugno con mix A: A4, A5, A6; con mix B: B4, B5, B6).

Infatti, come riportato in letteratura, insieme alle specie starter sono presenti nel formaggio, sino alla fine della maturazione, specie non starter (NSLAB), apportate dal latte di partenza o dall'innesto, quali *E. faecium*, *Enterococcus durans*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus fermentum* (Arrizza, 1972; Mannu *et al.*, 2000; Di Cagno *et al.*, 2003; Scintu *et al.*, 2007; Mangia *et al.* 2011; Pirisi *et al.*, 2011).

I citrati fermentanti hanno raggiunto i valori massimi della loro concentrazione nei formaggi di maggio ad 1 mese ( $\geq 4$  Log UFC/g) e sono stati rilevati sino a 3 mesi di maturazione. La presenza di questo gruppo microbico non ha comunque mai causato la comparsa di difetti di gonfiore in nessuno dei formaggi analizzati. I coliformi sono risultati presenti solo nei formaggi a 24h delle caseificazioni di maggio-giugno, ma in concentrazione estremamente basse ( $< 10$  UFC/g).

## CONCLUSIONI

I promettenti risultati ottenuti in questa sperimentazione hanno permesso di verificare e confermare la possibilità di utilizzare le colture naturali in scotta, conservate *in toto*, in forma liofilizzata, da oltre 40 anni, per continuare a produrre ancora oggi un Pecorino Romano DOP nel solco della tradizione. Il recupero e la produzione in larga scala delle colture naturali saggiate nel presente lavoro potrebbe consentire di introdurre soluzioni tecnologiche innovative per ovviare ai problemi legati alla produzione giornaliera di un buon innesto naturale la cui efficacia non è sempre garantita.

## RINGRAZIAMENTI

Gli autori ringraziano il Sig. Giovanni Galistu responsabile tecnico del Consorzio di tutela del Pecorino Romano DOP e il Sig. Giuseppe Viridis responsabile del caseificio LAIT di Ittiri (SS) per la disponibilità e collaborazione. Si ringraziano inoltre i tecnici Sig. Salvatore Sanna e Sig.ra M. Carmen Fozzi per il supporto tecnico nell'esecuzione delle analisi.

Studio in collaborazione con il Consorzio per la Tutela del formaggio Pecorino Romano DOP, nell'ambito del Programma di "Interventi straordinari di ricerca e sviluppo a favore delle aziende agricole e delle imprese di trasformazione e commercializzazione". Delibera Giunta Regionale n. 46/34 del 7.12.2010.

## BIBLIOGRAFIA

- Arqués, J.L., Fernández, J., Gaya, P., Nuñez, M., Rodríguez, E., Medina, M., (2004); International Journal of Food Microbiology 95, 225-229.
- Arrizza S. (1972), Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia; 23 (4), 226-230.
- Bottazzi V., Ledda A., (1967), Annals of Microbiology; 8, 41-53.
- Bottazzi V., Ledda A., Arrizza S. (1971), Lait; 505-506, 328-331.
- Casas, I.A., Dobrogosz W.J., (2000), Microbial Ecology in Health and Disease; 12, 247-285.
- Comunian R. (2010). Doctoral thesis, Sassari University. ID Code 3427
- Connolly, E., (2004), NUTRAfoods; 3, 15-22.
- Cremonesi P., Vanoni L., Morandi S., Silveti T., Castiglioni B., Brasca M. (2011), International Journal of food microbiology; 146, 207-211.
- Dal Bello F., Walter J., Roos S., Jonsson H., Hertel C.(2005), Applied and Environmental Microbiology; 71 (10), 5873-5878.
- Dellaglio F., Arrizza S., Ledda A., (1981), Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene; 2 (4), 349-356.
- El-Ziney, M.G., Debevere, J.M., (1998), Journal of Food Protection; 61, 1275- 1280.
- Folqué Moreno M.R., Sarantinopoulos P., Tsakalidou E., De Vuyst L., (2006), International Journal of Food Microbiology 106: 1 – 24.
- Galistu G.- Piredda G.- Pirisi A. Scintu M. F.- Ledda A., (1996), EAAP Publication; 90, 178-181.
- IDF (1996) FIL-IDF Standard 122C. IDF Brussel, Belgium.
- Jackson C.R., Fedorka-Cray P.J., Barret J.B. (2004), Journal of Clinical Microbiology; 42, 3558-3565.
- Mangia N.P., Murgia M.A., Garau G., Deiana P. (2011), Journal of Agricultural Science and Technology; 13 (4), 585-600.

- Mannu L., Comunian R., Scintu M.F., (2000), International Dairy Journal; 10, 383-389
- Pirisi A., Comunian R., Urgeghe P.P., Scintu M.F., (2011), Small Ruminant Research; 101, 102-112.
- Schirru S., Todorov S.D., Favaro L., Mangia N.P., Basaglia M., Casella S., Comunian R., Gombossy de Melo Franco B.D., Deiana P. (2012), Food Control; 25, 309 -320.
- Scintu, M.F., Mannu, L., Mulargia, A.F., Comunian, R., Daga, E., Paba, A., Galistu, G., (2007), S.I. IDF 0801/Part 4, 357-359.
- Shormikova, A.V., Casas, I.A., Mykkänen, H., Salo, E., Vesikari, T., (1997), The Pediatric Infectious Disease Journal; 16, 1103-1107.
- Sinkiewicz, G., Cronholm S., Ljunggren L., Dahlén G., Bratthal G. (2010), Swedish dental Journal; 34, 197-206.