

PROGETTO “FERMALGA”: SALVAGUARDIA DELLA BIODIVERSITA' E DELLA TIPICITA' NELLE PRODUZIONI CASEARIE DELLE MALGHE TARENTINE

Carafa I.¹, Gubert F.², Schiavon S.², Tuohy K.¹, Pecile A.², Franciosi E.¹

¹ CENTRO RICERCA E INNOVAZIONE – FEM, Fondazione E. Mach, San Michele all'Adige (TN)

² CENTRO TRASFERIMENTO TECNOLOGICO – FEM, Fondazione E. Mach,
San Michele all'Adige (TN)

Riassunto

In provincia di Trento sono attive un centinaio di malghe nelle quali il latte viene trasformato in loco. In tempi recenti si è diffuso l'utilizzo di *starter* industriali per avviare la fermentazione nelle prime ore dopo l'estrazione della cagliata evitando così l'instaurarsi di flore patogene o avventizie non desiderate che potrebbero portare a difettosità o influire sulla salubrità dei formaggi. L'introduzione di fermenti non autoctoni in queste produzioni artigianali determina un appiattimento ed una banalizzazione sensoriale oltre che una perdita di biodiversità e di tipicità. Considerate le importanti difficoltà operative riscontrabili in malga nella preparazione ed utilizzo del latte-innesto o del siero-innesto, il progetto FERMALGA si è posto l'obiettivo di fornire ai casari di malga colture *starter* autoctone, messe a punto a partire dal *pool* microbiologico isolato e selezionato nelle diverse malghe, con lo scopo di offrire una valida alternativa ai fermenti industriali senza perderne in tipicità e legame con il territorio. La selezione di *starter* autoctoni ha coinvolto il personale della FEM, nel corso dell'estate 2011, in un lavoro di selezione di ceppi da 8 malghe trentine appartenenti a tre diversi areali (Val di Sole, Valsugana Lagorai, Altopiano delle Vezzene), nelle quali sono state seguite 35 giornate di lavorazione. Sono stati prelevati campioni di latte, cagliata appena estratta e formaggio a 1 giorno, 1 mese e 7 mesi di stagionatura per le successive analisi microbiologiche. Sono stati fatti isolamenti da campioni di cagliata e formaggio a 24 h di stagionatura per la selezione di *starter*, da campioni di formaggio a 7 mesi per la selezione di NON-*starter*. In totale sono stati isolati 643 ceppi di cui 460 erano batteri lattici (LAB): 292 mesofili e 168 termofili. Tutti i LAB isolati sono stati sottoposti a RAPD-PCR (*Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction*) utilizzando due *primer*, quindi raggruppati e identificati attraverso il sequenziamento parziale del gene 16S RNA e PCR-specie specifiche. I ceppi, appartenenti a 268 biotipi differenti, sono stati testati per le loro proprietà tecnologiche: per la selezione di *starter* sono state testate la velocità di acidificazione, proteolisi, autolisi, e la capacità di inibire la crescita dei coliformi; per i non-*starter* si è indagato per attività proteolitica, per la produzione di *off-flavour*, di ammine biogene, di diacetile, per la capacità etero-fermentativa e di produrre acidi coniugati linoleici (CLA). Riguardo gli *starter* i ceppi mesofili, appartenenti al genere *Lactococcus lactis*, hanno mostrato la più rapida capacità di acidificazione, infatti, abbassavano il pH del latte a 4.5 in 12 h; i ceppi termofili, appartenenti per la maggiore a *Streptococcus thermophilus* acidificavano fino a pH 3.8, ma in tempi maggiori dei mesofili (36 h) ed avevano buone percentuali di autolisi (tra il 30 e il 70%). Tutti i ceppi inibenti la crescita dei coliformi appartenevano alle specie *Enterococcus faecium* o *faecalis*. Riguardo i non-*starter* le specie più rappresentative erano *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. paracasei*/*casei*, *Pediococcus pentosaceus* e *Lb. coryneformis*. Sono stati selezionati i ceppi che non producessero ammine biogene e composti *off-flavours*, ma con buona attività proteolitica per guidare la proteolisi durante la stagionatura. Lo sviluppo di colture *starter* e non *starter*, autoctone, selezionate sulla base di test tecnologici potrebbe assicurare la dominanza di specie desiderate nelle prime ore di maturazione del formaggio e durante la stagionatura, minimizzando lo sviluppo di batteri indesiderati che, potrebbero sopravvivere nelle settimane successive di stagionatura.

Abstract

FERMALGA project: saving the biodiversity and typicality of malga cheese in Trentino - The province of Trento counts approximately 100 cheese-producing malga ("malga" refers to all fixed and mobile production factors related to grazing animals at high altitude: pastures, buildings, equipment, animals). Over the last years, malga cheesemakers have progressively introduced the use of industrial freeze-dried starter cultures in order to steer fermentation in the first hours after production and so reduce the risk of pathogenic microbial proliferations and technological defects in the cheese. However, the spread of industrial, non-autochthonous microbial stems in these traditional production processes is leading to an ongoing flattening of the organoleptic traits of malga cheese, resulting in loss of biodiversity and product typicality. Starting from the assumption that self-produced starter cultures from milk and whey are not always a viable option on malga due to unfavorable operational conditions, the FERMALGA project aims at providing malga cheesemakers with autochthonous freeze-dried starter cultures isolated and selected from the local microbial pool occurring on traditional malga as an alternative to commercial starters. The autochthonous microbial pool has been collected by FEM during summer 2011 on 8 different malga, located in three distinct sub-regions (Val di Sole, Valsugana Lagorai and Altopiano delle Vezzeno). Sampling occurred on 36 days and was performed on milk, cheese right after production, cheese after 1 day, 1 month and 7 months. A total of 643 strains were isolated from the curdle and the cheese after one day for starter selection and from cheese after 7 months ripening for non-starter selection. The lactic acid bacteria (LAB) were 460: 292 mesophylics and 168 thermophylics. All bacterial isolates were clustered by Randomly Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR) using two primers and identified by partial sequencing of 16S rRNA gene and species-specific PCR. From the 431 isolates, we obtained 268 biotypes that were tested for their technological properties. The putative starter strains were tested for acidifying activities, proteolytic, autolytic activities and coliforms growth inhibition ability; the putative non-starter strains were tested for their proteolytic and lipolytic activities, temperatures and salt tolerance (4, 6, 8% w/v of NaCl), diacetyl, biogenic amines, off-flavours and CLA production. *Lactococcus lactis* strains showed the fastest acidifying ability lowering the milk pH to 4.5 in 12 hours both at 30 and 15°C. *Streptococcus thermophilus* strains showed a better acidifying ability lowering the milk pH to 3.8 but they needed at least 36 hours. *Sc. thermophilus* strains also showed the highest autolysis values (their values ranged between 30 and 70%). All the strains showing inhibition of coliforms' growth belonged to *Enterococcus faecium* or *faecalis* species. The non-starter strains belonged to *Lactobacillus rhamnosus*, *Lb. paracasei/casei*, *Pediococcus pentosaceus* and *Lb. coryneformis* species and were selected for their ability to grow on the highest salt concentration and lowest tested temperature showing a good adaptation to the dairy ripening environment. They were further selected for their proteolytic activities that could be useful during the ripening months and to not produce off-flavour compounds or biogenic amines. The development of autochthonous starter and non-starter cultures selected on the basis of technological tests would ensure the dominance of desired strains in the first hours and during the overall ripening process minimizing growth of not desired spoilage bacteria which could survive and work during the ripening.

Introduzione

In Trentino sono presenti un centinaio di malghe che trasformano il latte prodotto in formaggi, ognuno dei quali è caratterizzato da una propria identità. Le specificità organolettiche e sensoriali dei prodotti di malga sono infatti il frutto dell'interazione tra l'ambiente in cui nascono – fatto di suoli, altitudini, esposizioni e pascoli diversi – e la mano di chi li produce, secondo metodi e saperi tradizionali. Ciò che conferisce inoltre al latte ed al formaggio di malga un'ulteriore e decisa impronta di "personalità" è la flora microbica locale, espressione specifica di ogni particolare contesto. In malga, dove il latte viene munto da animali al pascolo e lavorato crudo *in loco*, la grande biodiversità microbica autoctona si esprime nella tipicità e nella ricchezza di aromi distintiva di ogni prodotto.

Per la sua natura artigianale, tuttavia, il formaggio di malga è soggetto ad una grande variabilità di esiti che molti casari hanno cercato di contenere facendo

ricorso a fermenti di derivazione industriale. Si tratta in genere di liofilizzati contenenti pochi ceppi microbici, selezionati per la loro elevata velocità di acidificazione. Questi fermenti lattici sono adatti alle produzioni ed ai ritmi dei caseifici industriali e risultano spesso aggressivi nei confronti della microflora autoctona di malga riducendone la presenza e quindi l'espressione. Il loro utilizzo, se da un lato fornisce una maggiore tranquillità tecnologica e sicurezza igienico-sanitaria al casaro, è anche causa di una progressiva riduzione della biodiversità microbiologica e di una conseguente standardizzazione organolettica del formaggio di malga, interrompendo il legame con l'ambiente di origine e intaccando quindi la tipicità.

Al fine di mantenere la peculiarità specifica dei formaggi prodotti nelle malghe trentine, recuperare la biodiversità microbica e valorizzare ulteriormente un sistema produttivo che esprime e comunica l'identità alpina del territorio, la Fondazione Mach e la Camera di Commercio C.I.A.A. di Trento hanno dato il via, nel 2011, al progetto FERMALGA. Il progetto si propone di individuare la microflora spontanea presente in diversi areali di produzione e di selezionare pool microbiologici di *starter* e non-*starter* specifici utilizzabili dai casari in alternativa ai prodotti industriali, in modo da ottenere gli stessi vantaggi tecnologici e le stesse garanzie igienico sanitarie e mantenere al contempo la tipicità del formaggio di malga.

Il progetto FERMALGA si è posto inoltre l'obiettivo di esplorare e valorizzare non solo le caratteristiche di tipicità dei formaggi prodotti in alpeggio ma anche le loro proprietà salutistiche e nutraceutiche. Il latte – e di conseguenza il formaggio – sono alimenti ricchi in Acido Linoleico Coniugato (CLA), un'antiossidante naturale con straordinarie proprietà antitumorali. La quantità e la qualità di CLA dipendono principalmente dall'alimentazione degli animali: è noto che il pascolamento su erba fresca, ed in particolar modo su erba di alta quota, aumenta in maniera considerevole i valori di CLA nel latte e nel formaggio. Inoltre, esistono flore microbiche lattiche specifiche in grado di trasformare gli acidi linoleici in acidi coniugati durante la stagionatura. Selezionare ceppi microbici che rendano il formaggio di malga un veicolo di buona salute rappresenta dunque un ulteriore valore aggiunto alla tipicità del prodotto.

Il progetto ha coinvolto 8 diverse malghe, collocate in tre areali di produzione, nelle quali la caseificazione era realizzata senza l'uso di qualsiasi tipo di *starter* (commerciali o innesti). Presso queste malghe, nella stagione di alpeggio 2011, sono state seguite complessivamente 36 giornate di lavorazione e prelevati campioni di latte crudo di caldaia, di cagliata appena estratta, di formaggio a 24h, 1 mese e 7 mesi di stagionatura, per un totale di 180 campioni che sono stati conservati in attesa delle successive indagini microbiologiche e degli isolamenti di ceppi microbici putativi *starter* e non-*starter*.

Isolamento e *fingerprint* dei batteri lattici

Da cagliata e formaggio a 24h sono stati isolati complessivamente 533 ceppi di cui 350 erano lattici; da formaggio a 7 mesi sono stati isolati 107 ceppi di cui 99 erano lattici. Questi ceppi una volta purificati sono stati conservati a -80°C in glicerolo al 20%.

La caratterizzazione dei ceppi è stata condotta prima di tutto mediante la *Random Amplified Polymorphic DNA-PCR* (RAPD-PCR) che ha consentito di raggruppare tutti i LAB in biotipi al 85% di similarità. La reazione di PCR è stata allestita con due diversi *primer* e le condizioni di amplificazione sono quelle riportate in tabella 1. I due profili di amplificazione ottenuti sono stati elaborati mediante *clustering* UPGMA (*unweighted pair group method using arithmetic averages*) utilizzando il *software BioNumerics 5.1* (Applied Maths). Per ogni biotipo è stato selezionato un rappresentante che è stato identificato tramite sequenziamento di una porzione di circa 500 paia di basi del gene per il 16S rRNA con i primer riportati in tabella 1. Le sequenze ottenute dagli amplificati sono state confrontate con quelle disponibili nella Genbank del NCBI (*National Center of Biotechnology Information*). Le identificazioni sono state ulteriormente confermate dove possibile con PCR specie-specifiche utilizzando le coppie di *primer* elencate in tabella 1.

La diversità genomica all'interno dei 449 (*starter* + *non-starter*) batteri lattici isolati è stata valutata tramite RAPD-PCR. Il raggruppamento in biotipi al 85% di similarità eseguito a seguito dell'amplificazione da RAPD-PCR ottenuta con due *primer* diversi ha evidenziato una estrema biodiversità tale per cui nemmeno i biotipi appartenenti alla stessa specie raggruppavano nello stesso *cluster*. I biotipi evidenziati inoltre non presentavano correlazioni con la malga o con l'areale di isolamento, e non sono mai stati isolati biotipi identici in malghe diverse.

Tabella 1 – Primer utilizzati per l'identificazione e la caratterizzazione genotipica dei batteri lattici (LAB)

Target	Primer	Sequenza (5' verso 3')	Bibliografia
RAPD-PCR	M13	GAGGGTGGCGGTTCT	Andrighetto et al. 2002
	PC1	AGCAGGGTCCG	Cocconcelli et al. 1997
Sequenziamento	P0	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Klijn et al. 1991
	P4	ATCTACGCATTTACCGCTAC	
<i>Ec. faecium</i>	EM 1A	TTGAGGCAGACCGATTGACG	Cheng et al. 1997
	EM 1B	TATGACAGCGACTCCGATTCC	
<i>Lc. lactis subsp. lactis/cremoris</i>	LcL For	CTTCGTTATGATTTTACA	Corroler et al. 1998
	LcL Rev	CAATATCAACAATTC	
<i>Sc. thermophilus</i>	LacZ up	CAC TAT GCT CAG AAT ACA	Lick et al. 1996
	LacZ down	CGA ACA GCA TTG ATG TTA	
<i>Lb. casei</i>	Casei	TGCACTGAGATTCGACTTAA	Ward e Timmins 1999
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCTCCCGTAGGAGT	
<i>Lb. paracasei</i>	Para	CACCGAGATTCAACATGG	Ward e Timmins 1999
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCTCCCGTAGGAGT	
<i>Lb. rhamnosus</i>	Rham	TGC ATC TTG ATT TAA TTT	Ward e Timmins 1999
	Y2	CCCACTGCTGCCTCCTCCCGTAGGAGT	

Identificazione e caratterizzazione dei batteri lattici da utilizzare come STARTER

Tutti i 350 isolati trovati sono risultati appartenere a 16 specie diverse dimostrando la presenza di una complessa biodiversità confermata anche dai profili RAPD (figura 1). In particolare tutti i batteri lattici trovati erano di forma cocco. Il genere *Lactococcus* presente come *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lc. lactis subsp. cremoris*, *Lc. lactis subsp. dyacetilactis* e *Lc. garviae* era il predominante (119 su 350) e le specie più rappresentate erano *Streptococcus thermophilus* (82 di 350), *Lactococcus lactis subsp. lactis* (75 di 350), *Enterococcus faecalis* (67 di 350) e *Lactococcus lactis subsp. cremoris* (37 di 350).

Alcune specie sono state trovate solo nella cagliata appena estratta (*Lc. garviae* e *Sc. macedonicus*) altre solo nel formaggio dopo 24 ore (*Ec. faecium* e *Ec. durans*).

La presenza di *Sc. thermophilus* era attesa e già stata riportata in altri prodotti fermentati tradizionali a latte crudo dove questa specie assicura una corretta fermentazione convertendo il lattosio in acido lattico; più originale è la presenza di Lattococchi dominanti accanto a *Sc. thermophilus*.

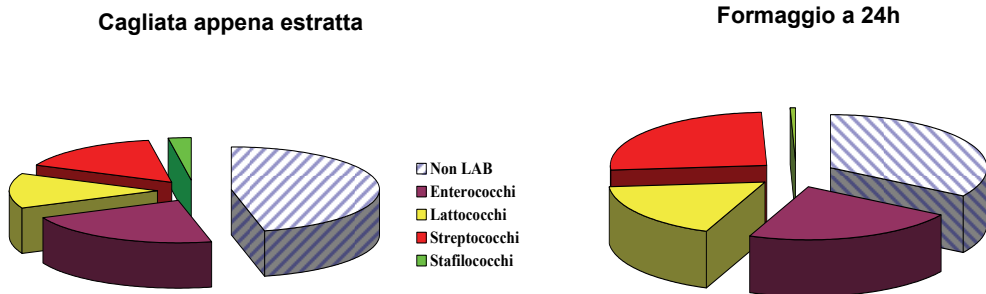


Figura 1 - distribuzione delle specie batteriche nella cagliata appena estratta e nel formaggio a 24 ore di maturazione

La presenza massiccia degli Enterococchi si spiega con l'estrema versatilità di questa specie ad adattarsi a condizioni ambientali molto diverse.

Per tutti i biotipi è stata valutata la capacità di crescere a diverse temperature. Un rappresentante per ogni biotipo è stato fatto crescere sullo stesso terreno da cui era stato isolato. Le temperature di incubazione erano: 15°C, 30°C e 46°C (quest'ultima corrisponde alla temperatura massima raggiunta durante la cottura della cagliata). Lo sviluppo di colonie dopo 4 giorni di incubazione è indice di positività del test.

Per tutti i biotipi è stata inoltre valutata la presenza di pro-fagi (Franciosi et al. 2009) e la produzione di aromi indesiderati: solo i ceppi negativi a questi due test (320) sono stati considerati per ulteriori prove tecnologiche quali:

- la cinetica di acidificazione: la coltura del biotipo da testare è stata inoculata in latte intero UHT (inoculo 1:100). Fino a 8 ore dopo l'inoculo il pH veniva

misurato ad intervalli di 2 ore e in seguito di 18, 24 e 48 ore. La cinetica di acidificazione è stata anch'essa valutata a diverse temperature: 15, 30 e 45 °C;

- attività antimicrobica nei confronti dei coliformi valutata mediante il metodo della diffusione in agar (Corsetti et al., 2004).

I biotipi appartenenti al gruppo dei lattococchi hanno tutti mostrato non solo capacità di crescita a diverse temperature ma anche capacità acidificanti comparabili dai 15 ai 46 °C. Queste loro peculiarità ne consentirebbero la sopravvivenza alle temperature di cottura della cagliata (max. 46 °C) e lo sviluppo nelle prime ore dopo l'estrazione quando la temperatura all'interno della cagliata scende fino a 20-25 °C che era circa la temperatura dei locali della prima stagionatura (non viene fatta la stufatura per questo tipo di produzione). La loro termo-resistenza potrebbe spiegare la massiccia presenza dei lattococchi tra i dominanti nelle prime ore di fermentazione accanto a specie più note per essere termofile (*Sc. thermophilus*).

Visto che la temperatura di cottura condotta tra 42 e 46 °C ha favorito lo sviluppo di forme sia termofile (*Sc. thermophilus* e Enterococchi) che mesofile (*Lc. lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*) e poiché gli enterococchi non costituiscono una specie di elezione per l'avvio dell'acidificazione e quindi della prima fermentazione, i test fenotipici per valutare la cinetica di acidificazione è stata focalizzata su quei biotipi di batteri lattici appartenenti alle specie di *Sc. thermophilus* oppure *Lc. lactis*.

Gli isolati appartenenti alle specie *Lattococcus lactis* erano i più acidificanti nell'arco delle prime 6 ore di incubazione in latte in quanto riuscivano di media ad abbassare il pH di 1.5 punti in tale lasso di tempo. Gli isolati appartenenti alla specie *Sc. thermophilus* hanno dimostrato di essere più lenti in quanto impiegavano almeno 24 ore per raggiungere lo stesso risultato. Ad ogni modo tali risultati vanno interpretati alla luce del biotipo di appartenenza oltre che della specie in quanto vi erano molte differenze di attività tra biotipi differenti seppur appartenenti alla stessa specie.

Per quanto riguarda la capacità di inibire la crescita dei coliformi che costituiscono un sicuro rischio sia tecnologico che sanitario nelle produzioni casearie a latte crudo, 30 isolati possedevano tale attività nei confronti dei coliformi e in particolare erano 5 *Lc. garviae* e 25 *Ec. faecalis*.

Identificazione e caratterizzazione dei batteri lattici da utilizzare come non-STARTER

Dei 107 isolati da formaggio a 7 mesi, 99 sono risultati essere batteri lattici e appartenevano a 10 specie diverse dimostrando la presenza di una complessa biodiversità confermata anche dai profili RAPD (figura 2 e figura 3). Dei 99 isolati LAB, 36 erano forme cocciche tutte appartenenti alla specie *Pediococcus pentosaceus*, gli altri 63 isolati erano di forma bastoncellare e le specie predominanti erano *Lactobacillus casei / paracasei* e *Lb. parabuchneri*.

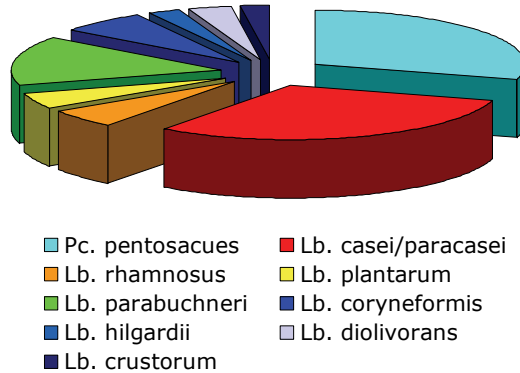


Figura 2 - distribuzione delle specie batteriche nel formaggio a 7 mesi di maturazione

L'analisi genetica eseguita mediante RAPD-PCR ha permesso sia di raggruppare i diversi isolati in biotipi che di valutare la variabilità intra-specifica ovvero all'interno della stessa specie. Da 99 isolati sono stati individuati 67 biotipi considerando un'omologia genetica di 85%. Si è evidenziata un'ampia eterogeneità intra-specifica infatti, soprattutto per le specie più numerose (*Pc. pentosaceus* e *Lb. casei / paracasei*), i biotipi che raggruppavano assieme avevano una similarità tra il 45 e il 50% e non c'era una correlazione tra i biotipi ritrovati e la malga di provenienza del formaggio prodotto.

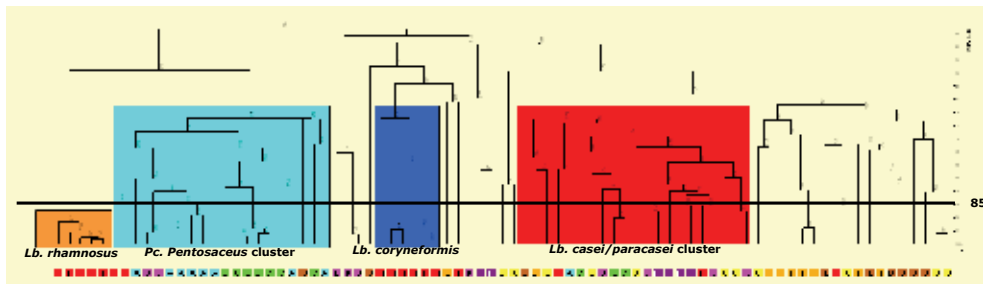


Figura 3 - Diversità genotipica di 81 dei 99 LAB isolati da campioni di formaggio a 7 mesi valutata usando UPGMA come algoritmo di clusterizzazione sulla base dei profili di RAPD-PCR. Ogni quadro da A alla I rappresenta una delle 8 differenti malghe da dove sono stati isolati i ceppi.

Tutti i biotipi non-*starter* sono stati caratterizzati per la presenza di profagi, la capacità di crescita tra 15 e 46°C e la cinetica di acidificazione, come per gli starter. I 10 biotipi che hanno mostrato presenza di profagi sono stati esclusi da ulteriori prove fenotipiche e di caratterizzazione dei tratti tecnologici quali:

- produzione di anidride carbonica all'interno di provette di vetro con campanella Durham: se la fermentazione del lattosio porta alla produzione di CO₂

(ceppi etero-fermentanti) la campanella di vetro si alza rispetto al livello del terreno grazie alla stessa CO₂ prodotta al suo interno.

- osmo-tolleranza: la coltura liquida di ogni biotipo è stato spatolata sul terreno da cui era stato isolato, addizionato di NaCl al 2%, 4%, 6% e 8% e incubato nelle stesse condizioni utilizzate per l'isolamento. Come controllo è stato utilizzato il terreno privo di NaCl. Lo sviluppo di colonie è indice della capacità del ceppo di tollerare la concentrazione di sale presente nella piastra.
- produzione di diacetile: La coltura del biotipo da testare viene inoculata (inoculo 1:100) in latte intero UHT e dopo incubazione per 24 ore a 30°C, 1 ml di tale coltura è addizionato di 0,5 ml di una soluzione di α -naftolo all'1% e KOH al 16%. Dopo 10 minuti di incubazione a 30°C la produzione di diacetile è indicata dalla formazione di un anello rosso nella parte superiore della provetta.
- produzione di ammine biogene,
- attività lipolitica su *tributylin agar*
- produzione di acido coniugato linoleico (CLA) a partire dal precursore l'acido linoleico (LA) secondo il metodo di Rodriguez-Alcala et al. (2011)
- attività ammino-peptidasica secondo il metodo di Regena et al. (1991)

Nessuno dei biotipi individuati aveva proprietà lipolitiche, nessuno produceva ammine biogene e nessuno ha mostrato produzione di CO₂. Tutti i biotipi hanno mostrato un'elevata tolleranza al sale visto che crescevano tutti in NaCl fino al 8%. I risultati delle prove fenotipiche e tecnologiche effettuate sui diversi 57 biotipi senza profagi è mostrata in tabella 2.

Tabella 2 – Risultati delle prove fenotipiche e tecnologiche effettuate sui 57 biotipi di batteri lattici isolati dal formaggio a 7 mesi esenti da presenza di profagi

Biotipo	Specie	Crescita 15 °C*	Crescita 46 °C*	Produzione diacetile*	Δ pH in latte 18h	ΔA_{233} 24h (CLA)	ΔA_{410} 24h (Leu)	ΔA_{410} 24h (Lys)
1	<i>Pc. pentosaceus</i>	0	0	0	0.96	0.26	0.52	0.41
2	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.76	0.00	0.90	0.66
3	<i>Lb. paracasei</i>	0	0	1	1.21	0.16	0.62	0.51
4	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	0	1.38	0.19	0.47	0.34
6	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.76	0.36	0.56	0.46
7	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.89	0.29	0.51	0.44
8	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	1.01	0.33	0.47	0.44
9	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.96	0.29	1.10	0.36
10	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	1	1.04	0.35	0.46	0.37
11	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	0	1.5	0.16	0.29	0.36
12	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	1	1.78	0.18	0.88	0.70
15	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	1	1.32	0.29	0.37	0.29
16	<i>Lb. paracasei</i>	0	1	1	1.24	0.43	0.77	0.63
18	<i>Pc. pentosaceus</i>	0	1	0	0.74	0.00	0.62	0.51
21	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.14	0.76	0.72	0.48
22	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.33	0.00	0.45	0.34

23	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	0	0.25	0.03	0.50	0.41
25	<i>Lb. rhamnosus</i>	1	1	1	0.58	1.62	0.43	0.36
26	<i>Lb. coryniformis</i>	1	0	0	0.05	0.00	0.00	0.00
27	<i>Lb. coryniformis</i>	1	0	0	0.07	0.78	0.53	0.44
28	<i>Lb. crustorum</i>	1	0	0	0.05	0.00	0.00	0.00
29	<i>Lb. casei</i>	1	0	0	0.00	0.11	0.43	0.36
30	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	0	0.41	0.42	0.76	0.60
31	<i>Lb. plantarum</i>	1	0	0	0.54	0.00	0.38	0.27
33	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	1	0.68	0.70	0.43	0.32
34	<i>Lb. paracasei</i>	0	0	1	0.37	0.13	0.60	0.37
37	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	1	0.68	1.22	0.48	0.39
38	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.22	0.00	0.00	0.00
39	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.00	0.00	0.00	0.00
40	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.20	0.00	0.00	0.00
41	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.19	0.00	0.38	0.32
43	<i>Lb. coryniformis</i>	1	0	0	0.03	0.00	0.00	0.00
46	<i>Lb. rhamnosus</i>	1	1	0	0.37	1.27	0.43	0.33
52	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	1.08	0.00	0.50	0.41
53	<i>Lb. parabuchneri</i>	1	0	0	0.00	0.08	0.27	0.30
55	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	1	1.52	0.24	0.63	0.43
56	<i>Lb. plantarum</i>	1	0	0	1.74	0.19	0.56	0.49
57	<i>Pc. pentosaceus</i>	1	0	0	0.91	0.39	0.36	0.28
60	<i>Lb. plantarum</i>	1	0	0	1.25	0.32	1.22	1.03
61	<i>Lb. parabuchneri</i>	1	0	0	0.23	0.32	0.37	0.30
64	<i>Lb. parabuchneri</i>	1	0	0	0.00	0.31	0.26	0.19
65	<i>Lb. diolivorans</i>	1	0	0	0.00	0.00	0.36	0.43
66	<i>Lb. parabuchneri</i>	1	0	0	0.00	0.00	0.30	0.29
67	<i>Lb. parabuchneri</i>	1	0	0	0.00	0.10	0.29	0.34
69	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	1	1.18	0.00	0.78	0.57
70	<i>Lb. parabuchneri</i>	1	0	0	0.00	0.00	0.26	0.27
71	<i>Lb. plantarum</i>	1	0	0	0.93	0.00	0.91	0.74
73	<i>Lb. hilgardii</i>	1	0	0	0.46	0.45	0.29	0.27
74	<i>Lb. paracasei</i>	1	0	1	1.37	-	0.68	0.53
75	<i>Lb. diolivorans</i>	1	0	0	0.00	-	0.29	0.24
76	<i>Lb. paracasei</i>	0	1	1	1.09	-	-	-
77	<i>Lb. paracasei</i>	0	1	1	1.01	-	-	-
78	<i>Pc. pentosaceus</i>	0	1	0	0.84	-	-	-
81	<i>Lb. paracasei</i>	0	1	1	1.48	-	-	-
82	<i>Lb. paracasei</i>	0	1	1	2.13	-	-	-
83	<i>Lb. paracasei</i>	0	1	0	0.97	-	-	-
84	<i>Lb. paracasei</i>	0	0	1	1.72	0.29	0.83	0.71
TOT		45	10	17	0.71 ±0.6	0.37 ±0.4	0.48 ±0.3	0.38 ±0.2

* i positivi sono segnati con "1" i negativi con "0"

Attività media ovvero \geq del valore medio, Attività alta ovvero \geq del valore pari alla media ad-dizionata della deviazione standard

La maggior parte dei biotipi (45 di 57) era in grado di crescere a 15°C; un minor numero di ceppi ha mostrato capacità di crescere anche a 45°C (10 di 57) ed erano tutti *Lb. paracasei*, *Pc. pentosaceus* o *Lb. rhamnosus*; i due biotipi appartenenti a quest'ultima specie hanno mostrato una estrema variabilità di adattamento a diverse temperature sia a 15 che 45°C. Dei 17 biotipi capaci di produrre diacetile, 15 appartenevano alla specie *Lb. paracasei* confermando l'importanza di questa specie come aromatizzante nelle produzioni casearie. Anche nel caso della capacità acidificante, i biotipi meglio performanti appartenevano alla specie *Lb. paracasei*: 9 dei 10 biotipi che mostravano un'alta attività acidificante sono stati identificati come *Lb. paracasei*. Riguardo la produzione di CLA solo 4 biotipi mostravano un'alta produzione di CLA partendo dal precursore LA, e di questi 4 facevano parte entrambi i biotipi di *Lb. Rhamnosus* infatti da bibliografia è una delle specie candidate alla produzione di CLA da precursori. Riguardo l'attività ammino-peptidasica, 6 biotipi hanno mostrato un'alta attività sia per micro-peptidi di Leucina che Lysina e appartenevano alle specie *Lb. paracasei*, *Pc. pentosaceus* e *Lb. plantarum*.

Conclusioni e prospettive

Dalle analisi microbiologiche e molecolari è emersa una estrema biodiversità microbica: ogni malga era caratterizzata da ceppi microbici con profili genotipici specifici e diversi dalle altre malghe. Dalle prove fenotipiche, inoltre, è risultato che i ceppi, anche se appartenenti a specie diverse, presentavano tutti una spiccata tolleranza a temperature basse (15 °C) e a concentrazioni di sale intorno al 8% dimostrando quindi un marcato adattamento all'ambiente di malga.

Il mantenimento di questa biodiversità microbica risulta quindi molto interessante al fine di garantire la salvaguardia della tipicità delle produzioni.

Il progetto FERMALGA, la cui durata è triennale sta proseguendo rispetto ai risultati microbiologici illustrati. Ai diversi test tecnologici effettuati su tutti i biotipi per selezionare i più adatti sono seguite diverse prove di caseificazione utilizzando ceppi selezionati *starter* e non-*starter*:

- 50 prove di micro caseificazione da 1.5L per valutare le miscele e le concentrazioni più idonee degli *starter* in base alla curva di acidificazione nelle prime 24 ore.
- 28 prove di micro caseificazione da 10L in laboratorio per valutare se l'uso degli starter poteva portare a variazioni organolettiche indesiderate dopo 40 giorni di produzione.
- 35 prove di caseificazione in malga da 150L con *starter* e non-*starter* selezionati per valutare l'effetto reale sui prodotti portati a lunga stagionatura (1 anno).

La fase successiva prevista dal progetto sarà l' assaggio delle forme sperimentali di malga a 2 mesi, 6 mesi e 1 anno di stagionatura e si concluderà con un'intensa attività di assistenza tecnica sulle diverse malghe per distribuire il mix di ceppi autoctoni in forma liofilizzata di e insegnare ai casari ad utilizzarlo correttamente.

Ringraziamenti

Questo progetto è stato finanziato dalla Camera di Commercio Industria Artigianato e Agricoltura di Trento e dalla Provincia Autonoma di Trento. Un particolare ringraziamento al Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti risorse Naturali e Ambiente dell'Università di Padova. Si ringraziano inoltre tutti i casari delle malghe che hanno partecipato a questo progetto per la loro collaborazione e per i loro preziosi consigli.

Bibliografia

- Andrighetto C., Borney F., Barmaz A., Stefanon B., Lombardi A., 2002. *Genetic diversity of Streptococcus thermophilus strains isolated from Italian traditional cheese*. Int. Dairy J., 12, 141-144.
- Cheng S., McCleskey F.K., Gress M.J., Petroziello J.M., Liu R., Namdari H., Benninga K., Salmen A., DelVecchio V.G., 1997. *A PCR assay for identification of Enterococcus faecium*. J. clinical microbial., 35, 1248-1250.
- Cocconcetti P.S., Parisi M.G., Senini L., Bottazzi V., 1997. *Use of RAPD and 16S rDNA sequencing for the study of Lactobacillus population dynamics in natural whey culture*. Lett. Appl. Microbiol., 25, 8-12.
- Corroler D., Mangin I., Desmasure N., Gueguen M. 1998. *An ecological study of lactococci isolated from raw milk in the Camembert cheese registered designation of origin area*. Appl. Environ. Microbiol., 64, 4729-4735.
- Corsetti A, Settanni L, Van Sinderen D., 2004. *Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their in vitro and in situ activity*. J. App. Microbiol., 96(3), 521-34.
- Franciosi E., Settanni L., Cavazza A., Poznanski E. 2009. *Biodiversity and technological potential of wild lactic acid bacteria from raw cow's milk*. Int. Dairy J., 19, 3-11.
- Klijin N., Weerkamp A.H., de Vos W.M., 1991. *Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes*. App. Environ. Microbiol., 57: 3390–3393
- Lick S., Keller M., Bockelmann W., Heller K.J., 1996. *Rapid identification of Streptococcus thermophilus by Primer-specific PCR amplification based on its lacZ gene*. System. Appl. Microbiol., 19, 74-77.
- Requena T., Pelàez C., Desmazeaud M. J., 1991. *Characterization of lactococci and lactobacilli isolated from semi-hard goats' cheese*. J. Dairy Res., 58, 137-145.
- Rodriguez-Alcalà L., Braga T., Malcata F. X., Gomes A., Fontecha J., 2011. *Quantitative and qualitative determination of CLA produced by Bifidobacterium and lactic acid bacteria by combining spectrophotometric and Ag+-HPLC techniques*. Food Chemistry, 125, 1373-1378.
- Ward L.J., Timmins, M.J., 1999. *Differentiation of Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei and Lactobacillus rhamnosus by polymerase chain reaction*. Lett. Appl. Microbiol., 29, 90-92.