



Consiglio Nazionale delle Ricerche
Dipartimento di Scienze Bio-Agroalimentari

Conferenza Annuale Disba 2021

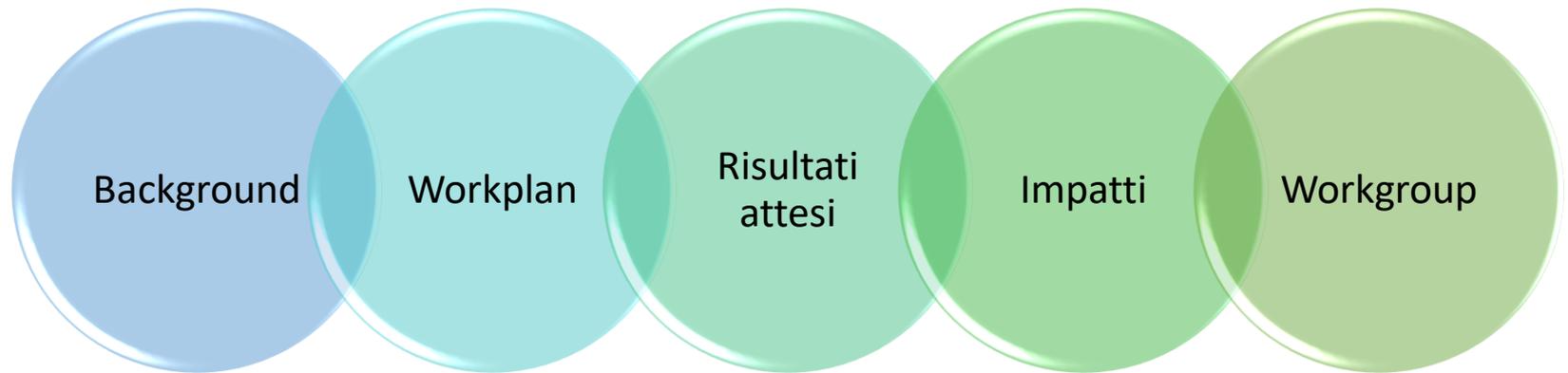
Valorizzazione di microrganismi caseari
non-convenzionali per la qualità e sicurezza di
formaggi a crosta edibile (INNO-RIND)

Area Strategica: Produzioni Alimentari e Alimentazione

16 Dicembre 2021

Dr. Pinto Loris ISPA, Bari





- Richiesta di formaggi “naturali” prodotti da latte crudo e senza l’aggiunta di colture starter industriali (Slowfood, 2021), ivi inclusi quelli a crosta edibile (es. Pecorino dell’Alta Murgia, Bodoglino, Taleggio D.O.P.).
- Tipologie di formaggi a crosta edibile: da latte crudo o pastorizzato, a crosta lavata o fiorita, a pasta dura o semidura

Slowfood, 2021. <https://www.slowfood.it/formaggi-naturali/>



Background

- Problemi di sicurezza alimentare: contaminazione da *Brucella melitensis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, e *Staphylococcus aureus* (Yoon et al., 2016, Food Standards Australia, 2009)
- La FDA consiglia tempi di maturazione non inferiori a 60 giorni per i formaggi a latte crudo (Yoon et al., 2016) che, tuttavia, non sono sufficienti a controllare bassi livelli di contaminazione da *E. coli*
- Contaminazione da *L. monocytogenes* in formaggi a crosta non edibile durante le fasi di taglio/porzionatura

Food Standards Australia New Zealand, (2009). Microbiological risk assessment of raw milk cheese: Risk assessment microbiology section; Yoon, Y., Lee, S., & Choi, K. H. (2016). Microbial benefits and risks of raw milk cheese. Food Control, 63, 201-215.



Microbiota della crosta

Deacidificazione, concentrazione di sale e temperatura selezionano microrganismi ambientali come *Proteobacteria* (*Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Halomonas*, *Vibrio* and *Advenella*) e batteri lattici alofili ed alcaligeni (**halophilic and alkaliphilic lactic acid bacteria, HALAB**) del genere *Marinilactibacillus*, *Alkalibacterium*, *Vagococcus*, *Facklamia* (Irlinger et al., 2015)

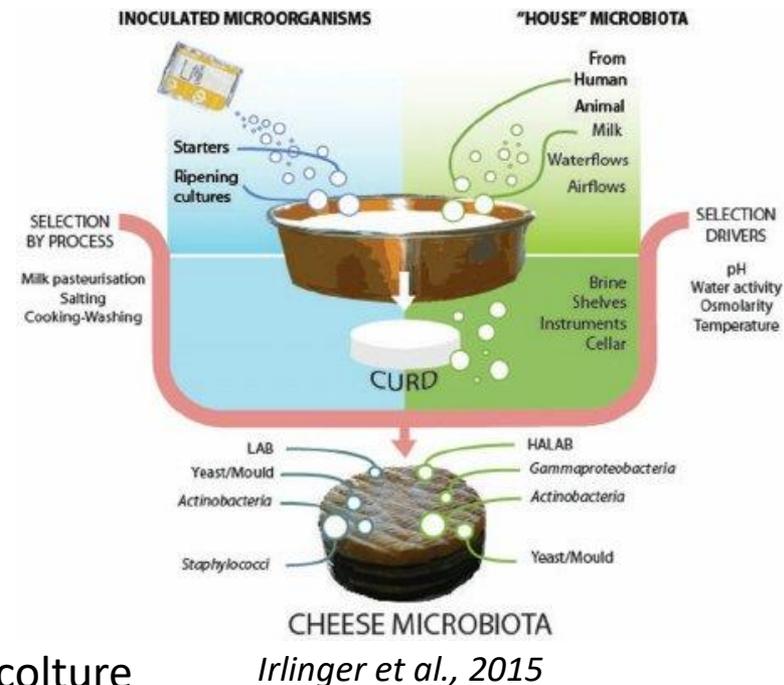
137 croste: 60% dei batteri presenti non originano da colture starter o secondarie (Wolfe et al., 2014)

Adattamento alle condizioni di stagionatura:

- Alotolleranti/Alofili
- Psicrofili
- Alcaligeni



Possibile ruolo per la qualità e sicurezza dei formaggi a crosta edibile?



Irlinger, F., Layec, S., Hélinck, S., & Dugat-Bony, E. (2015). Cheese rind microbial communities: diversity, composition and origin. *FEMS microbiology letters*, 362(2), 1-11.; Wolfe BE, Button JE, Santarelli M, et al. Cheese rind communities provide tractable systems for in situ and in vitro studies of microbial diversity. *Cell* 2014;158:422-33.



Valorizzazione delle potenzialità biotecnologiche di batteri filo-caseari alotolleranti e/o non-lattici per il miglioramento della qualità e dei profili di sicurezza di formaggi a crosta edibile caratteristici del territorio nazionale

Hafnia alvei: produzione di composti aromatici solforati e coinvolta positivamente nella fase di maturazione (Alonso-Calleja et al., 2002), isolata sia da latte crudo che da mozzarella (Baruzzi et al., 2011, 2012). Commercialmente disponibile come coltura starter per la maturazione dei formaggi (Khote et al., 2021)



Psychrobacter celer: ha migliorato la produzione di composti volatili durante la maturazione (Irlinger et al., 2021).

Alonso-Calleja, C., Carballo, J., Capita, R., Bernardo, A., & Garcia-Lopez, M. L. (2002). Evaluation of the spiral plating method for the enumeration of microorganisms throughout the manufacturing and ripening of a raw goat's milk cheese. *Journal of Food protection*, 65(2), 339-344.; Baruzzi, F., Lagonigro, R., Quintieri, L., Morea, M., & Caputo, L. (2012). Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food microbiology*, 30(1), 37-44.; Baruzzi, F., Poltronieri P., Quero GM., Morea M., & Morelli L. (2011). An in vitro protocol for direct isolation of potential probiotic lactobacilli from raw bovine milk and traditional fermented milks. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90, 331-342; Irlinger, F., Yung, S. A. Y. I., Sarthou, A. S., Delbès-Paus, C., Montel, M. C., Coton, E., Coton, M., & Helinck, S. (2012). Ecological and aromatic impact of two Gram-negative bacteria (*Psychrobacter celer* and *Hafnia alvei*) inoculated as part of the whole microbial community of an experimental smear soft cheese. *International journal of food microbiology*, 153(3), 332-338.; Kothe, C. I., Bolotin, A., Kraiem, B. F., Dridi, B., Team, F. M., & Renault, P. (2021). Unraveling the world of halophilic and halotolerant bacteria in cheese by combining cultural, genomic and metagenomic approaches. *International Journal of Food Microbiology*, 109312.



Proposta progettuale

Sul territorio nazionale queste popolazioni microbiche filo casearie appaiono ancora poco studiate e per nulla applicate alle trasformazioni lattiero-casearie, ivi incluse le produzioni protette da marchi di qualità.



Taleggio
D.O.P.



Salva
Cremasco
D.O.P.



Quartirolo
Lombardo
D.O.P.



I batteri lattici alofili ed alcaligeni e, più in generale, batteri non-lattici (es. Hafnia spp.) isolati da salamoie, sieroinnesti, crosta di formaggi a maturazione medio-lunga ed ambiente di lavorazione possono essere usati come colture aggiunte (adjunct starter) sulla crosta di formaggi, anche a latte crudo, per esaltarne le caratteristiche sensoriali, migliorare la sicurezza del prodotto, e modificare positivamente il microbiota di superficie del formaggio.

- *Tetragenococcus halophilus* controlla la formazione di cadaverina in prodotti fermentati (Kim et al., 2019)
- Produzione di batteriocine in *Halomonas* e *Hafnia* (Azemin et al., 2015; Wertz and Riley, 2004)
- Produzione di diversi composti volatili responsabili dell'aroma del formaggio e di specifici metaboliti (Unno et al., 2021)
- Produzione di acido acetico con possibile controllo dell'innalzamento di pH nella crosta (Suzuki et al., 2021).

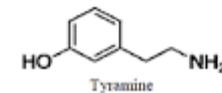
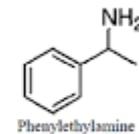
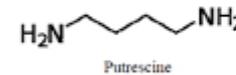
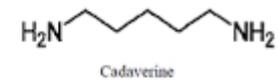
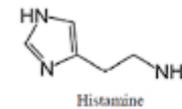
Azemin, A., Klappa, P., & Omar, M. S. S. (2015). Bacteriocin isolated from *Halomonas* sp.: a bacterial DING protein. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 4, 831-840.; Kim, K. H., Lee, S. H., Chun, B. H., Jeong, S. E., & Jeon, C. O. (2019). *Tetragenococcus halophilus* MJ4 as a starter culture for repressing biogenic amine (cadaverine) formation during saeu-jeot (salted shrimp) fermentation. *Food microbiology*, 82, 465-473.; Suzuki, T., Matsutani, M., Matsuyama, M., Unno, R., Matsushita, H., Sugiyama, M., Yamasato, K., Koizumi, Y., & Ishikawa, M. (2021). Growth and metabolic properties of halophilic and alkaliphilic lactic acid bacterial strains of *Marinilactibacillus psychrotolerans* isolated from surface-ripened soft cheese. *International Dairy Journal*, 112, 104840.; Unno, R., Suzuki, T., Matsutani, M., & Ishikawa, M. (2021). Evaluation of the relationships between microbiota and metabolites in soft-type ripened cheese using an integrated omics approach. *Frontiers in Microbiology*, 12, 1464.; Wertz, J. E., & Riley, M. A. (2004). Chimeric nature of two plasmids of *Hafnia alvei* encoding the bacteriocins alveicins A and B. *Journal of bacteriology*, 186(6), 1598-1605.



Raccolta, caratterizzazione fisiologica e biochimica di una collezione di ceppi appartenente a generi alotolleranti/alofili o non-lattici (es. *Hafnia* spp.), e la loro applicazione come colture aggiunte (adjunct starter) in un sistema modello caseario prodotto da latte crudo/pastorizzato e a crosta edibile.

Necessità di selezione per:

- Antibiotico-resistenza
- Produzione di amine biogene
- Produzione di batteriocine
- Proprietà pro-tecnologiche



Work plan

- **WP1 Allestimento di una collezione di ceppi di origine casearia non-convenzionali**

Task 1.1 Isolamento e caratterizzazione molecolare di batteri alotolleranti/alofili o non-lattici da caseificio



Work plan

BIODIVERSITÀ

Task 1.1 Isolamento e caratterizzazione molecolare di batteri alotolleranti/alofili o non-lattici da caseificio

- Isolamento di almeno 30 ceppi appartenenti a generi HALAB o non-lattici da salamoie industriali, latte crudo, sieroinnesti, formaggi a pasta molle o semi-dura e crosta di formaggi prodotti sull'intero territorio nazionale.
- Identificazione tassonomica
- Identificazione di geni coinvolti nella biosintesi di batteriocine.



Work plan

- **WP2 Caratterizzazione tecnologica, biochimica, e fisiologica dei ceppi**

Task 2.1 Profili di sicurezza dei ceppi

Task 2.2 Caratterizzazione tecnologica e biochimica dei ceppi



Work plan

PROFILI DI SICUREZZA	CARATTERISTICHE PRO-TECNOLOGICHE
<p>Task 2.1 Profili di sicurezza dei ceppi</p>	<p>Task 2.2 Caratterizzazione tecnologica e biochimica dei ceppi</p>
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Antibiotico-resistenza ➤ Produzione di batteriocine contro patogeni potenzialmente contaminanti formaggi (es. <i>E. coli</i>, <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i>) ➤ Produzione di amine biogene in presenza di precursori della loro biosintesi 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fermentazione a carico di lattato e citrato ➤ Capacità acidificante in latte ➤ Attività proteolitiche, peptidasiche, lipolitiche



Work plan

- **WP3 Applicazione di ceppi selezionati come adjunct starter in un formaggio modello**

Task 3.1 Effetto dell'adjunct starter sulla qualità di un formaggio modello a crosta edibile

Task 3.2 Effetto dell'adjunct starter sulla sicurezza di un formaggio modello a crosta edibile



Work plan

QUALITÀ

Task 3.1 Effetto dell'adjunct starter sulla qualità di un formaggio modello a crosta edibile

Uso di due adjunct starter di superficie in formaggio a crosta edibile valutando la qualità microbiologica e la shelf-life (principali popolazioni lattiche e non-lattiche, proteolisi, VOCs, analisi sensoriale, concentrazione di amine biogene, ecc.) durante la maturazione.

SICUREZZA

Task 3.2 Effetto dell'adjunct starter sulla sicurezza di un formaggio modello a crosta edibile

Challenge-test su formaggio a latte contaminato da almeno un batterio patogeno, valutando l'attività inibitoria in condizioni di stagionatura.



Risultati attesi



- Ampliamento della collezione microbica di Istituto (ITEM)
- Formulazione di starter commerciali per il condizionamento della crosta di formaggi.
- Protocollo biotecnologico per il condizionamento di formaggi a crosta edibile, anche a latte crudo.
- Background per nuove progettualità



Impatti

- Migliori profili di sicurezza di formaggi a crosta edibile prodotti da latte crudo
- Comprensione del ruolo di comunità microbiche non-convenzionali sulla qualità e sicurezza di formaggi a crosta edibile



Gantt chart

Attività		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mesi													
WP1) <i>Allestimento di una collezione di ceppi di origine casearia non-convenzionali</i>		█	█	█	█	█	█	█	█				
1.1) Isolamento e caratterizzazione molecolare di batteri alotolleranti/alofili o non-lattici da caseificio		█	█	█	█	█	█	█	█				
WP2) <i>Caratterizzazione tecnologica, biochimica, e fisiologica dei ceppi</i>				█	█	█	█	█	█	█			
2.1) Profili di sicurezza dei ceppi			█	█	█	█	█	█	█	█			
2.2) Caratterizzazione tecnologica e biochimica dei ceppi							█	█	█	█			
WP3) <i>Applicazione di ceppi selezionati come adjunct starter in un formaggio modello</i>										█	█	█	█
3.1) Effetto dell'adjunct starter sulla qualità di un formaggio modello a crosta edibile										█	█	█	█
3.2) Effetto dell'adjunct starter sulla sicurezza di un formaggio modello a crosta edibile										█	█	█	█





Sede principale: Bari

Sedi secondarie:

Lecce, Foggia, Milano,
Torino, Sassari

URT ISPA: Udine



Sedi coinvolte:

Bari – Pinto Loris,
Salvatore Cervellieri

Torino – Cirrincione
Simona

Milano – Silvetti
Tiziana



Grazie per l'attenzione

