



Miglioramento del siero-innesto autoctono: il progetto MISA



Per ottimizzare la fermentazione del siero utilizzato nella produzione di Grana Padano è stato progettato e testato un biofermentatore di ultima generazione. Tra gli obiettivi della sperimentazione rientrano anche la concentrazione della biomassa e la realizzazione di una “ceppoteca” aziendale autoctona

Il progetto MISA è stato proposto dall'Ente Regionale per i Servizi all'Agricoltura e alle Foreste (ERSAF), che da parecchi anni presta consulenza tecnica ai produttori di formaggi grana, e ha avuto come responsabile scientifico il dottor Gianantonio Zapparoli.

Partner tecnico-scientifici di ERSAF sono stati: il Consorzio per la Tutela del formaggio Grana Padano Dop; il Dipartimento di genetica, biologia dei microrganismi, antropologia, evoluzione dell'Università degli Studi di Parma (UNIPR); le aziende Solaris Biotechnology e Biofin Laboratories. Il progetto è stato finanziato per il 50% dalla DG Agricoltura della regione Lombardia.

Caratterizzazione dei siero-innesti di Grana Padano Dop

Conoscere il profilo tassonomico dei vari siero-innesti permette di estrapolare eventuali carenze o specificità a livello di specie/ceppo, oltre che differenze nel numero di batteri vitali che possono essere messe in relazione con il risultato produttivo fina-

Nella tecnologia di produzione del formaggio Grana Padano la qualità e le caratteristiche del siero-innesto, quali stabilità e attività biologica, sono fondamentali.

Il siero-innesto è una coltura attiva di batteri lattici termofili a forte acidità già naturalmente presenti nel latte, il cui sviluppo è favorito con il trattamento termico del siero che, aggiunto al latte, fornisce buona parte degli enzimi in grado di caratterizzare la maturazione del formaggio.

Attualmente le metodologie di processo delle fermentazioni del siero-innesto non garantiscono sempre risultati ottimali. Per

ovviare a tali limiti, è stato condotto un progetto che ha valutato l'introduzione di processi e materiali innovativi per garantire una costante ottimizzazione del siero autoctono. Il progetto “Miglioramento del siero-innesto autoctono (MISA)” si è posto come primo obiettivo la progettazione di un biofermentatore che assicuri un'efficiente fermentazione del siero-innesto, utilizzando tutti gli strumenti di controllo necessari per la programmazione e il controllo del processo. Tale apparecchio aprirebbe le porte alla realizzazione di una “ceppoteca” aziendale autoctona con selezione e caratterizzazione dei ceppi tipici del caseificio.

le. Nell'ambito del progetto MISA, ERSAF, in collaborazione con il laboratorio di microbiologia di UNIPR, ha condotto l'isolamento e l'identificazione tassonomica dei batteri lattici presenti in siero-innesti provenienti da 10 caseifici del Grana Padano Dop individuati in base all'area geografica e alla qualità del formaggio ottenuto nell'ultimo anno.

I batteri lattici isolati in terreno specifico (agar-siero) sono stati inviati all'Università di Parma dove è stata effettuata l'identificazione utilizzando tecniche molecolari quali LH-PCR (Length Heterogeneity PCR) e FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). Mentre l'analisi FISH ha come bersaglio il RNA, la LH-PCR ha come obiettivo il DNA, acido nucleico presente in cellule vitali e non vitali. Poiché la vitalità dei batteri presenti nel siero-innesto è un parametro molto importante, questa è stata valutata con un apposito kit (vedi box).

«Elevata è risultata la variabilità del numero di lattici coltivati in terreno specifico con scostamenti dal mezzo miliardo a un miliardo e settecentomila ufc/ml. Anche il potere fermentativo del siero-innesto da grana, che *in vitro* riproduce le condizioni di lavoro dei lattici nella cagliata durante le prime ore, evidenzia notevole variabilità (figura 1).

I risultati peggiori sembrano essere quelli a carico dei caseifici che applicano le temperature di cottura più elevate – spiega Zapparoli. – La mappatura dei siero-innesti campionati nel comparto del Grana Padano ha evidenziato una sostanziale omogeneità delle popolazioni lattiche presenti, con significative differenze nelle proporzioni tra *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*, nella presenza o assenza di *Lactobacillus fermentum* e di *Streptococcus thermophilus*. Le differenze più marcate sono state riscontrate a carico della vitalità dei batteri lattici e nel rapporto tra cellule vive e morte: la maggior parte dei campioni ha presentato un numero di cellule vitali superiore al 70%, eccetto due che contenevano un elevato valore di cellule non vitali».

I siero-innesti valutati carenti potrebbero essere integrati con aggiunta di flora lattica autoctona specifica, proveniente da una ceppoteca o dagli isolati del caseificio stesso.

Analisi effettuate sui campioni di siero-innesto

LH-PCR (Length Heterogeneity PCR). La metodica consente di rilevare e identificare, a livello di genere e specie, diversi microrganismi sulla base della naturale variabilità di lunghezza di una regione localizzata all'estremità 5' del gene 16S rRNA. La reazione di amplificazione genica PCR è abbinata alla separazione e all'analisi dei frammenti effettuate mediante sequenziatore e uno specifico software di rielaborazione dei dati ottenuti.

FISH (Fluorescence In Situ Hybridization). L'analisi FISH consiste nell'ibridazione con sonde oligonucleotidiche specie-specifiche di una porzione dell'RNA batterico bersaglio. Essendo le sonde marcate con molecole fluorescenti, l'ibridazione viene confermata mediante microscopia a fluorescenza. Nell'ambito di questo progetto, la metodica FISH è stata utilizzata per confermare la presenza nei campioni analizzati delle specie individuate e riconosciute tramite analisi LH-PCR.

Valutazione della vitalità cellulare. È stata effettuata con il LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit, una miscela di 2 fluorofori con diverso meccanismo di permeazione cellulare e differente spettro di assorbimento/emissione: Syto9™ e ioduro di propidio (P.I.). Entrambi i coloranti si legano agli acidi nucleici: Syto9 emette fluorescenza di colore verde e penetra nelle cellule con la membrana sia intatta sia danneggiata, mentre P.I. emana fluorescenza rossa e penetra solamente nelle cellule con membrana danneggiata, causando una riduzione della fluorescenza del Syto9 quando entrambi i coloranti sono presenti. Osservando con il microscopio a fluorescenza il campione colorato, i microrganismi con membrana danneggiata appaiono rossi e si considerano non-vitali, mentre quelli con membrana intatta sono verdi e si considerano vitali.

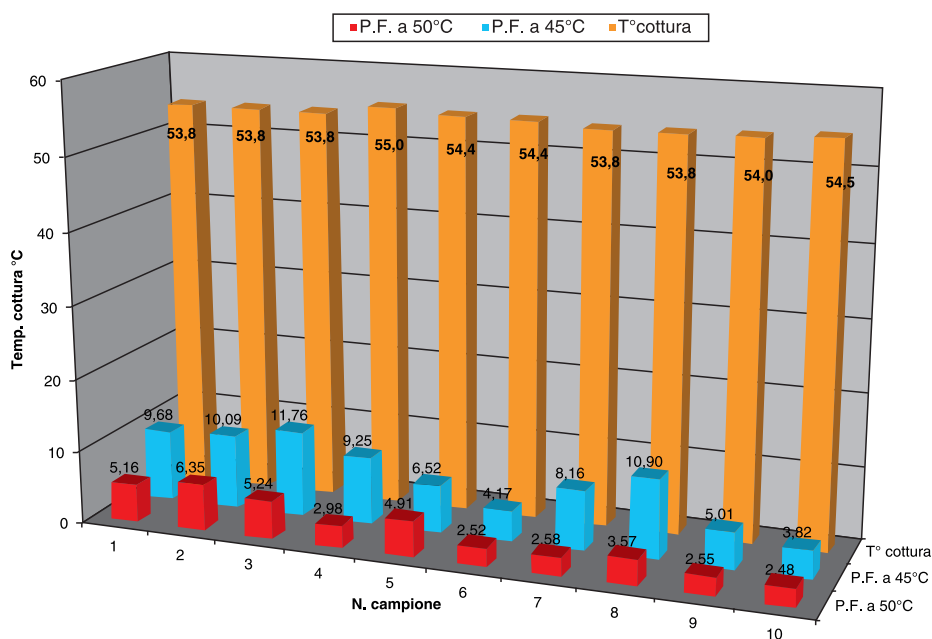


Figura 1. Il potere fermentativo (P.F.) del siero-innesto da grana evidenzia notevole variabilità con una media piuttosto alta a 45 °C che si riduce fortemente nella fermentazione a 50 °C

Necessità di una nuova generazione di fermentatori

Attualmente, la produzione del siero-innesto è ancora affidata all'esperienza del casaro. Grazie agli studi condotti già da diversi anni da ERSAF, sono state progettate e realizzate fermentiere programmabili. Rispetto a quelle tradizionali, tali attrezzature sono in grado di controllare i pa-

rametri tempo e temperatura. Il processo fermentativo è però ancora lontano dall'essere ottimizzato, in quanto nessuna applicazione esistente prevede controlli in linea di altri parametri come il potenziale di ossido riduzione (Redox), il controllo dell'acido lattico prodotto durante la fermentazione o la quantità di ossigeno presente nel fermentato.



Figura 2. Visione di insieme del biofermentatore

Oggi si intravede la possibilità di realizzare una più evoluta generazione di fermentatori sfruttando le esperienze acquisite con i biofermentatori da laboratorio.

La realizzazione di un nuovo impianto di questo tipo permetterebbe di garantire una produzione di siero-innesto autoctono con maggior vitalità e attività fermentativa, di ridurre le fermentazioni anomale nella fase di stagionatura e l'eventuale sviluppo di microflora con attività inibente, nonché le fonti di contaminazione esterne.

Il biofermentatore sperimentale a confronto con le fermentiere tradizionali

Il biofermentatore sperimentale messo a punto e testato nell'ambito del progetto MISA è un'unità integrata formata da un recipiente di fermentazione e da un modulo di misura e controllo (figura 2).

È privo di "spazio di testa", a differenza di una fermentiera tradizionale che presenta invece uno spazio di testa pari all'intera superficie del liquido a contatto con l'aria, quindi con un elevato scambio con l'atmosfera (figura 3).

Nel corso di MISA è stata effettuata una serie di 20 fermentazioni in parallelo con una fermentiera programmabile tradizionale, in dotazione presso il caseificio ERSAF, e con il biofermentatore sperimentale LB 150 allo scopo di verificare e confrontare le caratteristiche del fermentato ottenuto in condizioni controllate. In tale ciclo di prove, a

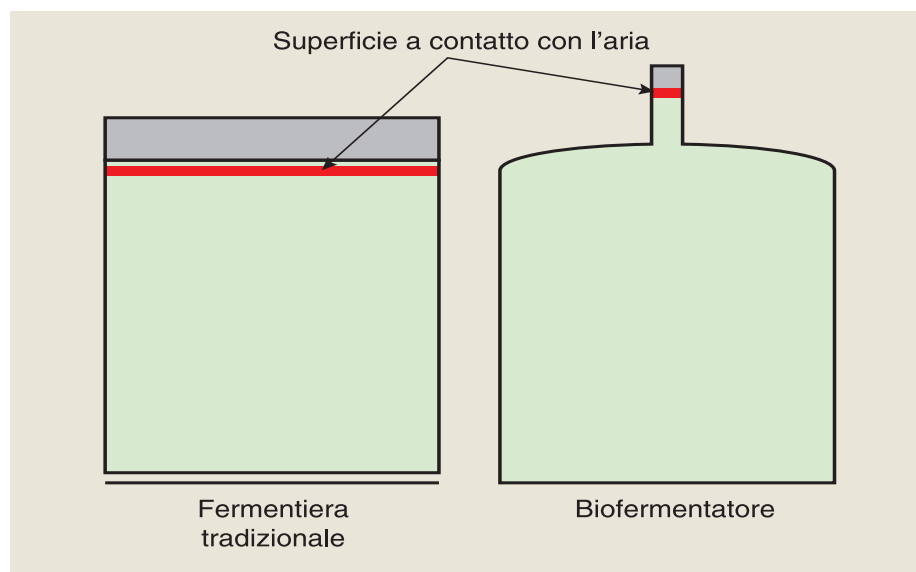


Figura 3. Confronto tra fermentiera trazionale e biofermentatore LB 150

parità di gradiente termico impostato, la popolazione lattica termofila ottenuta è risultata equivalente tra le due apparecchiature, ma il biofermentatore presenta il vantaggio di un veloce raffreddamento della massa fermentata a temperature di mantenimento (15-16 °C) che evita gradienti indesiderati.

«Tale prestazione è favorita dalla geometria del biofermentatore che, essendo privo di spazio di testa, permette un efficiente scambio termico in quanto è possibile applicare una forte velocità di agitazione (60-80 rpm) senza inglobare aria; tali condizioni non sono applicabili nelle fermentiere tradizionali dove non si possono superare i 10-15 rpm senza creare molta schiuma e forte ossigenazione – chiarisce Zapparoli. – Ma la vera differenza tra le due fermentiere consiste nel conteggio dei batteri lattici eterofermentanti produttori di gas, che risulta costantemente bassissimo solo nei cicli fermentativi svolti nel biofermentatore (tabella 1). Si tratta di un aspetto importante, dato che è proprio questo tipo di batteri il responsabile dei difetti attualmente più diffusi nel Grana Padano Dop, quali occhiate di varia estensione che comportano anche alterazioni delle caratteristiche organolettiche».

Con molta probabilità tale risultato è da attribuire, oltre che alla geometria del biofermentatore, al trattamento dell'interno del vaso lucidato a specchio, che consente un'ottimale detersione e disinfezione impedendo la formazione di film biologici

residuali. Un altro vantaggio dell'LB 150 è la possibilità di "sterilizzare" tutte le parti interne del fermentatore, tramite apposito programma, sfruttando l'immissione di vapore in camicia. Con questo biofermentatore si possono lanciare cicli di sterilizzazione dei substrati (eventuali sieri cotti non acidificati) che potrebbero servire da supporti nutritivi allo sviluppo selettivo dei batteri lattici autoctoni provenienti da una ceppoteca.

«Il biofermentatore non è un'alternativa alle fermentiere tradizionali in quanto i volumi di siero che si possono ottenere non superano i 150 litri; d'altronde la realizzazione di macchine più grandi presenterebbe problemi costruttivi e di costi non facilmente superabili» conclude Zapparoli.

«Per i caseifici, tale biofermentatore potrebbe rappresentare piuttosto un utile strumento per ottenere colture autoctone specifiche, da utilizzare quali integrazioni mirate e di completamento di quelle tradizionali, sempre partendo dalla matrice del caseificio».

Concentrazione della biomassa

L'evoluzione della sperimentazione ha previsto l'applicazione di metodiche atte ad aumentare la biomassa che si sviluppa durante la fermentazione lattica, caratterizzata da specie batteriche termofile, acido tolleranti, in grado di svilupparsi a valori di pH inferiori a 4. Nel metabolismo della flora lattica coltivata in sieri da grana si

raggiungono normalmente valori di pH tra 3,20 e 3,40 che riducono, fino a inibirla, la duplicazione batterica. Per limitare l'abbassamento estremo del pH e mantenere attiva la fase di duplicazione si può aggiungere al substrato un tampone chimico: a tale scopo, dopo una valutazione delle possibili opzioni si è scelta l'ammoniaca.

Per effetto del tamponamento, che consente di mantenere il pH a valori prossimi a 3,50-3,70, si registra un significativo aumento dei batteri lattici totali, pari al 24%, e del potere fermentativo che alla temperatura più critica dei 50 °C si innalza del 30%. Tale maggiore attività biologica ha avuto un riscontro pratico durante la trasformazione casearia, nella maggiore velocità e profondità dell'acidificazione delle cagliate.

Purtroppo, a fronte di questi effetti positivi derivanti dall'aumento della biomassa ha fatto riscontro in questa sperimentazione un forte aumento (di due logaritmi circa) dei lattici eterofermentanti produttori di gas. La conservazione previo congelamento dei sieri acidi concentrati con ammoniaca e la successiva ripresa ha evidenziato una prevedibile perdita nel numero di cellule

vitali e un indebolimento dell'attività biologica, simulata con il potere fermentativo. «Da queste esperienze sembrerebbe quindi più vantaggiosa la concentrazione del fermentato tramite trattamento su membrana che mediante tamponamento del pH con base chimica. Comunque i sieri tamponati con ammoniaca sono stati impiegati nella caseificazione: saranno quindi le valutazioni finali sul formaggio prodotto a indicare la via da seguire» spiega il responsabile del progetto.

Utilizzo di siero-innesto di altro caseificio

Spesso accade che la fermentazione lattica non avvenga nei parametri previsti e di conseguenza il tecnico casaro non può utilizzare la biomassa prodotta e deve ricorrere all'approvvigionamento presso altri caseifici. Oltre a essere tutt'altro che agevole, questa prassi può modificare anche sostanzialmente la flora batterica tipica e autoctona che caratterizza il processo produttivo del caseificio stesso.

Nell'ambito di MISA con alcuni cicli di prova sono stati valutati gli effetti sulla popo-

lazione lattica trasferita in un diverso contesto tecnologico e ambientale, avendo a disposizione un biofermentatore.

I siero-innesti di partenza sono risultati sempre molto simili tra loro e caratterizzati da un numero di cellule intorno a 10⁹ cell/ml con vitalità superiore all'80%, mentre i siero-innesti riprodotti in fermentiera hanno mostrato sempre una riduzione della vitalità cellulare.

La sperimentazione ha evidenziato che un siero-innesto proveniente da un caseificio "donatore" dopo pochi giorni si modella sulle peculiarità del caseificio "recettore" in quanto influenzato dalle caratteristiche del latte e dalle tecnologie applicate; tale andamento è risultato molto rallentato se vengono replicate le condizioni di sviluppo e la tecnologia casearia del caseificio donatore. In generale, si è osservato come la produzione di nuovo siero-innesto con fermentiera sia tradizionale sia sperimentale favorisce lo sviluppo di *L. helveticus* a scapito di *L. delbrueckii*.

La specie lattica maggiormente sensibile all'adattamento è risultata *S. thermophilus*: i giornalieri passaggi in fermentiera – sia tradizionale sia sperimentale – delle matrici di partenza ha determinato nella maggior parte dei casi un impoverimento del numero di cellule vitali di tale specie.

Analisi sensoriale dei formaggi prodotti

I metodi descrittivi sono utilizzati per presentare le caratteristiche sensoriali percepite in un prodotto e impiegarle per quantificare le differenze tra i medesimi. In questo progetto, si è utilizzato il metodo definito Profilo Convenzionale QDA (analisi quantitativa descrittiva), che prevede l'impiego di 8-12 soggetti addestrati. Tutte le tesi testate sui sieri hanno generato forme di grana che all'analisi sensoriale hanno evidenziato differenze che fanno pensare a stadi diversi di maturazione: le forme di controllo si collocano in corrispondenza dei descrittori *odore e aroma di crosta, salato, piccante, durezza, solubilità e friabilità*, mentre le forme sperimentali derivanti dall'utilizzo del biofermentatore sono caratterizzate dai descrittori *dolce, adesività, elasticità, deformabilità, odore e aroma di panna*.



Tabella 1. Analisi siero-innesti ottenuti da fermentiera tradizionale (1) vs. biofermentatore (2)

Campione	Acidità °SH/50 ml	Sedimento %	Osservazione microscopica	Lattici in A.S. 10°x/ml	Eterolattici MPN/ml	P.F. a 45 °C Delta °SH
(1)	26,0	1,2	reg.	920	2.400	6,24
(1)	27,5	0,9	reg. -	130	430	6,32
(1)	27,0	1,1	reg.	340	36	8,39
(1)	30,5	0,9	reg.	650	1.200	6,74
(1)	31,5	1,2	reg.	950	30	7,50
(1)	29,5	0,9	reg.	650	930	4,38
(1)	29,5	0,7	reg.	890	210	6,51
Media	28,8	1,0	...	647	748	6,58
(2)	28,0	0,8	reg.	800	-30	8,54
(2)	26,5	0,7	reg. -	110	-30	5,99
(2)	26,5	0,9	reg.	380	-30	5,23
(2)	29,6	0,9	reg.	860	-30	5,97
(2)	32,0	1,2	reg.	1.100	-30	8,12
(2)	30,5	0,8	reg.	740	-30	4,25
(2)	28,0	0,8	reg.	900	-30	4,9
Media	28,7	0,9	...	699	-30	6,14

© RIPRODUZIONE RISERVATA