

le produzioni casearie DOP e per la difesa della loro tipicità



Tatiana Dallo, Michela Centeleghe
Lattebusche, Latteria della Vallata Feltrina



Angiolella Lombardi, Giorgio Marcazzan, Antonio Cattelan, Christian Andrighetto, Sandra Comparin, Paola De Dea
Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Thiene (VI)

La tipicità e la qualità dei formaggi DOP e tradizionali sono influenzate da tre importanti fattori: **tecnologia di produzione, origine e qualità del latte, microflora naturali** derivate dal latte o dalle colture naturali (lattoinnesti o sieroinnesti) tradizionalmente utilizzate nella produzione di questi formaggi. Considerando che la biodiversità delle microflora naturali presenti nei formaggi DOP e tradizionali è un importante fattore di differenziazione e valorizzazione delle produzioni locali il progetto si è posto i seguenti obiettivi:

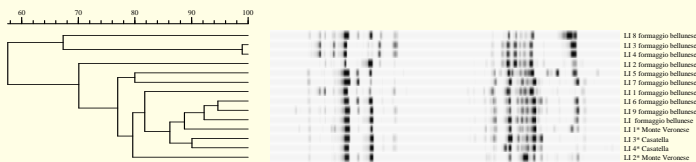
1. Messa a punto di metodiche molecolari per lo studio della biodiversità microbica degli innesti naturali impiegati nella produzione di formaggi tradizionali dell'area bellunese al fine di verificare il loro contributo alla tipicità del prodotto e il loro legame con il territorio e la tecnologia di produzione
 2. Sviluppo di nuove tipologie di colture starter autoctone derivate dalla liofilizzazione dei lattoinnesti naturali in grado garantire il mantenimento del patrimonio biologico presente nel latte e di contribuire alle caratteristiche di tipicità e qualità dei formaggi con esse ottenuti.
 3. Caratterizzazione genetica e tecnologica dei batteri lattici isolati dai lattoinnesti, individuazione di ceppi con peculiari caratteristiche biotecnologiche
- Un ulteriore obiettivo (4) ha infine riguardato la caratterizzazione di batteriofagi attivi verso *Streptococcus thermophilus* e la messa a punto di un nuovo metodo rapido per la individuazione dei batteriofagi in caseificio.

OBIETTIVO 1

E' stato messo a punto di un nuovo metodo per l'estrazione del DNA batterico totale direttamente da campioni di lattoinnesto naturale. Il DNA estratto è stato quindi utilizzato per studiare la biodiversità delle popolazioni microbiche presenti all'interno dei lattoinnesti naturali utilizzando le seguenti metodiche molecolari:

- ✓ RAPD-PCR con i primers M13 e D11344
- ✓ TTGE regione V3 del 16S rDNA
- ✓ ITS - PCR con primers G1 e L1
- ✓ ARDRA regione V3-V8 del 16S rDNA

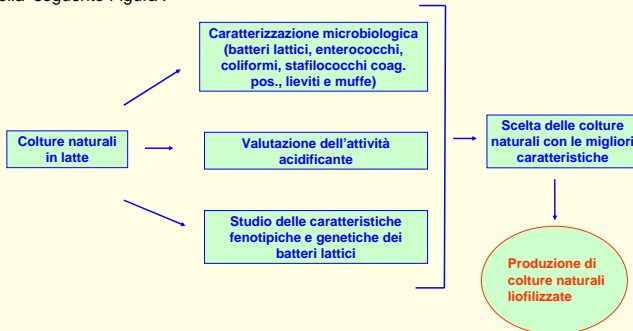
La metodica più discriminante è risultata la RAPD-PCR, che è stata quindi applicata a lattoinnesti per formaggi dell'area bellunese e a lattoinnesti derivati da altri formaggi della Regione Veneto



I risultati ottenuti mediante RAPD-PCR indicano che i lattoinnesti utilizzati per la produzione dei formaggi dell'area bellunese sono discriminabili da lattoinnesti utilizzati nella produzione di altri formaggi, quali il Monte Veronese e la Casatella Trevigiana (percentuale di similarità <90%). Il dato, sebbene consideri un numero limitato di lattoinnesti dell'area non bellunese, è interessante in quanto evidenzia la presenza di batteri lattici diversi in relazione al luogo di produzione e alla particolare tecnologia di preparazione del lattoinnesto usata.

OBIETTIVO 2

Nell'ambito di questo secondo obiettivo del progetto sono state messe a punto nuove tipologie di colture starter derivate dalla liofilizzazione di lattoinnesti naturali. La metodologia sviluppata, applicata a 49 lattoinnesti raccolti in diversi momenti stagionali, è schematizzata nella seguente Figura:



I lattoinnesti da riprodurre in forma liofilizzata sono stati selezionati sulla base dei risultati relativi all'attività acidificante e alle caratteristiche microbiologiche. In particolare, sono stati selezionati due lattoinnesti caratterizzati da:

- ✓ buona attività acidificante
- ✓ assenza di microrganismi patogeni o contaminanti
- ✓ elevata concentrazione di batteri lattici
- ✓ presenza di più ceppi diversi nell'ambito della specie *S. thermophilus*

I lattoinnesti naturali liofilizzati sviluppati nel corso del presente lavoro si differenziano dagli abituali starter commerciali utilizzati in lavorazione in quanto, a differenza di questi ultimi, risultano costituiti da più ceppi microbici; in particolare, derivando dalla liofilizzazione dei lattoinnesti naturali contribuiscono a mantenere il patrimonio biologico e biotecnologico presente nel latte e a valorizzare le caratteristiche di tipicità e qualità dei formaggi con essi ottenuti. Inoltre, la disponibilità di un lattoinnesto naturale liofilizzato consente di superare le criticità legate alla preparazione giornaliera del lattoinnesto naturale in caseificio.

OBIETTIVO 3

Questa fase del progetto ha previsto la caratterizzazione genetica e tecnologica di ceppi di *Streptococcus thermophilus* isolati dai lattoinnesti allo scopo di individuare ceppi con peculiari caratteristiche biotecnologiche. L'approccio e le metodologie utilizzate per la caratterizzazione sono di seguito riportate:

Analisi RAPD-PCR con primer D11344 su 150 colonie *S. thermophilus* isolate da lattoinnesti



Presenza da 1 a 5 ceppi diversi all'interno di uno stesso lattoinnesto

Selezione 27 ceppi diversi e successiva caratterizzazione

a) fenotipica/tecnologica (fermentazione galattosio, fruttosio, trealosio e ribosio; attività acidificante in latte, attività aminopeptidasi)

b) genetica (RAPD-PCR con 2 primer, sequenziamento porzione gene *LacS*)

La caratterizzazione tecnologica e genetica ha consentito di individuare un'elevata biodiversità genotipica e fenotipica nell'ambito degli streptococchi termofili presenti nei lattoinnesti naturali per formaggi bellunesi. Tale diversità microbica rappresenta un'interessante risorsa industriale. Alcuni dei ceppi caratterizzati nel corso del presente lavoro sono stati utilizzati per allestire colture starter miste da utilizzare in caseificazione, eventualmente in alternativa ai lattoinnesti liofilizzati descritti all'obiettivo 2.

OBIETTIVO 4

I batteriofagi attivi verso le colture di batteri lattici impiegate nella produzione di formaggi rappresentano un grave problema per l'industria casearia. L'infezione da batteriofagi è infatti la principale causa di fallimento o rallentamento della fermentazione lattica durante la produzione di formaggio. E' quindi importante isolare e caratterizzare i batteriofagi presenti in caseificio ed acquisire informazioni utili per lo sviluppo di strategie di prevenzione e controllo e per la messa a punto di nuove tecniche rapide ed attendibili per la ricerca dei batteriofagi in caseificio.

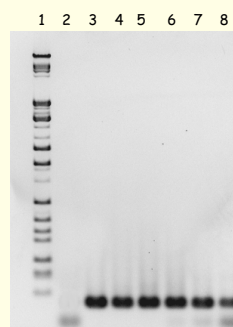
Questa fase del progetto ha previsto l'isolamento e la caratterizzazione genetica di fagi attivi verso *S. thermophilus*, lo studio del loro spettro d'ospite e la messa a punto di un metodo rapido per la ricerca di batteriofagi in sieri di fine lavorazione.

Sono stati isolati e sottoposti a caratterizzazione 42 fagi attivi verso *S. thermophilus*. L'analisi dei geni *cos*, *pac*, *int* e *host* e lo studio dello spettro d'ospite hanno evidenziato che:

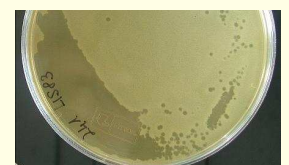
- ✓ 88% fagi attivi verso *S. thermophilus* sono di tipo *cos*
- ✓ Sulla base della sequenza gene *host* rilevati 15 diversi fagi
- ✓ Presenza in uno stesso caseificio di più fagi diversi
- ✓ Presenza di fagi in grado di attaccare più ceppi batterici (da 2 a 4)
- ✓ Presenza di ceppi attaccati da più fagi (fino a 5)

I risultati ottenuti possono essere utilizzati per allestire sistemi di rotazione delle colture starter atti a prevenire il problema fago in caseificio.

E' stato infine allestito un metodo molecolare rapido (PCR dei geni *cos* e *pac*) per l'individuazione di fagi in siero e in latte. Tale metodo (sensibilità 100 ufp/ml) consente di ottenere i risultati in poche ore, a differenza del metodo convenzionale che richiede diversi giorni di indagine.



PCR del gene *cos* usando siero contaminato con differenti titoli di fago φ84-26. Pozzetto 1: marcatore peso molecolare; pozzetto 2: controllo negativo; pozzetto 3-8: 10⁷ ufp/ml-10² ufp/ml.



Placche di lisi di un fago attivo verso *S. thermophilus*