

CARATTERIZZAZIONE GENETICA DI BATTERI LATTICI AUTOCTONI PER LA PRODUZIONE DI YOGURT

Ilaria BRUNET^{1,2}, Fabio GUGLIELMO^{1,2}, Simona ZENATO^{2,3}, Sabina VALENTINI^{2,3}, Santa TUTINO^{1,2}

¹ Regione Autonoma Valle d'Aosta – Struttura Biodiversità e aree naturali protette - Museo regionale di Scienze naturali E. Noussan. Loc. Amérique 127/a, 11020 Quart (AO)

² Unità di Ricerca HEART VdA

³ Institut Agricole Régional. Reg. La Rochère 1/A, 11100

INTRODUZIONE E SCOPO DEL LAVORO

La valutazione e la selezione di nuovi ceppi di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e di *Streptococcus thermophilus* sono fasi preliminari alla messa a punto di uno yogurt unico da un punto di vista organolettico-nutrizionale e che sia strettamente legato ad un particolare territorio.

Le tecniche molecolari basate sull'analisi del DNA rappresentano un valido ed accurato strumento identificativo a supporto di questo tipo di indagini. L'analisi della sequenza di una porzione della regione 16S codificante per l'RNA ribosomiale è, ad oggi, uno dei metodi più impiegati per l'identificazione specifica di isolati batterici; parimenti, l'analisi *Multi Locus Sequence Tagging* (MLST), basata sul sequenziamento di porzioni di DNA da differenti geni costitutivi (*housekeeping genes*), si è dimostrata molto utile nel differenziare, anche a livello intraspecifico, batteri lattici isolati da svariate matrici.

Il presente lavoro, che si inserisce in un più ampio progetto denominato *Dairy Product and By-Product*, è dunque finalizzato a identificare e caratterizzare geneticamente i batteri lattici isolati da latte proveniente da bovine di razza valdostana e che saranno poi selezionati, sulla base di prove tecnologiche e sensoriali, per la produzione di uno yogurt, o latte fermentato, interamente valdostano.

MATERIALI E METODI

Un totale di 49 batteri lattici sono stati isolati su terreni di coltura M17 e MRS partendo da latte d'alpeggio di bovine di razza valdostana in lavorazione per la produzione di Fontina DOP. Come confronto, sono inoltre stati inclusi nello studio 3 ceppi di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e 3 ceppi di *Streptococcus thermophilus* derivanti da miscele commerciali comunemente impiegate per la produzione di yogurt.

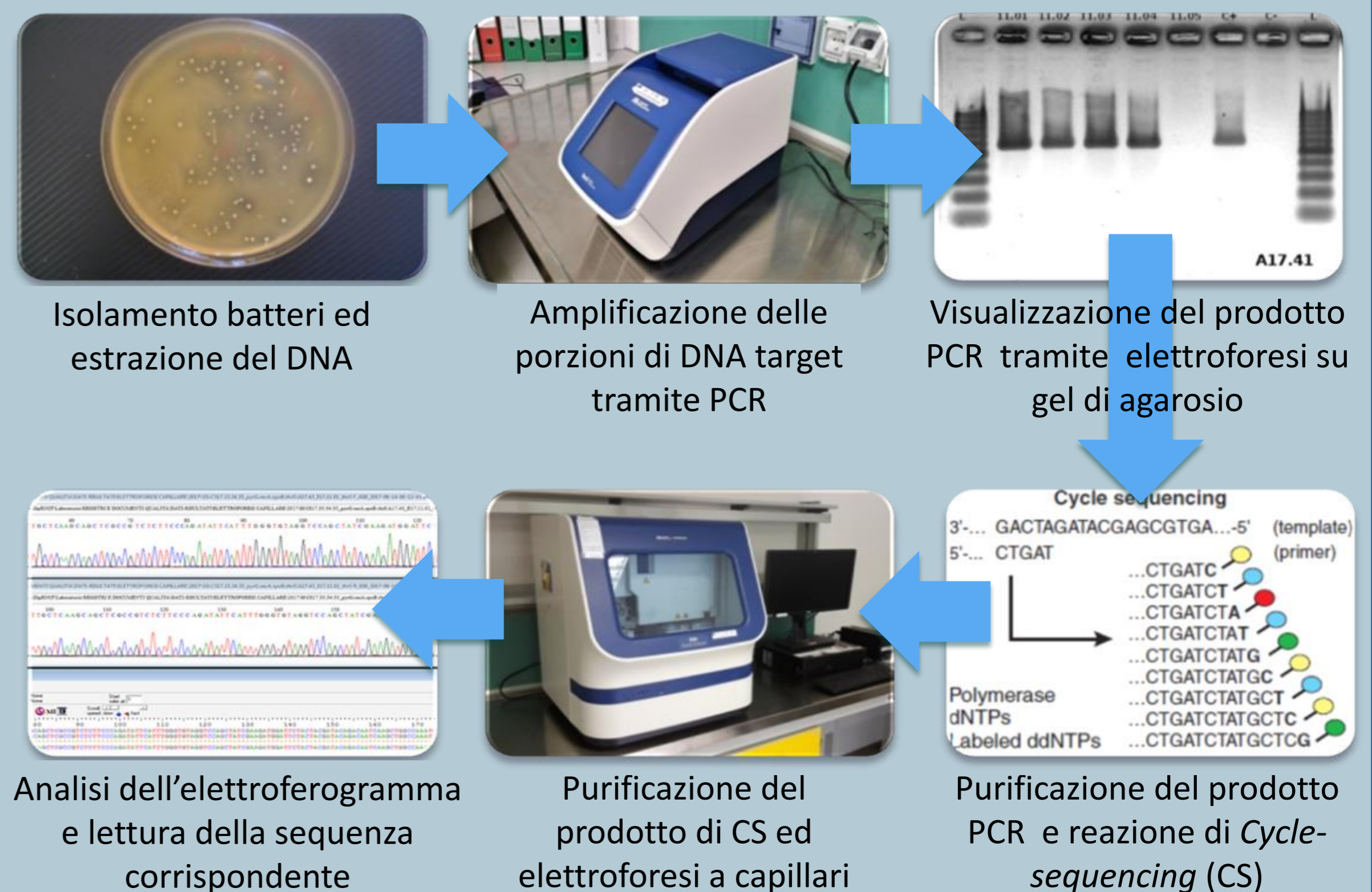
Tutti gli isolati ottenuti sono stati sottoposti alle seguenti analisi:

- ❑ Estrazione del DNA con kit MicroLYSIS®-Plus (Microzone)
- ❑ Identificazione specifica tramite sequenziamento di una porzione del 16S rDNA (Shehata *et al.* 2016)

I batteri lattici identificati come *L. delbrueckii* e come *S. thermophilus* sono quindi stati indagati a livello intraspecifico rispettivamente tramite:

- ❑ Analisi MLST basata sul sequenziamento di porzioni dei loci genici *clpX*, *dnaA*, *groEL*, *murE*, *pheS*, *pyrG*, *recA* e *rpoB* (Song *et al.* 2016)
- ❑ Analisi MLST basata sul sequenziamento di porzioni dei loci genici *dnaE*, *glcK*, *thrS*, *clpX* e *murE* (Bensalah *et al.* 2011; Yu *et al.* 2015)

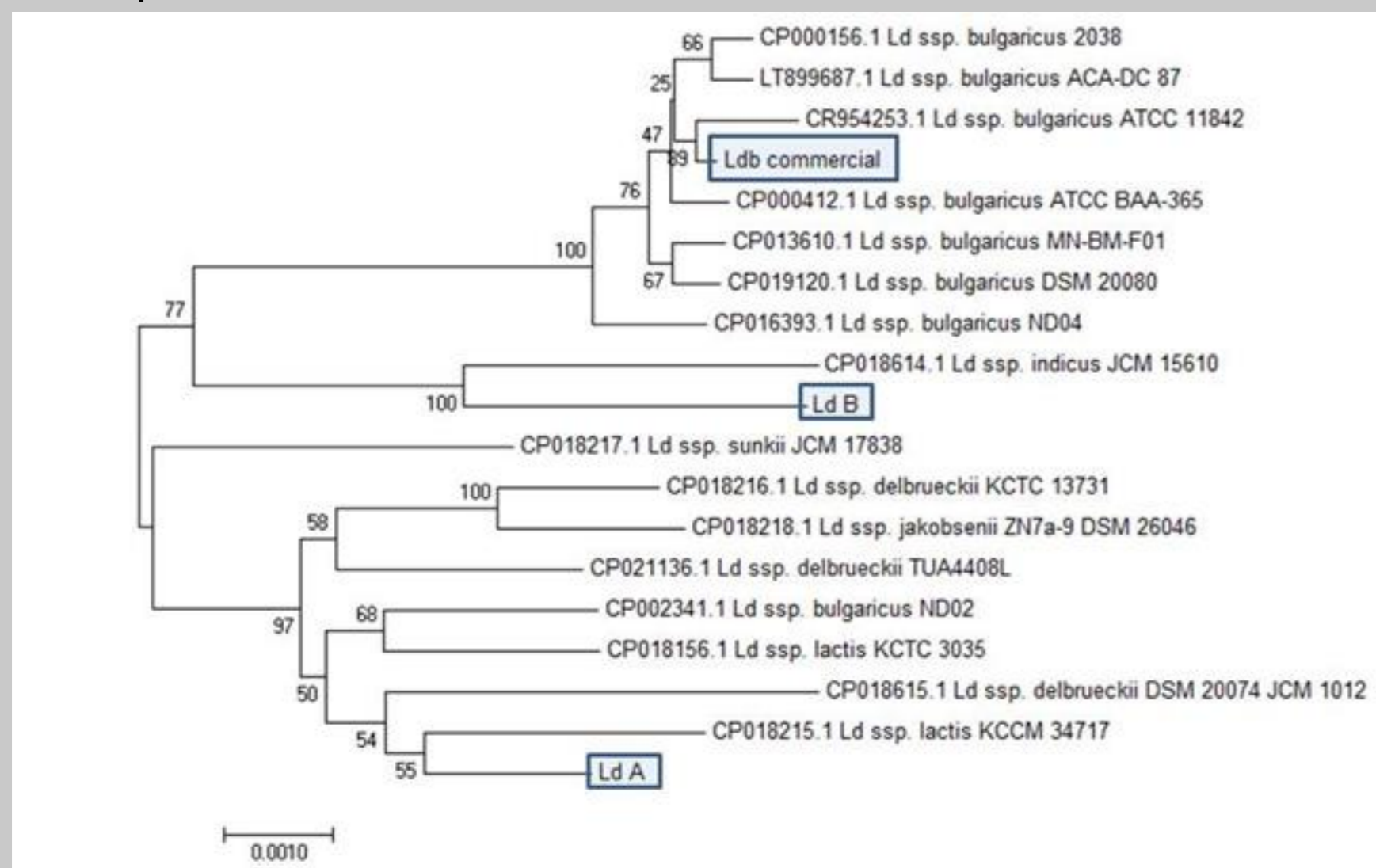
Nella figura a lato sono schematicamente raffigurate le fasi analitiche per il sequenziamento delle porzioni di DNA analizzate in questo studio.



RISULTATI

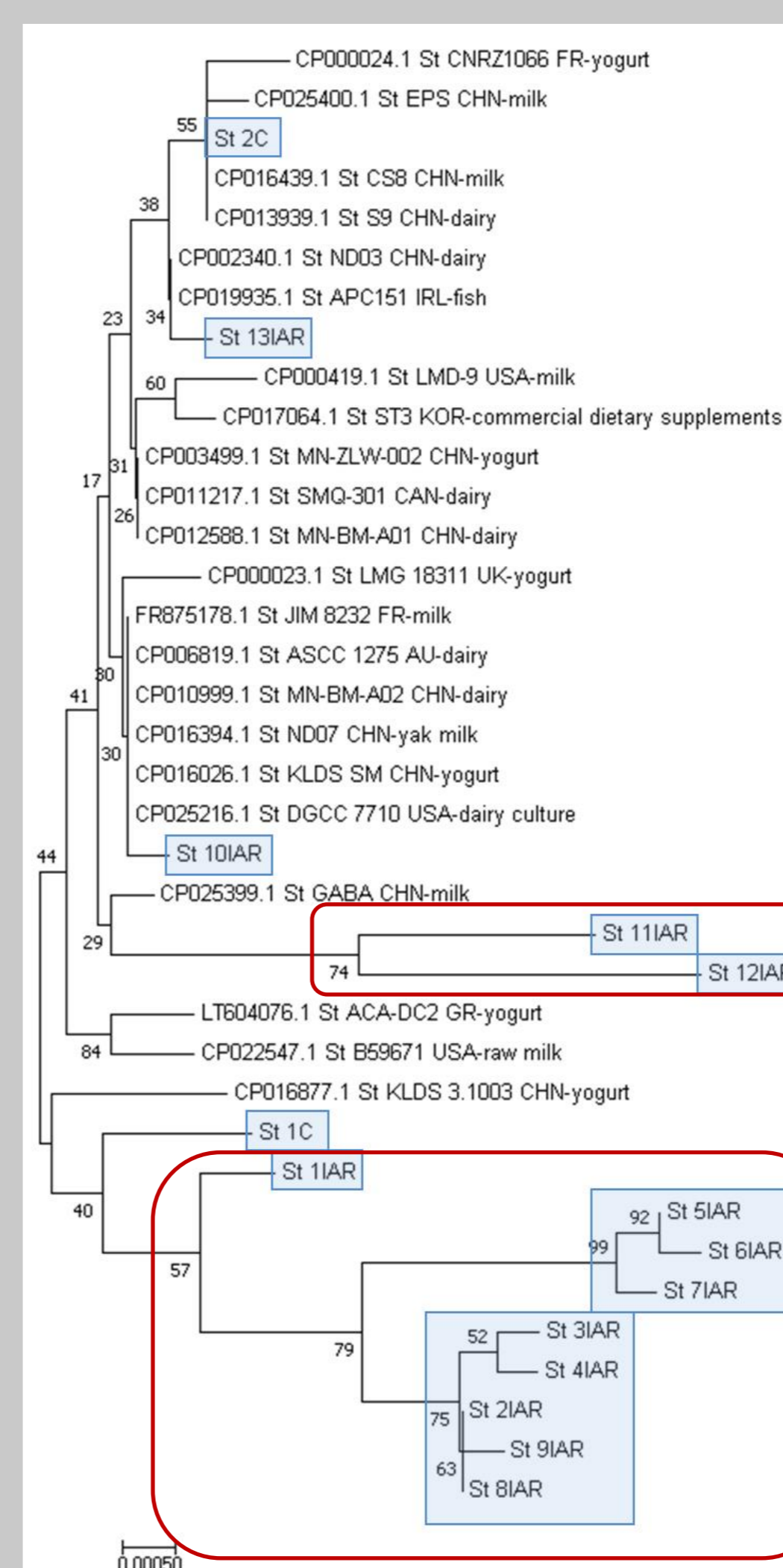
- ❑ Dall'analisi della porzione 16S rDNA sono stati identificati 16 isolati di *Lactobacillus delbrueckii* e 31 isolati di *Streptococcus thermophilus*.

- ❑ L'analisi MLST dei 16 isolati di *L. delbrueckii* ha permesso di differenziare 3 aplotipi: l'aplotipo LdA, comprendente la maggior parte degli isolati; l'aplotipo LdB, comprendente due isolati; l'aplotipo LdC comprendente solo i ceppi commerciali. Da evidenziare che 5 degli 8 loci analizzati permettono di distinguere gli isolati autoctoni da quelli commerciali.



Dendrogramma basato su matrice di distanza ottenuta da nove loci concatenati (per un totale di 5362 basi) ed usando il metodo *Neighbor-Joining*. Il *Bootstrap test* (500 replicati) è riportato a fianco di ogni ramificazione. Le distanze evolutive sono calcolate tramite metodo *Kimura 2-parameter*.

- ❑ Dall'allineamento delle sequenze concatenate dei diversi aplotipi con quelle di altri ceppi di *L. delbrueckii* presenti in *GenBank* (vedi figura sopra) si evidenzia che entrambi gli aplotipi autoctoni hanno un profilo unico. Da rimarcare che LdA è vicino a ceppi appartenenti alla sottospecie *lactis* e *delbrueckii* mentre LdB è vicino ad un ceppo appartenente alla sottospecie *indicus*. Gli aplotipi commerciali rientrano all'interno del gruppo che contiene tutti i ceppi appartenenti alla sottospecie *bulgaricus*. Dopo applicazione del protocollo analitico molecolare ISS (Aureli *et al.* 2018), tutti gli isolati sono tuttavia risultati affini a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.



- ❑ L'analisi MLST dei 31 isolati di *S. thermophilus* ha evidenziato la presenza di 13 aplotipi autoctoni che si differenziano dai 2 aplotipi commerciali.

- ❑ Dall'analisi delle sequenze concatenate con quelle di altri ceppi appartenenti alla stessa specie presenti in *GenBank* (vedi figura a lato), è da rimarcare che: tutti gli aplotipi autoctoni hanno un profilo unico; la maggior parte degli aplotipi individuati ricade in due gruppi (cerchiati in rosso) che si differenziano rispetto agli altri ceppi e a quelli commerciali; i restanti due aplotipi, *i.e.* St10 e 13 IAR, si differenziano bene da tutti gli altri isolati analizzati, ma risultano simili a numerosi altri ceppi presenti in *GenBank*.

Dendrogramma basato su matrice di distanza da sei loci concatenati (per un totale di 2576 basi) ed usando il metodo *Neighbor-Joining*. Il *Bootstrap test* (500 replicati) è riportato a fianco di ogni ramificazione. Le distanze evolutive sono calcolate tramite metodo *Kimura 2-parameter*.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro ha permesso non solo di confermare l'unicità, da un punto di vista genetico, degli aplotipi autoctoni di *L. delbrueckii* e di *S. thermophilus* isolati in questo studio, ma anche di valutarne le distanze evolutive rispetto ad altri ceppi commerciali e/o già analizzati in precedenti studi.

I dati ottenuti saranno utili alla messa a punto del protocollo di certificazione/tracciabilità genetica, basato sull'analisi di *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs), per garantire l'autenticità delle formulazioni di fermenti autoctoni selezionati per la produzione di uno yogurt, o latte fermentato, interamente valdostano.

BIBLIOGRAFIA

- AURELI ET AL. (2008). Rapporti ISTISAN 08/36, 63 p.
 BENSALAH ET AL. (2011). African Journal of Biotechnology 10: 17251-17257.
 SHEHATA ET AL. (2016). Annals of Agricultural Science 61: 65-75.
 SONG ET AL. (2016). Scientific Reports 6: 22704.
 YU ET AL. (2015). BMC Microbiology 15: 236

Questo lavoro è cofinanziato dal FESR e FSE attraverso il bando "Cooperazione e sviluppo di Unità di ricerca" programmazione 2014-2020