

WP1: Attività di campo e laboratorio sul latte in produzione primaria

Partner coinvolti: Capofila (A1), Dipartimento di Agraria (D1), Azienda Savoia (B1)

Il primo WP ha come focus il latte prodotto dall'azienda partner Fattoria Savoia a partire da vacche unicamente riconducibili alla razza Pezzata Rossa. Gli obiettivi previsti si muovono su piani paralleli ma complementari: da una parte colmare un *gap* nella letteratura correlata relativamente alla speciografia microbica con riferimento al genotipo bovino e dall'altra selezionare colture autoctone di batteri lattici dotate di specifiche attitudini fisiologiche con cui realizzare prodotti lattiero-caseari funzionali.

Il latte è un fluido biologico complesso, specie-specifico, che oltre a soddisfare le esigenze nutrizionali svolge numerosi ruoli funzionali indispensabili per sviluppo della prole dei mammiferi. Le azioni biologiche del latte sono dovute alla presenza di cellule immunitarie e di un assortimento di molecole attive, incluso zuccheri, nucleotidi, lipidi, immunoglobuline, proteine antimicrobiche, citochine e altri fattori immunomodulatori. Inoltre, il latte alberga una comunità complessa e variegata di batteri, che nel caso del latte bovino è stata caratterizzata unicamente con riferimento alla trasformazione tecnologica. Negli ultimi anni, il microbiota del latte umano è stato oggetto di diversi studi volti a comprenderne il ruolo nella fisiologia e nella salute sia della madre, sia del bambino. Di converso, il grosso degli studi sul microbiota del latte di ruminanti ha avuto come focus unicamente l'evoluzione della flora microbica durante la conversione in prodotto alimentare. Ad oggi, sono stati condotti ben pochi studi tesi a valutare il microbiota del latte nel contesto della salute e della fisiologia animale. Kuehn et al. (2013^[1]), ad esempio, hanno utilizzato il pyrosequencing del gene 16S nell'ambito dell'operone che codifica per gli RNA ribosomiali allo scopo di studiare la diversità batterica in 10 campioni di latte mastitici, negativi alla coltura. Gli autori sono stati in grado di evidenziare differenze significative tra i profili microbici di campioni di latte sano e non. In uno studio pubblicato più di recente,

Oikonomou et al. (2013²) nel caratterizzare la diversità microbica di 144 campioni di latte bovino da quarti clinicamente affetti o meno da mastite, hanno evidenziato entità tassonomiche quali *Lachnospiraceae*, *Fecalibacterium*, *Propionibacterium* e *Aeribacillus* spp. che sono appannaggio esclusivo di un microbiota sano.

Oltre alla valutazione del microbiota del latte con riferimento allo stato di salute della lattifera, taluni autori hanno

indagato sull'influenza della dieta (Zhang et al., 2015³) o della stagionalità (Falentin et al., 2016⁴) sul microbiota del latte bovino, ma nessuna ricerca si è ad ora concentrata sull'eventuale rilevanza del genotipo della lattifera.

Essendo un fluido ricco e nutriente, il latte favorisce la crescita di molti microrganismi. Pertanto, oltre al suo microbiota endogeno, una volta munto viene rapidamente colonizzato da una varietà di altri microbi provenienti dal canale del capezzolo, dalla pelle delle mammelle, dalle macchine per la mungitura, dai contenitori e dai serbatoi utilizzati per la sua conservazione, finendo con il rispecchiare non solo l'ambiente di pascolo, ma anche quello di allevamento. Ogni campionamento effettuato nell'ambito di questo wp ha richiesto dunque l'approntamento di piani di prelievo di campioni in grado di garantire le condizioni di massima protezione dalla contaminazione. Ciò ha richiesto un'intensa sinergia tra le unità di ricerca coinvolte e l'azienda partner Fattoria Savoia, la quale si è impegnata al prelievo di campioni in conformità ad uno scrupoloso protocollo che prevedeva la mungitura manuale accompagnata da procedure di sanificazione della mammella e dell'operatore.

In quest'ottica, peraltro come previsto al punto 1.1, il latte in produzione primaria è stato sottoposto a valutazione microbiologica e chimico-fisica del latte onde ottenere una **caratterizzazione nutrizionale, chimico-fisica, e microbiologica del latte con riferimento alla stagionalità e alla variazione del regime alimentare delle lattifere.**

In parallelo presso il Dipartimento di Agraria ha preso avvio la valutazione del microbioma del latte aziendale. Campioni di latte alla mungitura sono stati sottoposti ad estrazione del DNA usando un kit commerciale prodotto dalla Qiagen. A latere delle analisi metagenomiche *DNA-based culture-independent*, il latte è stato sottoposto ad una caratterizzazione di tipo convenzionale per il previsto isolamento di colture di batteri lattici (wp1.3).

Latte crudo proveniente dalla mungitura mattutina è stato sottoposto ad analisi microbiologiche volte alla caratterizzazione della microflora dominante. In particolare, sono stati oggetto di valutazione la carica microbica totale a 30°C, i batteri lattici (LAB), le Enterobacteriaceae, i lieviti e le muffe. Per la carica mesofila totale è stato adoperato il Total Plate Count agar (PCA) mentre per i lieviti e le muffe è stato impiegato il Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol agar (DRBC). Nell'ambito dei LAB, i lattococchi sono stati enumerati su M17 con lattosio incubato per 48 h a 30°C e gli streptococchi adoperando lo stesso substrato ma con incubazione a 44°C. Per la conta dei lattobacilli mesofili eterofermentanti facoltativi è stato adoperato l'MRS con incubazione a 30°C, mentre per i termofili è stato impiegato l'agar Rogosa acidificato con acido acetico accompagnato da incubazione a 44°C. Gli enterococchi sono stati

quantificati per conteggio sul substrato selettivo Slanetz& Bartley (S&B). Le Enterobacteriaceae, contate su Violet Bile Red Glucose agar sono risultate costantemente al di sotto della soglia di rilevamento del metodo (dati non mostrati), mentre i livelli di popolazione dei restanti gruppi microbici sono riportati nel grafico che segue.

Come evidente dall'istogramma, la componente prevalente del latte è costituita da presunti lattococchi e in generale la microflora dominante è costituita di batteri lattici.

Allo scopo di comparare il microbiota del latte di Pezzata Rossa con quello di altre razze sono stati prelevati due campioni di latte di Agerolese, un ecotipo bovino autoctono. Anche in questo caso, oltre all'estrazione del DNA in vista delle analisi metagenomiche, i campioni sono stati sottoposti a valutazione microbiologica adoperando gli stessi substrati e condizioni di incubazione testé descritti. Nella figura che segue i conteggi sono stati posti in comparazione con quelli ottenuti per il latte di pezzata Rossa prodotto dall'azienda Savoia.

Dal grafico si evince che entrambi i campioni di latte Ageolese presentavano un livello di carica microbica totale di oltre un ciclo logaritmico più elevato rispetto al latte di Pezzata Rossa. Anche in questo caso la microflora è dominata dai batteri lattici, ma non è possibile effettuare una generalizzazione con riferimento ai gruppi dominanti.

Allo scopo di individuare batteri lattici di potenziale applicazione tecnologica, un totale di 86 colonie è stato raccolto con criterio *random* da piastre di agar MRS, M17 e Rogosa seminate con le diluizioni più alte allo scopo di analizzare le popolazioni lattiche dominanti. Ogni colonia è stata purificata mediante striscio (*streaking*) ripetuto sullo stesso terreno e incubata a 30°C o 37°C per 48 ore. Tutti gli isolati sono stati preliminarmente assoggettati a reazione di Gram, test di attività catalasica e osservazione al microscopio.

Dei 30 ceppi risultati di morfologia bastoncellare è stata preliminarmente valutata la produzione di gas da glucosio mediante l'hot loop test in APT brodo e la capacità di fermentare il ribosio, onde ottenere indicazioni circa il metabolismo primario; In aggiunta è stata saggiata la capacità di crescere a 15°C.

Come prevedibile tutti i 18 ceppi isolati da MRS (LM₂G,

LM₃,LM₄,LM₅,LM₆,LM₇,LM₈,LM₁₀,LM₁₁,LM₁₃,LM₁₄,LM₁₅,LM₁₆,LM₁₇,LM₁₈,LM₁₉,LM₂₂,eLM₂₃) non producevano gas da esosi, crescevano a 15°C ed erano in grado di fermentare il ribosio, ovvero potevano essere presuntivamente inquadrati come lattobacillieterofermentanti facoltativi. Sorprendentemente anche le 12 colture (LR₇,LR₈,LR₉,LR₁₀,LR₁₁,LR₁₉, BLR₂₀,LR₂₁,LR₂₂,LR₂₃,LR₂₄,e LR₂₅) isolate da agar Rogosa presentavano le medesime caratteristiche sebbene questo substrato - nelle condizioni di incubazione impiegate - sia considerato elettivo per l'isolamento di lattobacilli omofermentanti.

Sui 56 ceppi risultati di morfologia coccica sono stati eseguiti test di test di crescita a 10e 45°C, in presenza del 6.5% di cloruro di sodio e a pH 9,6. Tredici (LS₁,LS₂,LS₃, LS₄,LS₆,LS₇,LS₈,LS₉P, LS₉G, LS₁₀,LS₁₁G, LS₁₁P, e LS₁₂) su 14 isolati da Slanetz& Bartley sono risultati in grado di svilupparsi in ognuno dei quattro condizioni testate effettuati e sono stati ricondotti al genere *Enterococcus spp*. Naturalmente questo dato non sorprende perché lo Slanetz& Bartley medium è fortemente selettivo per l'isolamento di questo genere. Analogamente, 8 (LD₁, LD₂,

LD₃,LD₉,LD₁₁,LD₁₂,LD₁₃,LD₁₄,e LD₂₆) su 14 isolati da M17 a 30°C , 5 (LDQ₁,LDQ₂,LDQ₄,LDQ₅, eLDQ₆) su 7 da M17 agar a 44°C, 4 (LM₁, LM₉,LM₁₂,eLM₂₁) su 6 da MRS,e 13 (LR₁,LR₂, LR₃, LR₄, LR₅, LR₆,LR₁₂,LR₁₃,

LR₁₄,LR₁₅, LR₁₆,LR₁₇, eLR₁₈) su 14 isolati da Rogosaagar potevano essere comunque ricondotti al genere *Enterococcus spp*. pur essendo stati isolati su substrati elettivi per l'isolamento di lattococchi, streptococchi e lattobacilli, rispettivamente. I restanti ceppi presentavano un comportamento vario, come riportato nella tabella che segue.

Code	Substrato d'isolamento	Crescita			
		10°C	45°C	6,5% NaCl	pH 9,6
LM ₂ P	MRS	-	+	+	+
LM ₂₀	MRS	-	+	+	+
LR ₁₉ A	Rogosa	-	+	+	+
LS ₅	Slanez&Bartly	+	+	-	+
LD ₄	M17 30°C	+	-	-	+
LD ₅	M17 30°C	-	+	-	+
LD ₁₅	M17 30°C	-	+	+	-

LD16H	M17 30°C	-	+	+	+
LD23H	M17 30°C	+	+	-	-
LD20	M17 30°C	-	+	+	+
LDQ3	M17 44°C	-	+	+	+
LDQ7	M17 44°C	+	+	-	+

Tutti gli isolati sono stati sottoposti a test di *screening* per valutarne proprietà tecnologiche quali la capacità di fermentare il galattosio, l'attività proteolitica, la produzione di esopolisaccaridi (EPS) e l'attività acidificante. In aggiunta sono stati saggiati tratti indesiderabili come la capacità posseduta da taluni batteri lattici di produrre ammine biogene.

Tutti i lattobacilli, per un totale di 30, sono risultati in grado di fermentare il galattosio. Questo tratto è estremamente utile perché l'accumulo di galattosio nel latte o nella cagliata può causare difetti di produzione, come la crescita di batteri lattici eterofermentanti indesiderabili e l'imbrunimento del formaggio durante la cottura. Più bassi livelli di galattosio sono, inoltre, vantaggiosi per la salute umana, in quanto un consumo eccessivo può determinare un aumento di sostanze tossiche nei tessuti.

Analogamente i 30 lattobacilli sono risultati scarsamente proteolitici. In effetti, i batteri lattici possiedono un complesso sistema proteolitico capace di idrolizzare le proteine del latte in peptidi e amminoacidi. La degradazione della caseina del latte, in particolare, gioca un ruolo importante nella determinazione della *texture* e nella definizione sensoriale dei formaggi. Un'eccessiva proteolisi resta tuttavia indesiderabile perché alcuni peptidi contribuiscono alla comparsa di sapore amaro e *dioff-flavours*.

Con l'eccezione del ceppo LM₂G, tutti i lattobacilli isolati da MRS sono risultati buoni acidificanti e nessun ceppo ha prodotto istamina. Nel prospetto che segue sono riepilogati i risultati relativi alla biosintesi di esopolisaccaridi in latte e alla produzione di ammine biogene diverse dall'istamina. Tre ceppi sono risultati in grado di produrre cadaverina e putresceina e devono pertanto essere esclusi dal novero dei possibili *starter*.

N.	Ceppo	Capacità acidificante	EPS	Putresceina	Cadaverina
14	LM ₇ -LM ₁₃ -LM ₁₄ -LM ₁₅ -LM ₁₆ -LM ₁₇ -LM ₂₂ -LM ₂₃ -LR ₂₀ -LR ₂₂ -LR ₂₃ -LR ₂₄ -LR ₂₅ -LM ₄	+	+	-	-
5	LR ₁₀ -LR ₁₁ -LR ₇ -LR ₈ -LR ₂₁	+/-	+	-	-
2	LR ₉ -LM ₂ G	+/-	-	-	-
6	LM ₆ -LM ₈ -LM ₁₈ -LM ₁₉ -LM ₃ -LM ₅	+	-	-	-
1	LR ₁₉ B	+/-	+	+	+
2	LM ₁₀ -LM ₁₁	+	+	+	+

Anche i 44 presuntivi enterococchi erano in grado di fermentare il galattosio e nessuno aveva attività proteolitica né capacità di produrre istamina. Otto è il numero complessivo di colture produttrici di cadaverina e putresceina.

N.	Ceppo	Capacità acidificante	EPS	Putresceina	Cadaverina
13	LM ₁ -LM ₁₂ -LM ₂₁ -LR ₁ -LR ₁₇ -LS ₂ -LS ₃ -LS ₄ -LS ₆ -LS ₈ -LS ₁₀ -LS ₁₁ P-LS ₁₂	+	+	-	-
5	LR ₁₃ -LS ₁ -LS ₇ -LDQ ₅ -LDQ ₆	+/-	+	-	-
7	LS ₉ P-LS ₉ G-LD ₁ -LD ₂ -LD ₃ -LD ₉ -LD ₁₄	+	-	-	-
11	LM ₉ -LR ₂ -LR ₃ -LR ₄ -LR ₅ -LR ₆ -LR ₁₂ -LR ₁₄ -LR ₁₅ -LR ₁₆ -LR ₁₈	-	+	-	-
1	LD ₂₆	-	+	+	+
2	LD ₁₂ -LD ₁₃	+	-	+	+

2	LS ₁₁ G_LDQ ₂	+	+	+	+
1	LD ₁₁	+/-	-	+	+
2	LDQ ₁ _LDQ ₄	+/-	+	+	+

Tra le colture afferenti a generi diversi e riepilogate nel prospetto che segue, la capacità di produrre ammine biogene è risultato un carattere piuttosto diffuso.

Ceppo	Crescita a				Fermentazione Galattosio	Capacità acidificante	Produzione EPS	Produzione	
	10°C	45°C	6,5% NaCl	pH 9,6				Putresceina	Cadaverina
LD ₅	-	+	-	+	+	+	+	-	-
LD ₁₅	-	+	+	-	-	+/-	+	+	+
LR _{19A}	-	+	+	+	+	-	-	-	-
LD _{16H}	-	+	+	+	-	+/-	+	+	+
LD ₂₀	-	+	+	+	+	-	+	+	+
LDQ ₃	-	+	+	+	+	+	+	+	+
LD _{23 H}	+	-	-	-	-	+/-	-	+	+
LD ₄	+	-	-	+	+	+	-	-	-
LM _{2P}	+	-	+	+	+	+	-	-	-
LM ₂₀	+	-	+	+	+	+	+	-	-
LS ₅	+	+	-	+	+	+	+	-	-
LDQ ₇	+	+	-	+	+	+/-	+	-	-

Inoltre, tre colture sono risultate incapaci di fermentare il galattosio: un tratto diffuso in *Streptococcus thermophilus*. In questa specie il lattosio è trasportato all'interno della cellula mediante una permeasi specifica (LacS), che opera secondo un sistema di antiporto lattosio-galattosio o secondo un sistema di simporto galattosio-protone. Sebbene il lattosio sia efficientemente trasportato nella cellula e successivamente idrolizzato da una β -galattosidasi intracellulare, molti ceppi di *S. thermophilus* impiegati nell'industria casearia fermentano solo il glucosio, mentre il galattosio è escreto nel mezzo. La reazione di scambio, che prevede un eccesso di galattosio dall'altra parte della membrana cellulare, caratterizza il cosiddetto fenotipo galattosio-negativo. Sebbene in alcuni ceppi di *S. thermophilus* sia stata riscontrata un'attività fosfo- β -galattosidasi, che suggerisce vie alternative per il trasporto del lattosio e la fermentazione del galattosio, la via metabolica di Leloir sembra essere la più frequente. La maggior parte dei ceppi di *S. thermophilus* sono galattosio negativi. Le mutazioni verso un fenotipo galattosio-positivo non risultano nell'espressione costitutiva del gene gal, suggerendo che questa specie era, in passato, Gal positivo e che solo recentemente sia diventato incapace di fermentare questo esoso. Frequentemente, il fenotipo Gal-negativo è stato attribuito a un difetto nel meccanismo di induzione della galattosio chinasi, che sembra essere l'enzima limitante nella via metabolica di Leloir.

I ceppi riportati in neretto nelle tabelle precedenti sono stati valutati per la capacità di abbassare il pH del latte di pezzata Rossa dopo 3, 6 e 16 ore. È interessante rilevare che i ceppi in grado di portare il pH ai valori più bassi dopo 6 h, segnatamente LM₃, LM₅, LM₁₅, LM₁₆, LM₁₇ e LM₂₃, non sono gli stessi in grado di acidificare maggiormente il latte dopo 16 h, ovvero i ceppi LM₆, LM₁₈ e LM₁₉. In ogni caso i ceppi più promettenti e che saranno valutati in un contesto più aderente alle condizioni di produzione lattiero-casearia appartengono tutti al gruppo dei lattobacilli.

Ceppo	pH a			Ceppo	pH a		
	3h	6 h	16 h		3 h	6 h	16 h
LM ₃	6,66±0,02	6,27±0,44	5,18±0,23	LR ₂₀	6,73±0,01	6,50±0,16	5,82±0,06
LM ₄	6,75±0,11	6,52±0,16	5,24±0,00	LR ₂₂	6,71±0,07	6,55±0,00	6,06±0,18
LM ₅	6,77±0,09	6,32±0,05	5,29±0,14	LR ₂₄	6,67±0,04	6,53±0,10	5,89±0,54
LM ₆	6,72±0,02	6,54±0,01	4,54±0,22	LR ₂₅	6,75±0,42	6,42±0,09	6,05±0,11
LM ₇	6,72±0,12	6,55±0,23	5,70±0,22	LM _{2P}	6,72±0,04	6,46±0,34	5,30±0,15

LM8	6,70±0,13	6,60±0,31	5,70±0,32	LM20	6,83±0,35	6,57±0,20	5,28±0,09
LM10	6,70±0,43	6,55±0,29	5,46±0,50	LD4	6,84±0,46	6,70±0,19	5,57±0,27
LM11	6,66±0,06	6,48±0,00	5,90±0,05	LD20	6,84±0,29	6,70±0,33	6,64±0,04
LM13	6,65±0,00	6,48±0,08	5,50±0,07	LD15	6,87±0,26	6,70±0,01	6,70±0,45
LM15	6,71±0,65	6,40±0,15	5,50±0,21	LD16H	6,86±0,02	6,70±0,04	6,66±0,00
LM16	6,72±0,56	6,26±0,26	5,47±0,33	LD5	6,84±0,08	6,71±0,54	6,70±0,09
LM17	6,69±0,03	6,40±0,03	5,40±0,51	LR19 A	6,87±0,43	6,60±0,09	6,55±0,26
LM18	6,64±0,77	6,57±0,17	4,59±0,04	LR1	6,79±0,19	6,72±0,28	6,70±0,35
LM19	6,71±0,04	6,57±0,07	4,60±0,06	LDQ7	6,83±0,03	6,82±0,43	6,68±0,04
LM22	6,75±0,31	6,42±0,44	5,45±0,00	LDQ3	6,82±0,28	6,50±0,03	5,70±0,16
LM23	6,72±0,00	6,34±	5,45±				

Su questo *pool* di ceppi di potenziale interesse applicativo è in corso l'identificazione e caratterizzazione su base molecolare – così come previsto al punto 1.4 del primo wp - cui seguirà l'accertamento di ulteriori caratteristiche di interesse funzionale quale la capacità di sopravvivere durante condizioni di transito gastro intestinale simulato e di produrre vitamine e fattori di crescita in matrice lattiero-casearia.