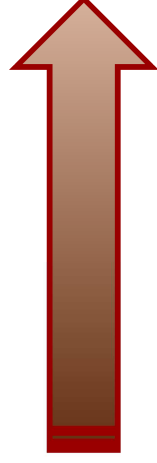


# Metodi molecolari per l'analisi di alcuni alimenti tradizionali nella Regione Lazio



**Dott.ssa Paola De Santis - Dott.ssa Bianca Maria Varcasia**  
**Laboratorio di Biotecnologie Applicate alla Sicurezza Alimentare**  
**Direzione Operativa Controllo Alimenti-IZSLT**





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## ALIMENTI nella TRADIZIONE

Patrimonio nazionale della tradizione locale

**MATERIE PRIME**

**MODALITÀ PRODUZIONE**

Mantenimento della biodiversità di ecosistemi tipici e unici

***FLORE AUTOCTONE***

***PATRIMONIO STORICO LOCALE***

Comprensione dei risvolti positivi per la salute umana





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

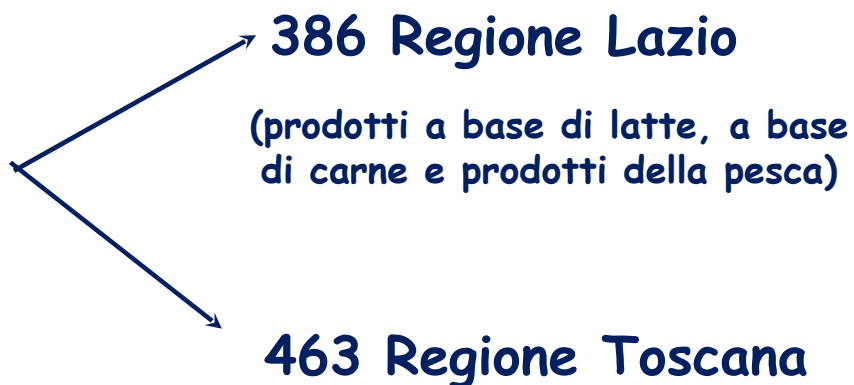
## PRODOTTO TRADIZIONALE (D.M. 350/99)



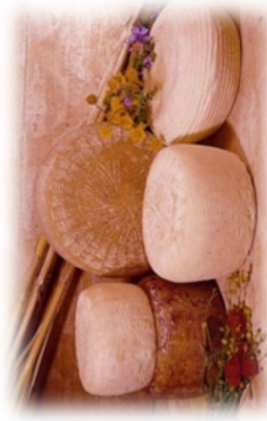
Prodotto le cui metodiche di lavorazione siano praticate sul territorio in maniera omogenea e secondo regole tradizionali da un periodo di tempo non inferiore a 25 anni e non riconosciuti come DOP, IGP, STG.

**In Italia ci sono 4813 prodotti  
tradizionali**

(Elenco Nazionale dei Prodotti Agroalimentari  
Tradizionali Italiani, Rev. 02/06/2014)



## Caratterizzazione delle flore lattiche (LAB) e/o potenzialmente probiotiche presenti nei prodotti “tradizionali” a base di latte e carne



**Pecorino di  
Picinisco**



**Salamella  
Cicolana**



**Salsiccia al  
Coriandolo**



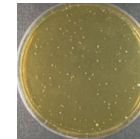


# FASI DEL LAVORO

1. Individuazione di un prodotto "tradizionale" ottenuto senza l'impiego di colture starter



1. Isolamento di LAB da 3 lotti di prodotto (lattobacilli: MRS agar a 37°C per 72 h in anaerobiosi; lattococchi M17 a 30°C (mesofili) e a 44°C (termofili) per 48 h in aerobiosi)



Piastra di MRS agar

1. Identificazione morfologica e biochimica dei ceppi:

- **Metodi morfologici** (morfologia delle colonie, crescita su terreni selettivi, test di Gram)
- **Metodi basati sulle caratteristiche biochimiche** (catalasi, ossidasi)

1. Purificazione ceppi con 3 passaggi seriali su terreni specifici

1. Identificazione biomolecolare [DGGE, microarray, RFLP/ARDRA, HRM e sequenziamento] [9DOC]

1. Prove di probioticità (analisi di screening, analisi specifiche) [LT08/10]

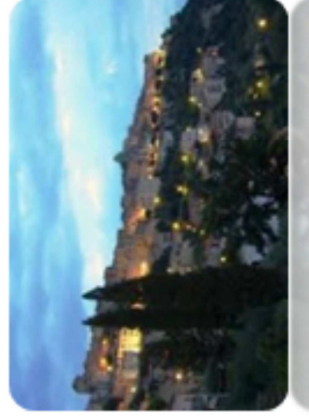


# SALSICCIA AL CORIANDOLO

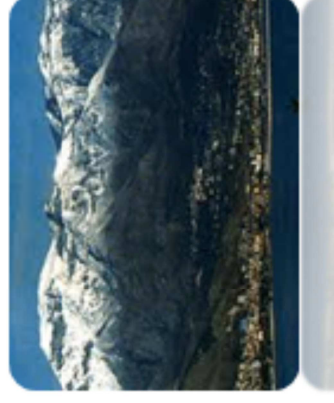
Areale di produzione



La zona di produzione è  
cirscritta alla provincia  
di Latina nei comuni di  
Maranola, Itri, Fondi,  
Monte San Biagio...etc...



Monte San Biagio



Maranola





## SALSICCIA AL CORIANDOLO

- ✓ È un salume dal profumo intenso e deciso grazie alla presenza del coriandolo (*Coriandrum sativum* L., *Apiacee*) e del peperoncino. L'insaccatura è realizzata con involucri naturali, approntati nella caratteristica forma a "U", ricavata tramite legatura con spago, o cilindrica



- ✓ L'impasto si presenta rosso vivo screziato di bianco, il sapore è sapido e mediamente piccante con spiccato aroma di coriandolo e con leggero retrogusto di affumicatura; il profumo è intenso
- ✓ Può essere venduta fresca o stagionata, affumicata o meno con legno di lentisco o mirto



# PECORINO DI PICINISCO "DOP" (REG.UE 1161/2013)

- ✓ Formaggio a latte e pasta cruda tipico della Valle di Comino (Fr) che comprende vari comuni (Picinisco, Atina, S. Donato Val Comino e Alvito...etc...)
- ✓ Il latte ovino di pecore di razza Sopravvissana, Comisana, Massese e loro come la Capra Grigia Ciociara, la Bianca Monticellana e la Capestrina
- ✓ In funzione del periodo di stagionatura si riconoscono due tipologie: "Scamosciato", stagionatura da 30 a 60 giorni e "Stagionato" stagionatura superiore i 3 mesi



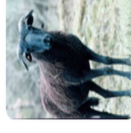
Valle di Comino



Sopravvissana



Comisana



Massese



Capestrina



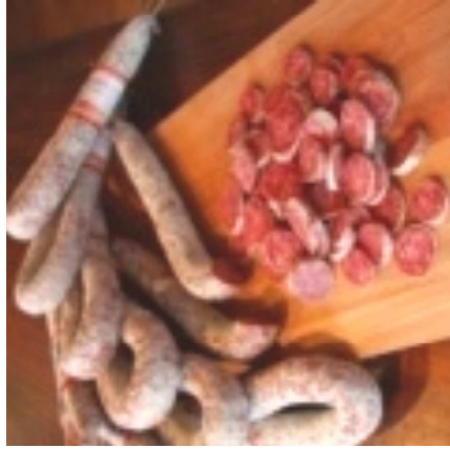
Bianca Monticellana



Capra Grigia Ciociara



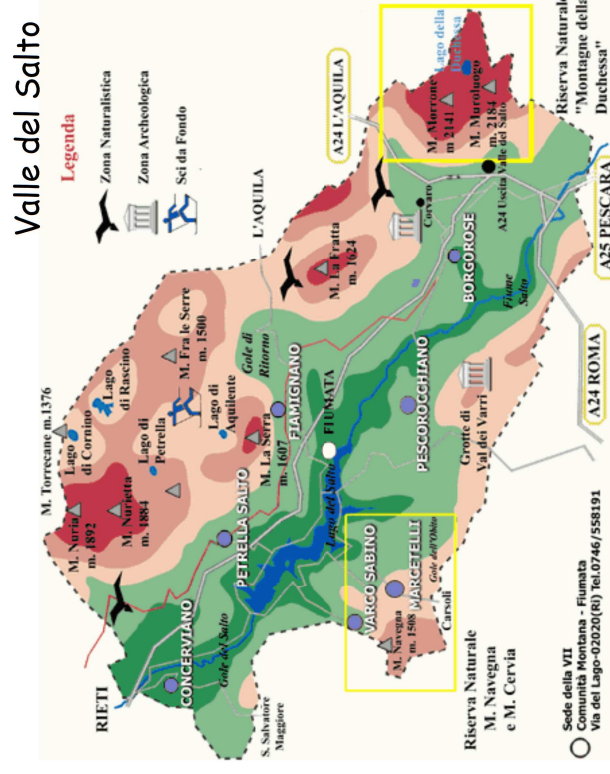




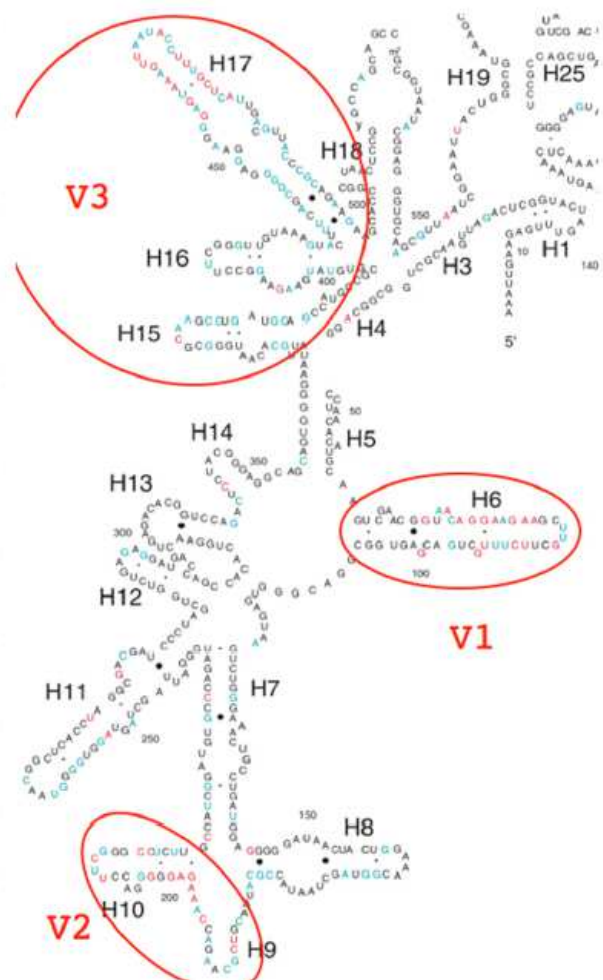
- ✓ La zona di produzione è circoscritta al territorio montuoso della provincia di Rieti, la Comunità Montana di Salto Cicolano, che comprende i comuni di Borgorose, Concerviano, Fiamignano, Marcellino, Pescorocchiano, Petrella Salto, Varco Sabino

- ✓ Insaccato di carne suina, di piccola taglia (peso max 400 g), asciutto e compatto, di colore rosso rubino, nel quale i granelli di grasso sono distribuiti in maniera uniforme. La stagionatura è superiore ad un mese

- ✓ Viene prodotta esclusivamente con carni suine selezionate, insaccata in budello naturale di suino e asciugata lentamente all'aria del "Parco Nazionale" dei Monti della Laga



# PRINCIPIO DEI METODI MOLECOLARI UTILIZZATI



Analisi delle regioni ipervariabili  
V1-V3 del gene per la molecola  
16S RNA ribosomiale (16S rRNA)



**CONSERVED REGIONS:** unspecific applications

**VARIABLE REGIONS:** group or species-specific applications

9 regioni ipervariabili all'interno della sequenza genica del 16S rRNA



## Molecola 16S rRNA

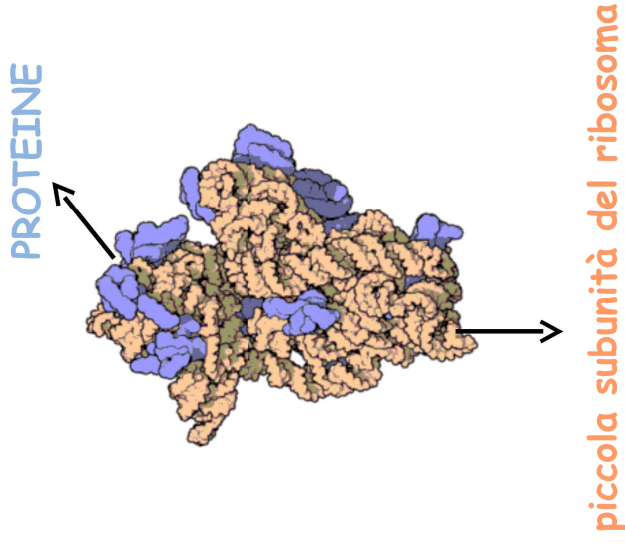
Elemento costitutivo, insieme alle proteine, dei ribosomi: organelli di circa 200Å, coinvolti nella sintesi proteica

- Procarioti (70S) 2 subunità:

- 30S: una molecola **16S rRNA**
- 50S: due molecole 5S e 23S rRNA

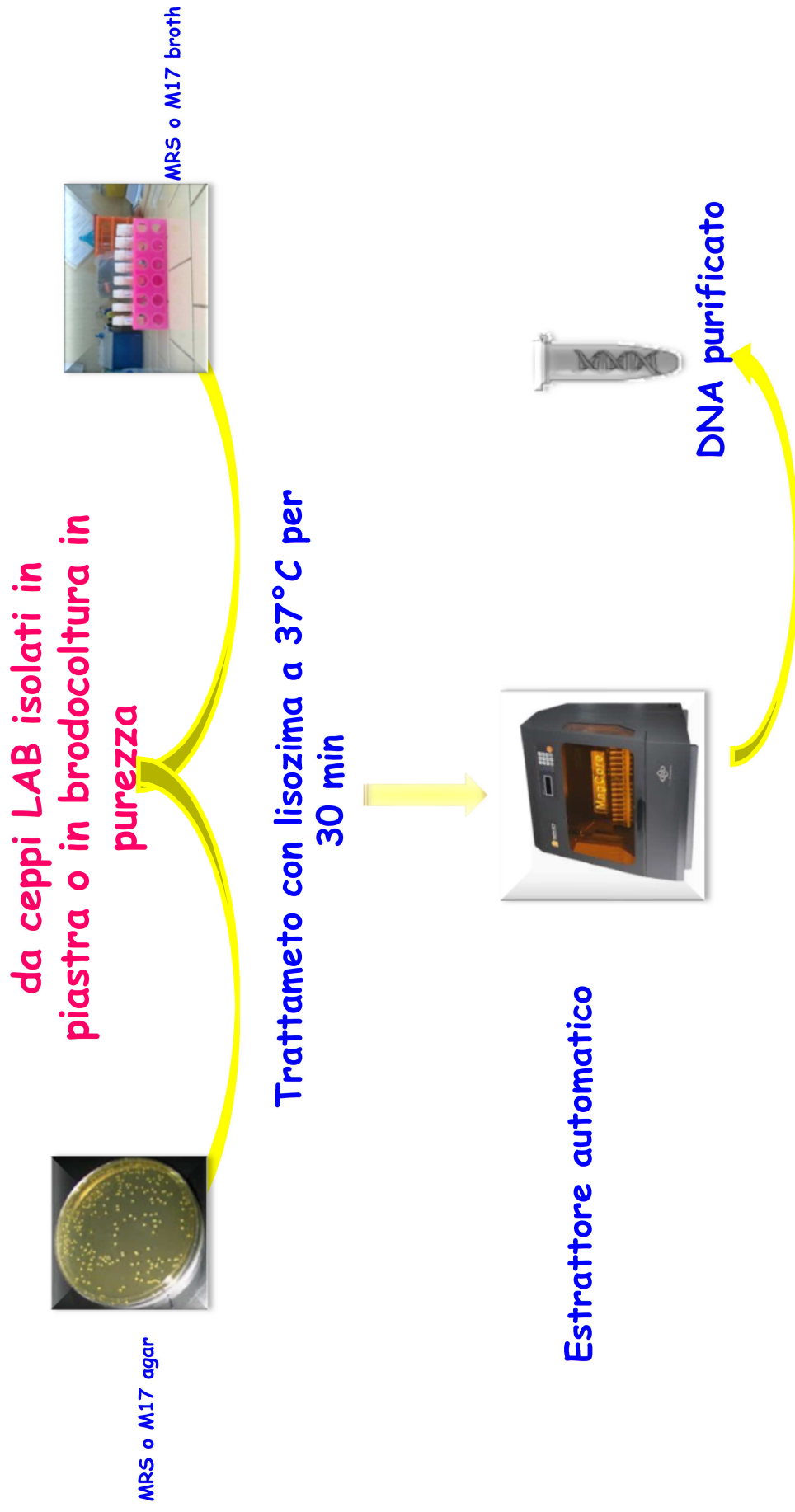
- Eucarioti (80S) 2 subunità:

- 40S: una molecola 18S rRNA.
- 60S: tre molecole 28S, 5.8S e 5S rRNA





# PURIFICAZIONE AC. NUCLEICI





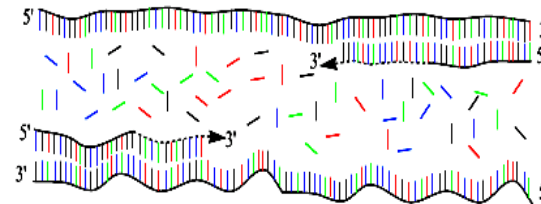
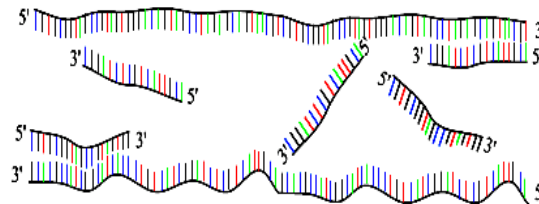
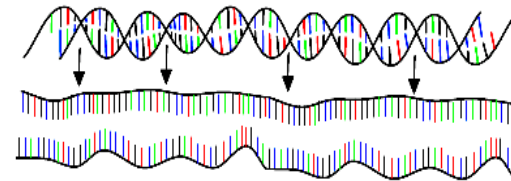
# PCR (Polymerase Chain Reaction)

[Mullis *et al.*, 1986; Mullis e Faloona, 1987]

Tutti i metodi utilizzati prevedono una fase di amplificazione *in vitro* di regioni specifiche del gene per la molecola 16S rRNA mediante PCR

## Analisi END-POINT

- ☐ RFLP/ARDRA
- ☐ DGGE
- ☐ MICROARRAY
- ☐ SEQUENZIAMENTO



## Analisi REAL-TIME

- ☐ HRM

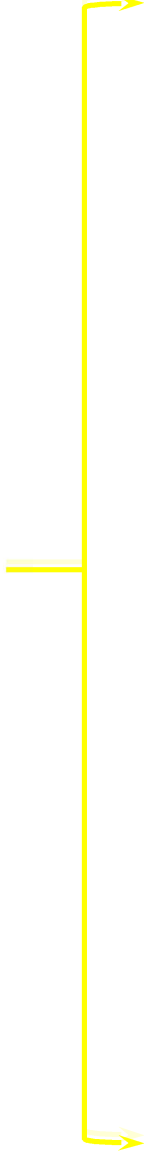


# METODI MOLECOLARI

- ✓ RFLP/ARDRA: Restriction fragment length polymorphism/Amplified ribosomal DNA restriction analysis
- ✓ DGGE: Denaturing gradient gel electrophoresis
- ✓ MICROARRAY: Microscopic glass array
- ✓ HRM analysis: High Resolution Melting analysis
- ✓ Sequenziamento genico: metodo Sanger



## Metodi utilizzati (1)



### DGE

Gel elettroforesi in gradiente  
di denaturazione

Separazione di frammenti di  
DNA in base alle loro  
differenti proprietà di  
dissociazione o "melting",  
sfruttando un diverso  
gradiente di concentrazione e  
di denaturazione in gel di  
poliacrilamide

Muyzer G, et al. 1993

### RFLP/ARDRA

Analisi di restrizione del  
DNA ribosomiale  
amplificato

Analisi di restrizione  
dei prodotti PCR  
mediante un pannello di  
enzimi di restrizione:  
*fokI*, *aluI* e *haeIII*

Young, J.P.W, et al. 1991

Aquilani L, et al. 2004

### SEQUENZIAMENTO

PCR e  
sequenziamento di  
frammenti  
amplificati mediante  
metodo Sanger ed  
elettroforesi  
capillare

F Sanger, et al 1977



## Metodi utilizzati (2)



### Microarray

Ibridazione fra una sonda  
marcata (molecular beacon) e  
sequenza complementare  
specificca di acido nucleico  
ignoto con generazione di un  
segnale misurabile

NP Gerry, NE Witowski, J Day, RP Hammer. 1999

### HRM

(High Resolution Melting)  
Permette di distinguere le  
differenze di sequenza del  
DNA attraverso lo studio  
della curva di melting in  
real time

Y Pang et al. 2011  
D. Porcellato et al. 2012





# PROBIOTICI



La ricerca dei microrganismi probiotici

"Microrganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità ( $\sim 10^9$  ucf), di esercitare funzioni benefiche per l'organismo"



<http://www.precisionnutrition.com/all-about-probiotics>

Guidelines on probiotics. Ministero della Salute, 2012  
Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. FAO-OMS, 2001



## CARATTERISTICHE

Provenienza  
intestinale

Possedere lo stato "QPS"  
presunzione qualificata di  
sicurezza (EFSA)

Sopravvivere attraverso il tratto  
gastro-intestinale

Attivi e vitali alle condizioni ambientali  
del tratto intestinale

Attività antagonista  
nei confronti di  
batteri patogeni

Stimolazione e modulazione  
del sistema infiammatorio  
intestinale (GALT)

Migliorare e stabilizzare la  
funzione della barriera intestinale

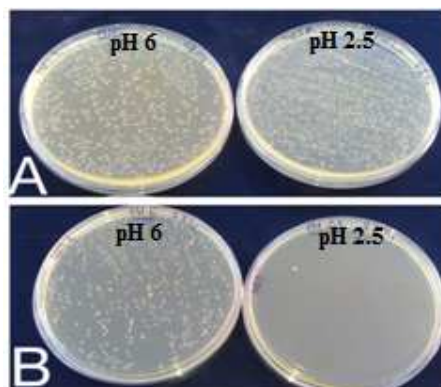
Colonizzare l'intestino



## ANALISI DI SCREENING

### TOLLERANZA AI BASSI pH

verifica la capacità dei lattobatteri di sopravvivere alle condizioni di pH acido 2,5 dello stomaco



### RESISTENZA AI SALI BILIARI

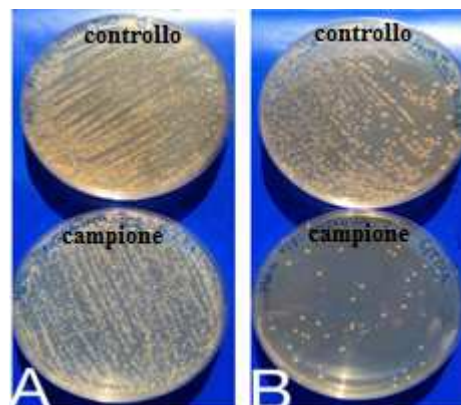
valuta la resistenza dei lattobatteri ai sali biliari secreti nell'intestino durante la digestione

### PROVA COMBINATA

valuta la resistenza dei lattobatteri attraverso il tratto gastro-intestinale in presenza dei Sali biliari dopo la pre-esposizione ai bassi valori di pH 2.5

### RESISTENZA ALLA PEPSINA E ALLA PANCREATINA

valuta la sopravvivenza dei lattobatteri all'azione degli enzimi proteolitici "pepsina e pancreatina" presenti nel tratto gastro-intestinale durante la digestione



verifica se i lattobatteri  
possiedono la capacità di  
autoaggregarsi



TEST DI AUTOAGGREGAZIONE



TEST DI  
COAGGREGAZIONE



ATTIVITÀ  
ANTIBATTERICA/  
PRODUZIONE DI  
BATTERIOCINE



verifica l'attività  
antibatterica dei  
lattobatteri dovuta  
alle batteriocine

valuta l'attività antimicrobica dei  
lattobatteri nei confronti di  
eventuali patogeni presenti nel  
tratto gastro-intestinale  
attraverso la formazione di  
aggregati batterici





## RISULTATI



### SALAMELLA CICOLANA (1)

Scopo: Isolare e purificare ceppi di LAB da utilizzare come starter in azienda

I LAB isolati sono stati identificati con due metodi:

- ✓ ARDRA per screening
- ✓ SEQUENZIAMENTO per conferma





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## RISULTATI

### SALAMELLA CICOLANA (2)



0 giorni	7 giorni	14 giorni	21 giorni	28 giorni
<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>	<i>Leuc. mesenteroides</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. curvatus</i>
<i>L. brevis</i>	<i>L. brevis</i>	-	-	-
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-
<i>Weissella sp.</i>	-	-	-	-
<i>S. thermophilus</i>	-	-	-	-
<i>L. graviae</i>	-	-	-	-



## PECORINO DI PICINISCO (1)

Scopo: Isolare e purificare ceppi di LAB per caratterizzare il prodotto  
Verificare la presenza di ceppi probiotici

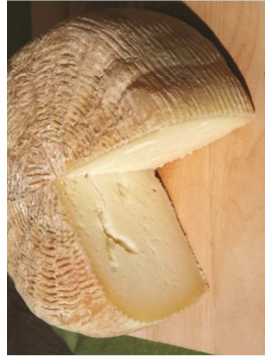
**I LAB isolati sono stati identificati con 4 metodi:**

- ✓ DGGE per screening
- ✓ MICROARRAY per screening
- ✓ HRM per conferma
- ✓ SEQUENZIAMENTO per conferma
  
- ✓ Prove di probioticità

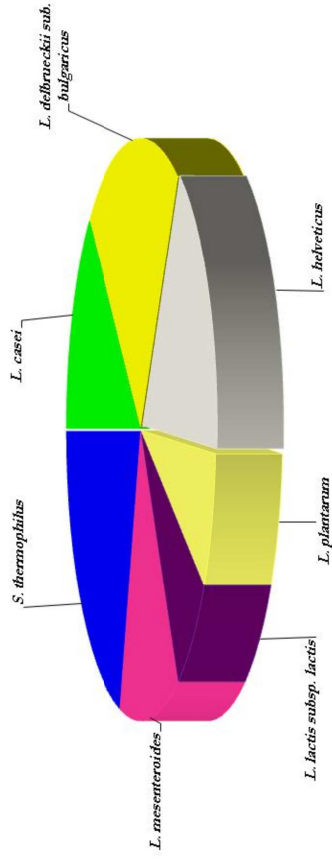
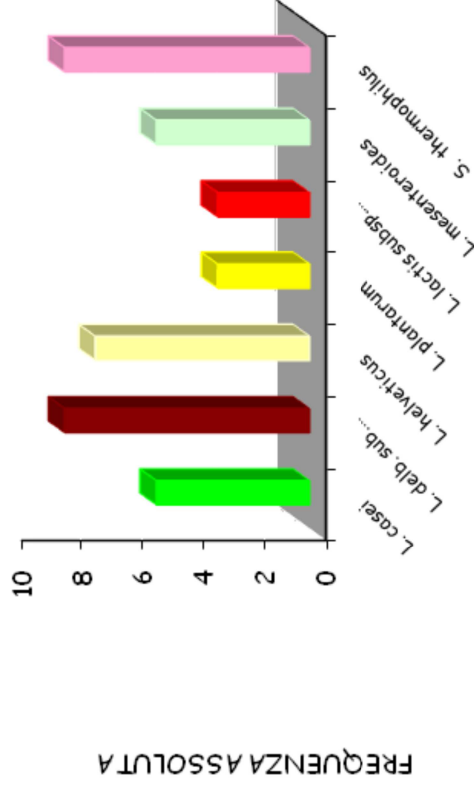


## PECORINO DI PICINISCO (2)

CEPPO	FREQ. ASSOLUTA	PERCENTUALE
<i>L. casei</i>	5	12,8
<i>L. delbrueckii. sub. bulgaricus</i>	8	20,5
<i>L. helveticus</i>	7	17,9
<i>L. plantarum</i>	3	7,7
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	3	7,7
<i>L. mesenteroides</i>	5	12,8
<i>S. thermophilus</i>	8	20,5



## RISULTATI





## SALSICCIA AL CORIANDOLO (1)

Scopo: Isolare e purificare ceppi di LAB per caratterizzare il prodotto

I LAB isolati sono stati identificati con 4 metodi:

- ✓ DGGE per screening
- ✓ MICROARRAY per screening
- ✓ HRM per conferma
- ✓ SEQUENZIAMENTO per conferma



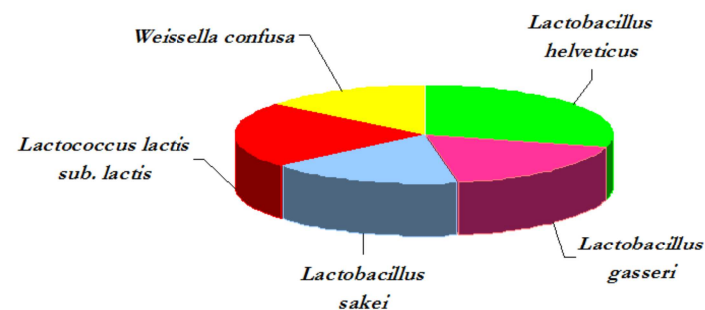


# RISULTATI

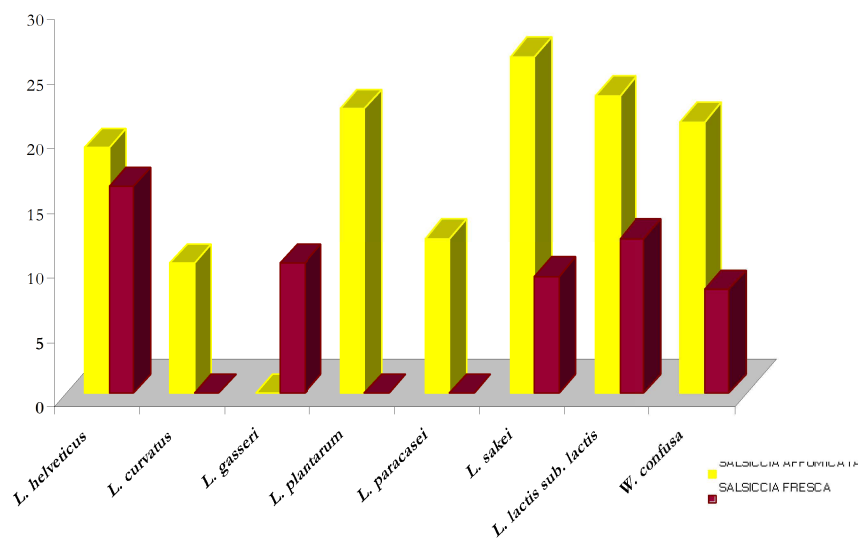
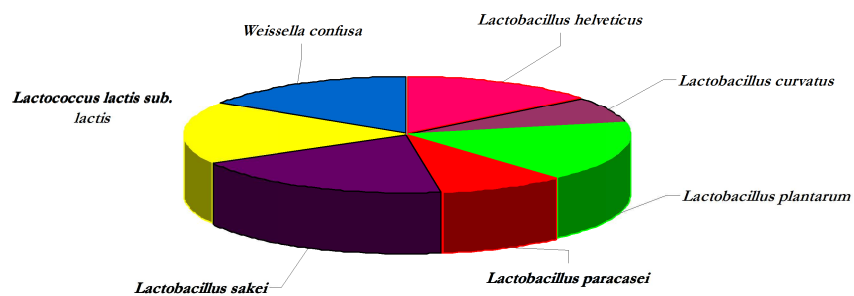
## SALSICCIA AL CORIANDOLO (2)

CEPPO	SALSICCIA AFFUMICATA		SALSICCIA FRESCA	
	F. ASSOLUTA	PERCENTUALE	F. ASSOLUTA	PERCENTUALE
<i>L. helveticus</i>	19	14,29	16	29,09
<i>L. curvatus</i>	10	7,52	-	-
<i>L. gasseri</i>	-	-	10	18,18
<i>L. plantarum</i>	22	16,54	-	-
<i>L. paracasei</i>	12	9,02	-	-
<i>L. sakei</i>	26	19,55	9	16,36
<i>Lactococcus lactis sub. lactis</i>	23	17,29	12	21,82
<i>W. confusa</i>	21	15,79	8	14,55

Fresca



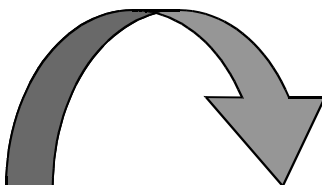
Affumicata



## 1) CEPPI PROBIOTICI ISOLATI: pecorino di Picinisco

### PROVE DI SCREENIG:

Tipo di prova	N° ceppi/totale
<i>Resistenza a pH 2.5</i>	33
<i>Resistenza ai sali biliari</i>	28
<i>Prova combinata pH/Sali biliari</i>	23
<i>Resistenza alla pepsina</i>	23
<i>Resistenza alla pancreatina</i>	27
<b><i>Totale ceppi</i></b>	<b>14</b>



### ANALISI SPECIFICHE:

Analisi	N° ceppi/14 tot
<i>Test autoaggregazione</i>	14
<i>Test di coaggregazione</i>	14
<i>Produzione di batteriocine/attività antibatterica</i>	4
<b><i>Totale ceppi candidati probiotici</i></b>	<b>4</b>

Rapporti ISTISAN (2012): Valutazione dell'attività antibatterica delle batteriocine nei confronti di patogeni alimentari. 54:28-34





## 2) CEPPI PROBIOTICI ISOLATI: pecorino di Picinisco

### Identificazione dei ceppi probiotici:

Identificazione	Ceppo n°	Metodo di conferma
<i>Lactococcus lactis sub. lactis</i>	2	DGGE-HRM-SEQUENZIAMENTO
<i>L. casei</i>	1	DGGE-HRM-SEQUENZIAMENTO
<i>Staphylococcus spp.</i>	1	DGGE-HRM-SEQUENZIAMENTO





### *Attività antibatterica: Spot-on-the-lawn per tutti i ceppi*

C. B. Lewus & T.J. Montville. 1991

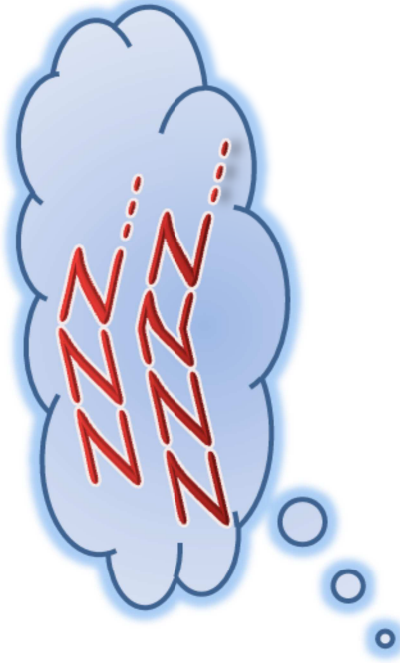
### *Produzione batteriocine: PCR end-point*

Ceppo	Caratteizzazione batteriocine	Metodo	Referenza
<i>Lactococcus lactis sub. lactis</i>	Nisina	PCR	B. Lakshminarayanan et al. 2012
<i>Lactococcus lactis sub. lactis</i>	Nisina	PCR	
<i>L. casei</i>	In corso	-	
<i>Staphylococcus spp.</i>	In corso	-	





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri



Grazie per l'attenzione...

