

## **Caratterizzazione metagenomica del formaggio ‘Gran Moravia’ (Brazzale) in corso di maturazione – Nota 1.**

Monica Bononi<sup>a,b</sup>, Fernando Tateo<sup>a,b</sup>, Piercristiano Brazzale<sup>b</sup>, Filippo Geuna<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Di.S.A.A. – UniMi

<sup>b</sup> BSC - Nutrition and Food Research Center

### **1. Introduzione e finalità dello studio**

I formaggi a pasta dura devono le loro caratteristiche chimico-fisiche quali e quantitative a fattori fondamentali quali: la qualità del latte crudo, le condizioni di allevamento delle bovine produttrici e le tecnologie di trasformazione. Un complesso insieme di specie microbiche di variabile origine e composizione ha tuttavia una sensibile influenza sulla la composizione microbica del prodotto maturato e come per qualsiasi alimento soggetto a fenomeni di natura fermentativa, la composizione del microbiota gioca un ruolo vitale nella trasformazione e maturazione del formaggio. I microrganismi presenti nel latte d’origine, insieme a quelli dei fermenti e dei contaminanti ambientali, condizionano i fenomeni biochimici che influenzano le caratteristiche del formaggio che finiscono per definirne la qualità. Il complesso microbiota del formaggio, e la sua attività enzimatica, guidano e modellano lungo il periodo destinato alla maturazione i processi enzimatici proteolitici, lipolitici e fermentativi che costituiscono il fenomeno definito globalmente come “maturazione” (da 7 a 24 mesi). La letteratura scientifica sui formaggi a pasta dura e simili è soggetta a continuo arricchimento, e in particolare negli ultimi tempi è supportata da tecniche di indagine molecolare d’avanguardia. Studi recenti si concentrano sull’attività di microrganismi utili (come i batteri lattici, LAB) riconoscendo comunque a quelli indesiderati (come i contaminanti clostridiali) una funzione non trascurabile.

La metagenomica si definisce come la tecnica che permette lo studio delle sequenze di DNA di comunità microbiche complesse a partire direttamente da campioni ambientali, senza necessità di impiego di lunghi tempi al fine di isolare e moltiplicare singoli microrganismi.

Questo approccio è particolarmente utile nell’analisi dei prodotti alimentari, inclusi i formaggi, per una serie di motivi:

1. **Possibilità di identificazione con alta efficienza dei microrganismi.** La metagenomica consente di identificare in un campione alimentare tutti i microrganismi presenti, compresi quelli di difficile coltivazione in laboratorio. La tecnica è fondamentale per accedere alla conoscenza della diversità microbica e delle specifiche dinamiche delle comunità microbiche che influenzano i processi di maturazione dei formaggi.
2. **Realizzare il monitoraggio della Qualità.** L'analisi metagenomica consente di monitorare la qualità dei prodotti alimentari durante tutto il processo di produzione e maturazione. Ciò permette anche l'identificazione di batteri nocivi e la loro gestione al fine di migliorare la shelf-life e sicurezza degli alimenti.
3. **Consentire la conoscenza delle possibili interazioni microbiche.** La metagenomica permette di comprendere le possibili interazioni che intervengono tra i diversi microrganismi presenti nei formaggi. Lo studio di queste interazioni è fondamentale per la comprensione dei processi di fermentazione e maturazione, in quanto sono tali processi a influenzare le caratteristiche nutrizionali, sensoriali e funzionali del formaggio.
4. **Intervenire nelle tecnologie di innovazione e ottimizzazione di prodotto.** Le informazioni ottenute attraverso la metagenomica possono essere utilizzate per migliorare e innovare i processi di produzione nel settore caseario. Attraverso l'identificazione e la selezione di specifici ceppi microbici, è possibile ottimizzare la qualità e le proprietà fisiche, chimiche e sensoriali dei prodotti di trasformazione nel dairy.

Inoltre, l'associazione di metodi metagenomici con aggiornati profili metabolici produce potenzialità analitica utile a dirimere problematiche complesse proprio in tema di maturazione dei formaggi. Trattasi in tal caso di "analisi combinata metagenomica-metabolica".

## 2. Metodologia

In questa nota si esplicita con un esempio, riferito a quattro aliquote di formaggio Gran Moravia, corrispondenti a quattro stadi di maturazione usate per l'estrazione del DNA genomico, un'applicazione di analisi metagenomica.

Le quattro aliquote corrispondono a distinte matrici interne di formaggio prodotto a Litovel e con stagionatura al momento del taglio-forma di ca 7 mesi, 13 mesi, 15 mesi e 21 mesi.

L'inizio del periodo di maturazione per le quattro distinte aliquote è quello qui indicato:

19-23.05.23 con taglio forma il 30.11.2023 e prodotto 01-05.05.23

19-2511.22 con taglio forma il 30.11.2023 e prodotto 01-07.11.22

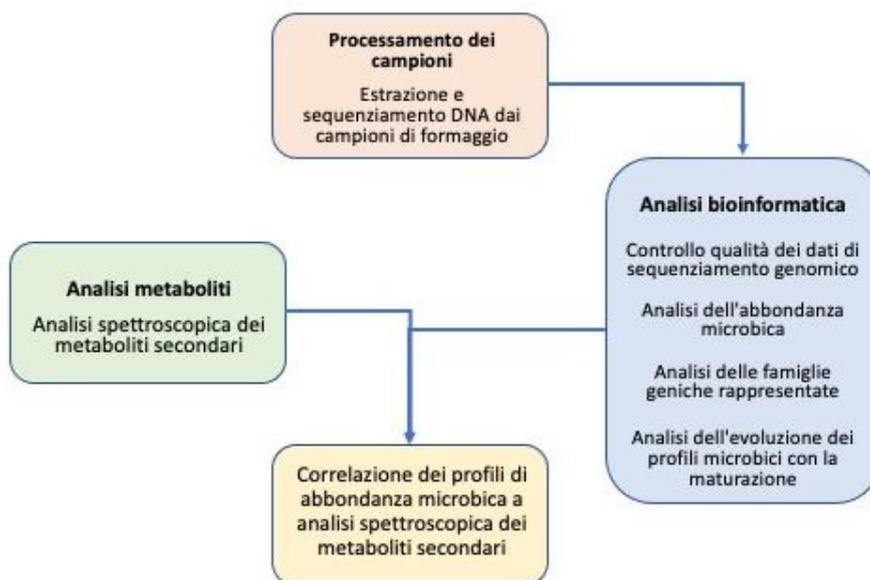
19-25.09.22 con taglio forma il 30.11.2023 e prodotto 01-07.09.22

19-29.03.22 con taglio forma il 30.11.2023 e prodotto 01-29.03.22

Il riferimento ai lotti di produzione è il seguente: CB, SE, OE, NE nell'ordine di 7, 13, 15, 21 mesi.

Le librerie di sequenziamento sono state prodotte su una piattaforma "Illumina" presso i *laboratori Macrogen (Corea del Sud)*.

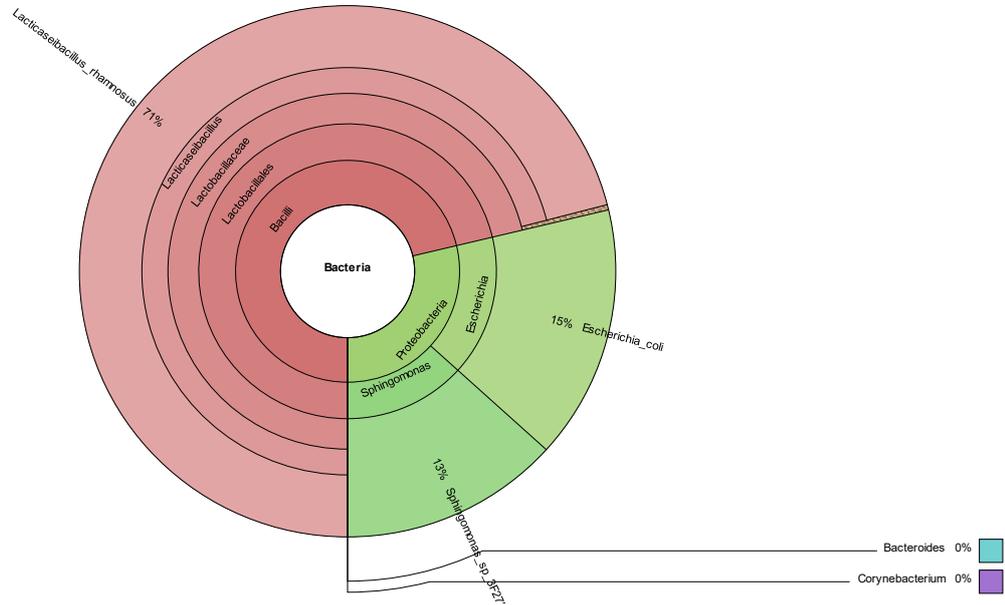
I dati di sequenza grezzi sono stati sottoposti a controllo di qualità seguito da analisi bioinformatica secondo lo schema di **Figura 1**.



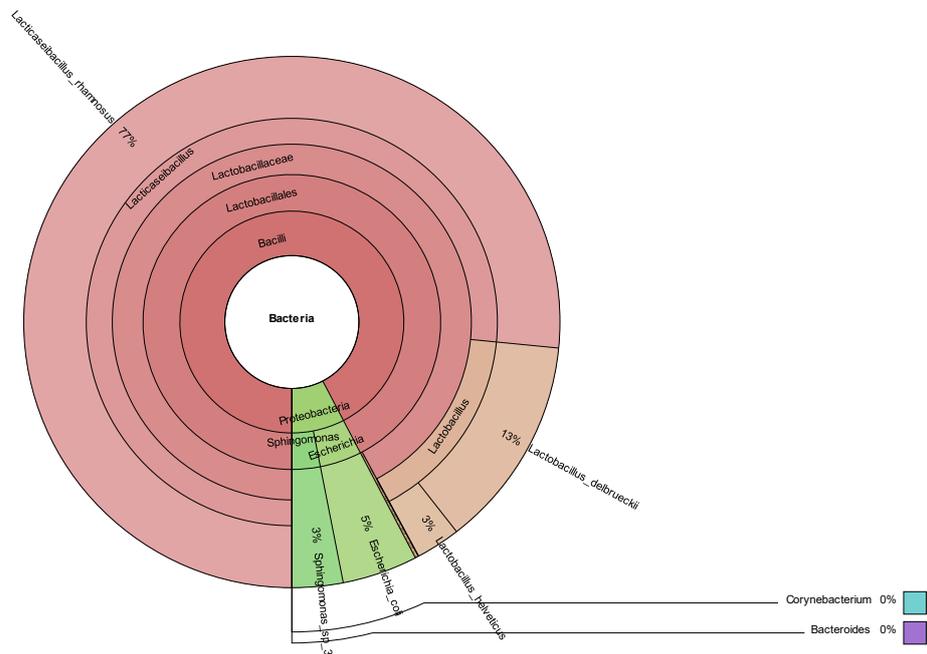
**Figura 1.** Schema analitico dai campioni di formaggio alla generazione di dati metagenomici.

In particolare, l'analisi bioinformatica ha permesso di studiare l'abbondanza e la diversità delle specie microbiche unitamente alle vie metaboliche e alle famiglie di geni più rappresentate.

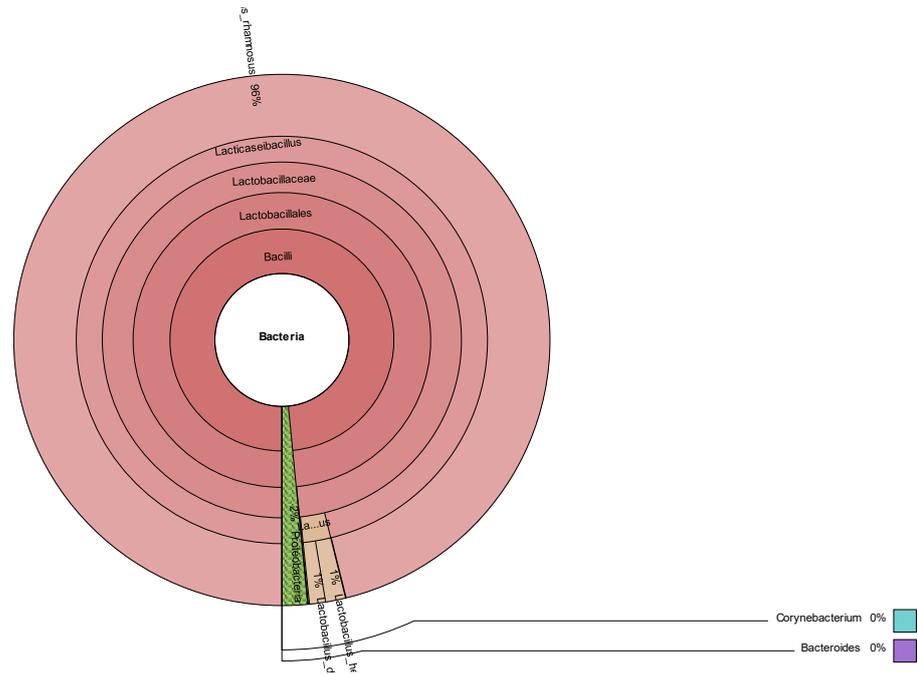
La complessità dei dati generati e dell'attività di data mining corrispondente può essere rappresentata solo parzialmente in modo grafico: a tal fine si può far riferimento, per esempio, all'istogramma dei profili tassonomici e ancor più all'abbondanza microbica relativa (**Figure 2-1, 2-2, 2-3 e 2-4**).



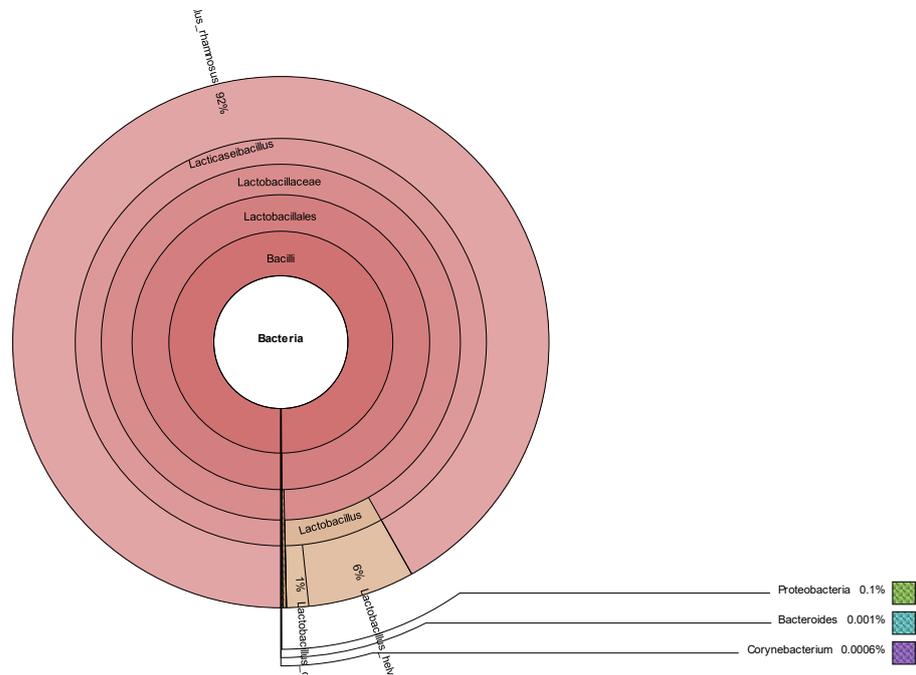
**Figura 2-1.**



**Figura 2-2.**



**Figura 2-3.**

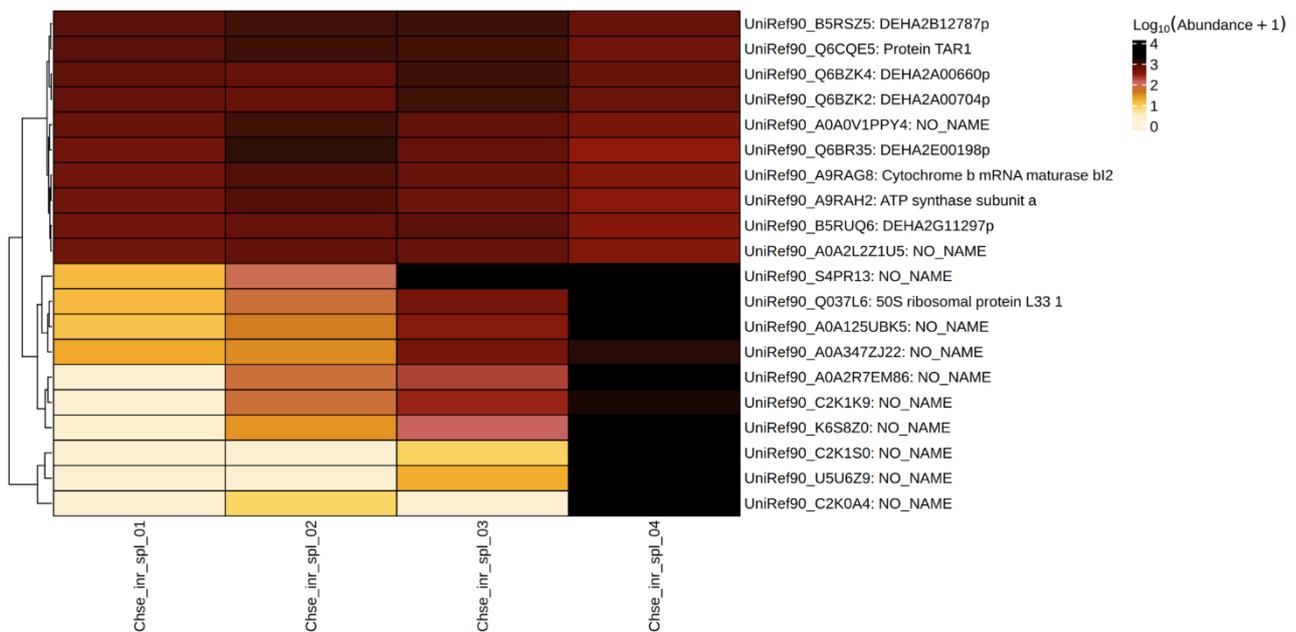


**Figura 2-4.**

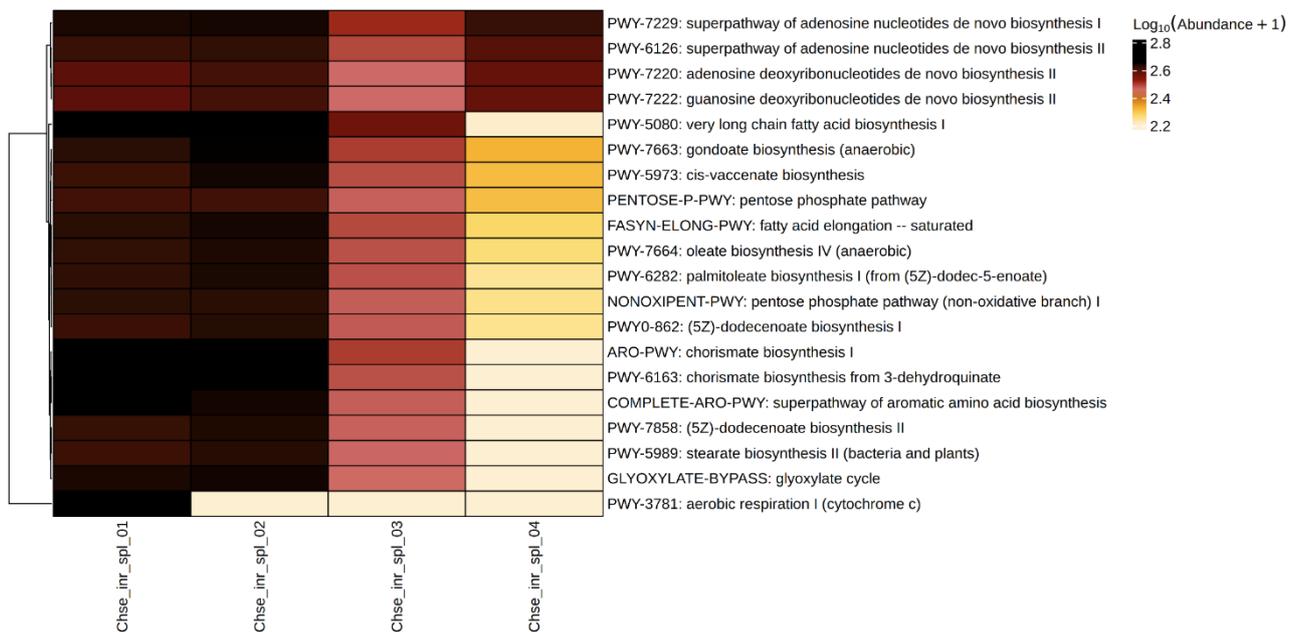
Di particolare importanza è la marcata riduzione dei generi *Staphylococcus* ed *Escherichia* che, pur essendo presenti nella prima fase di maturazione, riducono costantemente la loro concentrazione fino alla completa scomparsa nella terza e quarta fase. Al contrario, i generi *Lactocasebacillus* e *Lactobacillus* aumentano progressivamente la loro presenza nelle fasi avanzate di maturazione.

L'analisi funzionale ha consentito di stilare un elenco delle famiglie geniche più abbondanti lungo le fasi di maturazione (**Figura 3**), mentre un'analisi simile è stata effettuata per evidenziare le vie metaboliche più rappresentate durante le fasi di maturazione (**Figura 4**).

Le vie evidenziate nell'analisi possono essere correlate con le specie microbiche più rappresentate.



**Figura 3.** Profili funzionali per le 20 famiglie geniche più abbondanti.



**Figura 4.** Profili funzionali delle 20 vie più abbondanti.

## Bibliografia

- Gobbetti, M.; Fox, P.; Neviani, E. (Eds.) The most traditional and popular Italian cheeses. In *The Cheeses of Italy: Science and Technology*; Springer: Cham, Switzerland, 2018; pp. 99–267.
- Montel, M.C.; Buchin, S.; Mallet, A.; Delbes-Paus, C.; Vuitton, D.A.; Desmasures, N.; Berthier, F. Traditional cheeses: Rich and diverse microbiota with associated benefits. *Int. J. Food Microbiol.* 2014, 177, 136–154.
- Gatti, M.; Bottari, B.; Lazzi, C.; Neviani, E.; Mucchetti, G. Invited review: Microbial evolution in raw-milk, long-ripened cheeses produced using undefined natural whey starters. *J. Dairy Sci.* 2014, 97, 573–591.
- Neviani, E.; Bottari, B.; Lazzi, C.; Gatti, M. New developments in the study of the microbiota of raw-milk, long-ripened cheeses by molecular methods: The case of Grana Padano and Parmigiano Reggiano. *Front. Microbiol.* 2013, 4, 36.
- Quigley, L.; O’Sullivan, O.; Beresford, T.P.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Cotter, P.D. Molecular approaches to analyzing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 2011, 150, 81–94.

6. Ercolini, D. Secrets of the cheese microbiome. *Nature Foods* 2020, 1, 466–467.
7. Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*. 2015, 12, 59–60.
8. Caspi, R., et al. "The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes-a 2019 update." *Nucleic acids research*. 2020, 48, 445-453.



*Fioritura del glicine – Lab. FERL - Di.S.A.A. - UniMi*