

Produzione di tossine e polimorfismo del gene della coagulasi in *Staphylococcus aureus* isolati da prodotti lattiero caseari: relazione tra modelli genetici ed enterotossine

Morandi S^{1*}, Brasca M¹, Lodi R¹.....5-21

* *Corrispondenza ed estratti*: tel. + 39 02.50316685; fax + 39 02.50316687, stefano.morandi@ispa.cnr.it

¹ CNR Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari. Via Celoria 2, 20133 Milano.

RIASSUNTO - *Staphylococcus aureus* rappresenta una delle maggiori cause di intossicazione alimentare ed il latte ed i suoi derivati sono potenziali fonti di tossine prodotte da questo batterio. In questo lavoro 130 ceppi di *S. aureus* (122 isolati da prodotti lattiero caseari e 8 ceppi di origine clinica) sono stati testati per la produzione di tossina con il metodo dell'agglutinazione passiva inversa. La maggior parte dei ceppi enterotossigeni sono risultati produttori di SEA (44%) seguita da SED (33%), SEC (21%) e SEB (2%). Per valutare le relazioni genetiche fra ceppi produttori di tossina e ceppi non enterotossigeni è stato studiato il polimorfismo del gene della coagulasi (*coa*). Questa tecnica ha permesso di identificare 31 diversi *coa* subtypes 17 dei quali contenevano ceppi di *S. aureus* produttori di tossina; non è stata trovata alcuna relazione, invece, fra i subtypes individuati mediante RFLP ed il tipo di tossina prodotta.

Parole chiave: *Staphylococcus aureus*, enterotossine, polimorfismo gene coagulasi, RFLP

SUMMARY - *Enterotoxins production and coagulase gene polymorphism of staphylococcus aureus isolated from dairy products. relation between genetic types and enterotoxins*—*Staphylococcus aureus* is a known major cause of foodborne illnesses, and milk and dairy products are often contaminated by enterotoxigenic strains of this bacterium. We tested 130 *S. aureus* strains, 122 isolated from dairy products and 8 from human samples, for SE production, using the Reverse Passive Latex Agglutination method. Most of the enterotoxigenic strains produced SEA (44%), but also detected were SED (33%), SEC (21%) and SEB (2%). To explore the genetic relationship between enterotoxin producing isolates and non-enterotoxigenic strains, we carried out coagulase (*coa*) gene restriction fragments length polymorphism analysis (RFLP). We distinguished 6 different *coa* types. On the basis of the RFLP polymerase chain reaction 31 different *coa* subtypes were identified, and 17 of the RFLP profiles revealed enterotoxigenic *S. aureus* strains. On comparing the results, no link was found between the different *coa* RFLP subtypes and staphylococcal enterotoxins production.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, coagulase genotype, RFLP

Polimorfismo della caseina α_{s1} e qualità del latte della capra sarda

Vacca GM^{1*}, Carcangiu V¹, Dettori ML¹, Pazzola M¹, Mauriello R², Chianese L².....23-37

* *Corrispondenza ed estratti:* gmvacca@uniss.it

¹ Dipartimento di Biologia Animale, Università degli Studi di Sassari. Via Vienna 2, 07100 Sassari.

² Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli. Parco Gussone, 80055 Portici.

RIASSUNTO – La ricerca è stata condotta con lo scopo di valutare la frequenza allelica della α_{s1} -caseina e le eventuali correlazioni tra il genotipo e le produzioni quanti-qualitative del latte nella capra Sarda. Sono state utilizzate 600 capre appartenenti a 24 allevamenti dislocati in tre distinte aree della Sardegna: Centro (Zona 1), Costa Sud-Est (Zona 2) ed area Sud-Occidentale (Zona 3). I campioni individuali di latte sono stati raccolti nella fase intermedia della lattazione ed analizzati per percentuale di grasso, proteine e lattosio, pH e punto crioscopico, CCS e CMT. L'analisi del fenotipo α_{s1} -caseinico è stata effettuata mediante focalizzazione isoelettrica su strato ultrasottile (UTILIEF) seguita da immunoblotting con anticorpi policlonali specifici contro la α_{s1} -caseina. L'analisi statistica ha messo in evidenza significative differenze tra produzioni, qualità del latte e frequenze genotipiche in relazione alla zona di allevamento. Le frequenze genotipiche totali sono le seguenti: BB (63,3%), AB (20,0%), AA (9,0%), EF (3,2%), BF (2,2%), FF (0,7%), IF (0,7%), AE (0,3%), EE (0,3%) e EI (0,3%). I risultati dell'ANOVA hanno mostrato interessanti differenze tra i genotipi forti: in particolare, le produzioni significativamente più elevate ($P < 0,01$) sono risultate quelle dei soggetti con genotipo AB (> 1 kg/d) mentre i genotipi AB e BB hanno presentato, rispetto al genotipo AA, maggiori ($P < 0,01$) percentuali di grasso (5,51% e 5,47% *vs* 5,17%) e proteine (4,56% e 4,45% *vs* 4,20%). Il più basso tenore di lattosio ($P < 0,01$) è stato registrato nel genotipo BB (4,93%). I soggetti portatori degli alleli forti allo stato omozigote hanno mostrato rispetto ai restanti genotipi, maggiori percentuali ($P < 0,01$) di materia utile e minori valori ($P < 0,05$) di pH. Nessuna differenza nella produzione o nella composizione chimica del latte è emersa dal confronto tra i rimanenti genotipi. I risultati della presente ricerca dimostrano che il latte della capra Sarda è particolarmente adatto alla trasformazione casearia. All'interno di questa popolazione è possibile applicare strategie di selezione volte all'aumento delle produzioni senza trascurare gli aspetti qualitativi del latte.

Parole chiave: capra Sarda, latte, α_{s1} caseina.

ABSTRACT – *Polymorphism of α_{s1} casein and milk quality of Sarda goat.* – The research was carried out in order to evaluate α_{s1} -casein allele frequency and the possible correlations between its genotype and milk quanti-qualitative productions in Sarda goat. 600 Sarda goats were utilized, belonging from 24 flocks located in three distinct areas of Sardinia: Central (Zone 1), South-East Coast (Zone 2) and South-West area (Zone 3). The individual milk samples were collected during the middle stage of lactation and analysed for fat, protein and lactose percentage, pH value, cryoscopic index, SCC and TMC. The phenotype analysis of the α_{s1} -casein was carried out by ultra thin layer polyacrylamide gel isoelectric focusing (UTLIEF) and immunoblotting with specific polyclonal antibodies against α_{s1} -casein. The statistical analysis pointed out significant differences between milk yield, milk quality and genotype frequencies related to the breeding zone. The following genotype frequencies were detected: BB (63.3%), AB (20.0%), AA (9.0%), EF (3.2%), BF (2.2%), FF (0.7%), IF (0.7%), AE (0.3%), EE (0.3%) and EI (0.3%). Statistical analysis, performed by ANOVA, showed interesting differences between the strong genotypes: the significantly higher ($P < 0.01$) milk yield was among the subjects with AB genotypes (> 1 kg/day). The AB and BB genotypes displayed higher ($P < 0.01$) fat (5.51% and 5.47% *vs* 5.17%), higher protein values (4.56% and 4.45% *vs* 4.20%) than the AA genotype. The lower lactose content ($P < 0.01$) was registered in the BB genotype (4.93%). The subjects carrying the strong alleles at the homozygous state showed higher ($P < 0.01$) dry matter percentages and lower pH values ($P < 0.05$) than the other genotypes. No differences in milk production or chemical composition arose after the other genotypes comparison. The results of the present research show that milk from Sarda goat is particularly suitable for cheese making. It is possible to apply selection strategies within this population, directed to the improvement of productions not neglecting milk quality aspects.

Keywords: Sarda goat, milk, α_{s1} casein

IL CAGLIO IN PASTA: EFFETTI DELLE TECNICHE DI PREPARAZIONE SULL'ATTIVITÀ ENZIMATICA E RUOLO DELLA FRAZIONE LIPOLITICA

Carbone K^{1*}, Ferri B¹, Tripaldi C¹, Palocci G¹, Settineri D¹39-53

* *Corrispondenza ed estratti:* katya.carbone@entecra.it

¹ Consiglio per la ricerca e sperimentazione in agricoltura. Centro di ricerca per le produzioni delle carni ed il miglioramento genetico. Via Salaria 31, 00016 Roma.

RIASSUNTO – Il caglio in pasta è impiegato nella preparazione d'alcuni formaggi DOP e “tradizionali” per i quali questa pratica è resa obbligatoria dai disciplinari di produzione. In alcuni casi il caglio in pasta utilizzato è di produzione artigianale. I fattori che influenzano l'attività enzimatica di questi cagli, sono principalmente il tipo d'alimentazione dell'agnello e/o del capretto e l'intervallo tra allattamento e macellazione. Al riguardo, i dati della letteratura non sono sempre concordanti; tuttavia emerge che la procedura tradizionalmente più diffusa, vale a dire la produzione di caglio da abomasumi d'animali che si alimentano di solo latte e che sono macellati subito dopo la suzione, favorisce la produzione di caglioli aventi un ottimo contenuto in enzimi lipolitici, a fronte di una minor concentrazione di enzimi coagulanti, che però risulta compensata da una quantità in peso più elevata rispetto ai caglioli provenienti da agnelli digiuni. Le tecniche di preparazione del caglio in pasta artigianale, descritte dai vari autori o sperimentate, sono molteplici ed influenzano il corredo proteolitico e lipolitico. Inoltre, l'attività enzimatica del caglio in pasta commerciale risulta inferiore a quella del caglio artigianale. Nel lavoro sono trattate in dettaglio le caratteristiche delle lipasi pregastriche e gastriche. Le varie tecniche di produzione del caglio artigianale influenzano il profilo degli acidi grassi liberi del formaggio e la tecnica più tradizionale favorisce il contenuto di acidi grassi liberi a corta catena. Dalla rassegna emerge chiaramente come la frazione lipolitica presente nel caglio in pasta sia estremamente importante nel determinare le caratteristiche sensoriali tipiche dei formaggi. I dati riportati in letteratura sono però spesso difficilmente confrontabili tra loro e si rendono necessari maggiori approfondimenti sia per determinare quali e quante siano le forme lipolitiche che conferiscono determinate proprietà ai caglioli, sia per comprendere come sia possibile modulare l'attività di tali enzimi mediante le pratiche utilizzate per la preparazione dei cagli.

Parole chiave: caglio in pasta artigianale, formaggi tipici, lipolisi

ABSTRACT – *The rennet paste: the effects of the production techniques on the enzymatic activity and the role of the lipolytic fraction.* – Rennet paste is required by the production protocols of some traditional cheeses that are or/not marked as DOP (Protected Origin Denomination). Curd paste is, sometimes, a farm product. Enzymatic activity of artisanal rennet paste is quite strictly conditioned by lamb or kid diets and by the distance from the last suckling and the slaughtering. Literature data result often contradictory, however the most common practice, that utilises abomasums full of milk and slaughtered immediately after suckling, is considered the procedure that enhance lipolytic enzyme content and depress coagulating enzyme concentration; this scarcity is balanced by the higher abomasums weights if compared with those coming out from fast lambs. Manufacture techniques of traditional rennet pastes, described by various authors, are numerous and influence the proteolytic e lipolytic profiles; moreover enzymatic activity result lower in the commercial product than in the handicraft pastes. In this paper pregastric and gastric lipase characteristics are described in detail. The different production techniques influenced free fatty acid profile of the derived cheese and the traditional technique enhances short-chain free fatty acid content. From cited literature it clearly arises that curd lipolytic fraction plays an important role to determine typical sensorial characteristics of the derived cheeses; however the different experimental data result very difficult to compare one another. This determines the necessity to deeply study the different lipase forms and the amounts that naturally are present in rennet pastes; this examine will lead how to modulate enzyme activities by the right practices on rennet treatments and preparation.

Keywords: artisanal rennet paste, typical cheeses, lipolysis

INFLUENZA DELLE TEMPERATURE DI STAGIONATURA SULL'EVOLUZIONE DELLA MATURAZIONE, SUL PROFILO AROMATICO E SULLE CARATTERISTICHE SENSORIALI DEL FORMAGGIO MONTASIO

Innocente N^{1*}, Biasutti ML¹55-70

* *Corrispondenza ed estratti*: tel. 0432 590771; fax 0432 590719; nadia.innocente@uniud.it

¹ Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine. Via Marangoni 97, 33100 Udine.

RIASSUNTO – Il formaggio Montasio è talvolta soggetto a fenomeni di gonfiore tardivo dovuto a microrganismi sporigeni anticaseari come i *Clostridium butyricum* e *tyrobutyricum*. Precedenti studi hanno dimostrato che una conservazione di almeno 15 giorni a 5 °C all'inizio della stagionatura è sufficiente a contenere fermentazioni anomale da clostridi, senza ricorrere all'uso del lisozima. Tuttavia questo accorgimento tecnologico determina un netto rallentamento di tutti i fenomeni che avvengono nel corso della maturazione. Questo studio mette in evidenza come sia possibile superare questo problema aumentando di qualche grado la temperatura nelle fasi più avanzate della stagionatura. Campioni di formaggio Montasio mantenuti a 5 °C per 15 giorni e poi portati a 10-12 °C presentano un coefficiente di maturazione, un profilo della componente volatile e delle caratteristiche sensoriali del tutto confrontabili con campioni di riferimento mantenuti per tutto il periodo della stagionatura a 8 °C.

Parole chiave: proteolisi, aroma, temperatura.

ABSTRACT – *Effect of ripening temperature on maturation trend, flavour profile and sensorial characteristics of Montasio cheese.* – The late blowing defect caused by sporigenes anti-dairy germs as *Clostridium butyricum* and *tyrobutyricum* is sometimes present in Montasio cheese. Previous studies demonstrated that conditioning cheese for 15 days at 5 °C in the early stage of the ripening is sufficient to control defects caused by clostridia, without using lysozyme. Nevertheless it causes all the biochemical processes associated with the maturation to slow down. This study demonstrated that is sufficient to increase temperature for the rest of the ripening period to overtake this problem. Montasio cheese samples stored at 5 °C for 15 days and then ripened at 10-12 °C presented a maturation coefficient, a volatile profile and sensorial characteristics similar to the cheese samples maintained at the traditional ripening temperature of 8 °C for the entire ripening period.

Keywords: proteolysis, aroma compound, temperature

Innocente *et* Biasutti (2008) *Sci Tecn Latt-Cas*, 59 (1), 55-70

ANALISI *IN SILICO* DELLE SEQUENZE CASEINICHE CAPRINE

Chessa S^{1*}, Chiatti F¹, Rignanese D¹, Ceriotti G¹, Caroli AM², Pagnacco G¹.....71-79

* *Corrispondenza ed estratti:* stefania.chessa@unimi.it

¹ Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano. Via Trentacoste 2, 20134 Milano.

² Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie. Viale Europa 11, 25123 Brescia.

RIASSUNTO – Le lattoproteine rivestono particolare interesse sotto diversi aspetti. Dal punto di vista dell'alimentazione umana, esse sono, da una parte, responsabili di allergie, d'altra parte contengono nella propria sequenza alcuni peptidi con particolari funzioni biologiche. Il presente lavoro ha utilizzato un approccio *in silico* per individuare nelle lattoproteine caprine la presenza di biopeptidi e di epitopi la cui attività sia già stata valutata nella specie bovina, con particolare attenzione alla presenza di polimorfismo genetico. Tra i biopeptidi in comune con il latte bovino, 9 hanno attività oppioide, 5 sono trasportatori di minerali, 21 hanno funzione antiipertensiva, 3 sono antitrombotici e i rimanenti 6 sono immunomodulatori. Differenze nella sequenza amminoacidica sono state osservate in 7 varianti genetiche. Il confronto degli epitopi ha riguardato la α_{s1} -caseina, codificata dal gene *CSN1S1*. A parte due epitopi, il 5° (YPSGAWYYVPLGTQY) e il 1° minore (ELSKDIGSES), per cui non c'è differenza tra *CSN1S1* bovina e caprina, si osservano numerose differenze, sia tra gli epitopi delle due specie, sia tra i differenti alleli di *CSN1S1* caprina.

Parole chiave: caseine, peptidi bioattivi, nutrizione umana, polimorfismo genetico

ABSTRACT – *In silico analysis of goat casein sequences.* – Milk proteins are of particular interest under different aspects. From the point of view of human nutrition, they are both responsible for allergies and carriers of peptides with particular biological functions. An *in silico* approach was used in the present work, in order to find biopeptides and IgE-binding epitopes already identified in the bovine species within the goat casein sequences, with particular attention to the occurrence of genetic polymorphism. Out of the biopeptides shared with bovine milk, 9 show opioide activity, 5 are mineral carriers, 21 show hypotensive activity, 3 are antithrombotic, and 6 are immunomodulator peptides. Differences in the amino acid sequence were found in 7 genetic variants. The epitopes analysis was carried out for α_{s1} -casein, coded by *CSN1S1* gene. A part for the 5° (YPSGAWYYVPLGTQY) and the 1st minor (ELSKDIGSES) epitopes, for which no variation occurred between bovine and goat *CSN1S1*, several differences were found both between the two species and among goat *CSN1S1* alleles.

Keywords: casein, biopeptides, human nutrition, genetic polymorphism.

Chessa *et al* (2008) *Sci Tec Latt-Cas*, 59 (1), 71-79