



RELAZIONE SCIENTIFICA

Assegno di Ricerca (AdR 2248/15)

<i>Nome e Cognome del Beneficiario</i>	Sara Quarella
<i>Titolo del Programma di Ricerca</i>	Caratterizzazione genomica e sviluppo di metodiche molecolari per la tracciabilità di microrganismi di interesse agro-industriale
<i>Settore Scientifico Disciplinare di riferimento</i>	AGR/16 MICROBIOLOGIA AGRARIA
<i>Nome e Cognome del Responsabile Scientifico</i>	Prof.ssa Giovanna Felis
<i>Durata dell'Assegno di Ricerca (da...a...)</i>	1 giugno 2015 – 31 maggio 2016
<i>Periodo di riferimento della relazione (da...a...)</i>	1 giugno 2015 – 31 maggio 2016
<i>Note</i> (es.: eventuali periodi di sospensione dell'Assegno, ecc.)	Subentrata come beneficiario del presente assegno, dopo la rinuncia del precedente titolare, a decorrere dal 01/06/2015



DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA (*presupposti/obiettivi, metodologie applicate, risultati intermedi raggiunti, discussione*)

Introduzione:

In campo alimentare, il lievito lattico *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399® è stato recentemente incluso nella lista QPS (*Qualified Presumption of Safety*) dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA, *European Food Safety Authority*) ed è già presente sul mercato, sia italiano che internazionale, addizionato a prodotti per l'alimentazione umana e animale. Il ceppo B0399®, proprietà dell'azienda Laboratori Turval s.r.l., mostra, infatti, attività probiotiche collegate, in particolare, alla sua capacità di sopravvivere al transito intestinale e di mantenere l'attività fermentativa anche dopo il consumo o in seguito a terapia antibiotica (Maccaferri *et al.*, 2012).

Nonostante l'importanza commerciale del ceppo in questione, ad oggi non sono disponibili sistemi rapidi di tracciabilità e verifica della vitalità.

Obiettivi:

Con queste premesse, è stato proposto un progetto, finanziato nell'ambito del bando *Joint Projects* 2014 dell'Università degli Studi di Verona con l'acronimo "FORTIS-Klu", in partenariato con l'azienda Laboratori Turval s.r.l.

Lo scopo della ricerca è stato lo sviluppo di due metodiche molecolari, una per la caratterizzazione del ceppo B0399®, e l'altra per la quantificazione delle cellule vitali, da utilizzare nelle diverse fasi del controllo qualità del processo produttivo e durante il periodo di *shelf-life* del prodotto.

Inoltre, per comprendere meglio le caratteristiche biologiche di B0399® e per ampliare le conoscenze sulla biodiversità interna alla specie *K. marxianus*, obiettivo di questo progetto è stato anche quello di sequenziare *de novo* il genoma del lievito probiotico. Analisi di genomica comparativa potranno infatti rendere possibile l'identificazione di regioni uniche o *loci* iper-variabili, possibili *target* per lo sviluppo delle suddette metodiche di autenticazione e di quantificazione.



Risultati:

Per poter procedere con l'analisi molecolare, è stato di primaria importanza l'allestimento di una collezione di ceppi di riferimento, da utilizzare per la validazione delle metodiche messe a punto. Si è scelto di mettere insieme una collezione sufficientemente ampia, per garantire l'attendibilità dell'analisi, e costituita da ceppi filogeneticamente correlati, e perciò potenzialmente molto simili, a quello di interesse. Oltre al ceppo B0399[®], sono stati selezionati, quindi, altri 22 ceppi: 20 appartenenti alla specie *K. marxianus* isolati da diverse matrici con differente origine geografica (acquistati presso le collezioni BCCM/MUCL di Louvain, Belgio e DBVPG di Perugia, Italia o presenti nella collezione del laboratorio di Microbiologia degli alimenti) e 2 corrispondenti ai *type strain* delle specie correlate *K. lactis* e *K. dobzhanskii*. La varietà di ceppi contenuti nella collezione sembra essere in grado di simulare efficacemente la biodiversità tipica della specie *K. marxianus*.

È stato effettuato il sequenziamento del genoma di B0399[®] presso IGA Technology Services S.r.l. (Udine) (Quarella *et al.*, 2016a). In particolare, per rilevare possibili regioni candidate alla messa a punto dei protocolli di identificazione ceppo-specifica e di quantificazione, sono state analizzate le sequenze uniche di B0399[®] originate dal confronto in BlastN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) del genoma assemblato contro un *database* composto dai genomi degli altri 8 ceppi di *Kluyveromyces* disponibili *on line* (*K. aestuarii* ATCC 18862, *K. dobzhanskii* CBS 2104, *K. lactis* NRRL Y-1140, *K. marxianus* DMB1, *K. marxianus* DMKU3-1042, *K. marxianus* KCTC 17555, *K. marxianus* NBRC 1777, *K. wickerhamii* UCD 54-210) (<https://gold.jgi.doe.gov/>).

Nonostante l'individuazione di una regione di circa 10 kbp che, *in silico*, risultava esclusiva del ceppo di interesse, nessuna delle coppie di *primer* disegnate sulla regione stessa, una volta testate sulla collezione di *Kluyveromyces* allestita, si è dimostrata effettivamente in grado di distinguere il ceppo B0399[®] dagli altri di origine lattiero-casearia, non rappresentati in database. Ciò ha messo in luce la validità della collezione di riferimento ma, soprattutto, ha evidenziato le difficoltà nell'effettuare, ad oggi, approfondite analisi di genomica comparativa sulle sequenze assemblate, visto il numero esiguo di genomi completi, appartenenti alla



specie, presenti in *database*. B0399[®] costituisce, infatti, il primo ceppo della specie, isolato da matrice lattiero-casearia, ad essere sequenziato.

Non avendo ottenuto una coppia di *primer* ceppo-specifica, la messa a punto della metodica di identificazione del ceppo si è focalizzata sull'analisi di diversi protocolli di *fingerprinting* molecolare, per individuare quello in grado di restituire un profilo unico e caratteristico di B0399[®]. Sono stati testati diversi *primer* disponibili in letteratura, caratterizzati da differente capacità discriminante, già utilizzati per la caratterizzazione di altri ceppi di *K. marxianus*: RAPD-PCR con *primer* M13 (Huey & Hall, 1989), REP-PCR sui microsatelliti con *primer* (GAC)₅ (Caruso *et al.*, 2002) e (GACAC)₃ (Freeman & Katan, 1997), e Inter-LTR PCR sui retrotrasposoni con *primer* KM1-KM2 (Sohier *et al.*, 2009).

Tra tutte, la metodica di *fingerprinting* Inter-LTR PCR (Sohier *et al.*, 2009), basata sull'amplificazione di regioni trasponibili, si è rivelata la tecnica che ha separato più efficacemente i ceppi della collezione, fornendo un profilo unico per B0399[®], in grado di distinguerlo da tutti gli altri ceppi della collezione analizzata.

L'ultima parte del lavoro si è focalizzata sulla messa a punto di una PCR quantitativa (qPCR) in grado di amplificare selettivamente le cellule vitali di lievito, grazie all'associazione con l'intercalante propidio monoazide (PMA), molecola in grado di penetrare la parete delle cellule danneggiate e di prevenire l'amplificazione del DNA in esse contenuto (Andorrà *et al.*, 2010). Una volta estratto il DNA dalle cellule trattate con l'intercalante, ne è stata effettuata l'amplificazione mediante qPCR. In assenza di una coppia ceppo-specifica, è stata selezionata una coppia di *primer* già disponibile in letteratura, disegnata sulla sequenza del gene costitutivo dell'actina di *K. marxianus* (Bleve *et al.*, 2003).

Diverse fasi di ottimizzazione hanno permesso di definire le migliori condizioni di qPCR e la quantità di PMA più adeguata al trattamento, per garantire la corretta quantificazione delle cellule vitali del ceppo B0399[®] in preparati commerciali di liofilizzato *Active Dry Yeast* (Quarella *et al.*, 2016b).

In un secondo momento, è stato testato un ulteriore utilizzo della metodica per la



quantificazione dello stesso ceppo in una matrice alimentare complessa come lo yogurt. I risultati ottenuti, tuttavia, hanno mostrato che non è possibile stimare con precisione le concentrazioni di probiotico nella matrice, principalmente a causa dei limiti di *detection* della tecnica in relazione alla quantità di lievito normalmente inserita nei prodotti commerciali.

Conclusioni:

Le metodiche ottimizzate in questo lavoro hanno permesso, in primo luogo, di ottenere una procedura molecolare per la valutazione dell'autenticità e della tracciabilità del lievito lattico B0399® basata sull'amplificazione di regioni associate a retrotrasposoni.

In secondo luogo, è stato possibile ottenere un protocollo facilmente applicabile per la rapida quantificazione di tutti i ceppi appartenenti alla specie *K. marxianus*, più efficiente e riproducibile rispetto alle tecniche convenzionali basate sulla conta cellulare in piastra o al microscopio. Questo risultato fornisce un utile strumento per il monitoraggio del processo produttivo e per il controllo qualità dei liofilizzati industriali, sia lungo la linea di produzione che durante il periodo di conservazione.

Prospettive:

Nel prossimo futuro sarà di primaria importanza l'ampliamento del numero di genomi completi, presenti in *database*, appartenenti a ceppi di *K. marxianus* di origine lattiero-casearia. Ciò permetterà di effettuare uno studio più approfondito del genoma del ceppo B0399®, per la messa a punto di un saggio ceppo-specifico che possa essere impiegato per la valutazione contemporanea della sua vitalità e autenticità, riducendo ulteriormente i tempi e i costi di analisi per l'azienda.

Referenze:

Andorrà I., Esteve-Zarzoso B., Guillamón J.M., Mas A. (2010). Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int J of Food Microbiol.* **144**, 257-262.

Bleve G., Rizzotti L., Dellaglio F., Torriani S. (2003). Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts



and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Appl Environ Microb.* **69**, 4116-4122.

Caruso M., Capece A., Salzano G., Romano P. (2002). Typing of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* strains from Aglianico wine. *Lett Appl Microbiol.* **34**, 323-328.

Freeman S. & Katan T. (1997). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. *Phytopathology.* **87**, 516-521.

Huey B. & Hall J. (1989). Hypervariable DNA Fingerprinting in *Escherichia coli*: Minisatellite Probe from Bacteriophage M13. *J bacteriol.* **171**, 2528-2532.

Maccaferri S., Klinder A., Brigidi P., Cavina .P, Costabile A. (2012). Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Appl Environ Microbiol.* **78**, 956-964.

Quarella S., Lovrovich P., Scalabrin S., Campedelli I., Backovic A., Gatto V., Torriani S., Cattonaro F., Turello A., Felis G.E. (2016a). Draft genome sequence of the lactic yeast *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. Poster presented at 25th International ICFMH Conference FoodMicro 2016.

Quarella S., Lovrovich P., Gatto V., Backovic A., Torriani S., Turello A., Felis G.E. (2016b). Use of propidium monoazide-qPCR for the enumeration of viable *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399 in dry yeast products. Poster presented at 25th International ICFMH Conference FoodMicro 2016.

Sohier D., Le Dizes A.S., Thuault D., Neuveglise C., Coton E., Casaregola S. (2009). Important genetic diversity revealed by inter-LTR PCR fingerprinting of *Kluyveromyces marxianus* and *Debaryomyces hansenii* strains from French traditional cheeses. *Dairy Sci. Technol.* **89**, 569-581.

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO (eventuale)



Nessuna attività di ricerca svolta all'estero

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ SVOLTA NELL'AMBITO DEL DOTTORATO DI RICERCA (eventuale)

Nessuna attività svolta nell'ambito del dottorato di ricerca

DESCRIZIONE DELL'ATTIVITÀ DIDATTICA COLLEGATA (eventuale)

Attività di tutoraggio di un tesista magistrale laureando in Biotecnologie Agro-Alimentari (Marco Squassoni – Laurea 10 marzo 2016 – anno accademico 2014-2015)

SEMINARI/CONFERENZE TENUTI

Nessun seminario/conferenza tenuto

RISULTATI DELLA RICERCA (pubblicazioni, rapporti, brevetti, etc.)

Articoli:

Quarella S, Lovrovich P, Scalabrin S, Campedelli I, Backovic A, Gatto V, Torriani S, Cattonaro F, Turello A, Felis GE (2016). Draft genome sequence of the probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. *Genome Announcements*. In preparazione.

Poster:

Quarella S, Lovrovich P, Gatto V, Backovic A, Torriani S, Turello A, Felis GE (2016). Use of propidium monoazide-qPCR for the enumeration of viable *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399 in dry yeast products. Poster accettato per la presentazione al 25th International



ICFMH Conference FoodMicro 2016 – Dublin, Ireland 19-22 luglio 2016.

Quarella S, Lovrovich P, Scalabrin S, Campedelli I, Backovic A, Gatto V, Torriani S, Cattonaro F, Turello A, Felis GE (2016). Draft genome sequence of the lactic yeast *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. Poster presented at 25th International ICFMH Conference FoodMicro 2016. Poster accettato per la presentazione al 25th International ICFMH Conference FoodMicro 2016 – Dublin, Ireland 19-22 luglio 2016.

Tesi di Laurea Magistrale in Biotecnologie Agro-Alimentari:

Squassoni M (2016). Valutazione della vitalità e dell'autenticità del lievito lattico probiotico *Kluyveromyces marxianus* B0399® mediante metodi molecolari. Relatore: Felis GE. Correlatori: **Quarella S**, Gatto V. Università degli Studi di Verona. Anno Accademico 2014/2015

Il Responsabile Scientifico

(Firma)

L'Assegnista di Ricerca

(Firma)