



Università Politecnica delle Marche  
Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali  
XXX (16°) Ciclo

Tesi di Dottorato

Fermented foods: from tradition to innovation

PhD student:  
Dott.ssa Cardinali Federica

Tutor:  
Prof.ssa Lucia Aquilanti

Anno Accademico 2016/17

|                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Abstract</b>                                                                                      | 7  |
| <b>Capitolo I - Introduzione</b>                                                                     | 16 |
| 1. Cenni storici                                                                                     | 17 |
| 2. La fermentazione                                                                                  | 18 |
| 2.1. Vantaggi e benefici della fermentazione                                                         | 20 |
| 3. Microbiota dei prodotti fermentati                                                                | 21 |
| 3.1. Batteri lattici                                                                                 | 22 |
| 3.1.1. Classificazione dei batteri lattici                                                           | 22 |
| 3.1.2. Ruolo dei batteri lattici nei prodotti fermentati                                             | 26 |
| 3.1.3. Batteri lattici come starter                                                                  | 29 |
| 4. Prodotti fermentati                                                                               | 30 |
| 4.1. Prodotti fermentati a base di latte                                                             | 30 |
| 4.2. Prodotti fermentati a base di cereali                                                           | 31 |
| 4.3. Prodotti fermentati a base di vegetali                                                          | 32 |
| 4.4. Prodotti fermentati a base di semi di soia e legumi                                             | 32 |
| 4.6. Prodotti fermentati a base di carne                                                             | 32 |
| 4.7. Prodotti fermentati a base di pesce                                                             | 33 |
| 4.8. Bevande fermentate                                                                              | 33 |
| 4.9. Prodotti fermentati vari                                                                        | 33 |
| <b>Bibliografia</b>                                                                                  | 35 |
| <b>Capitolo II – Tradizione: formaggio Caciofiore della Sibilla</b>                                  | 40 |
| 1. Introduzione                                                                                      | 41 |
| 1.1. Formaggio: cenni storici                                                                        | 41 |
| 1.2. Flora microbica nei formaggi                                                                    | 41 |
| 1.2.1. Flora microbica iniziale                                                                      | 42 |
| 1.2.2. Flora microbica secondaria                                                                    | 43 |
| 1.3. Formaggi a caglio vegetale                                                                      | 44 |
| 1.4. Formaggi Caciofiore                                                                             | 45 |
| 2. Scopo del lavoro                                                                                  | 48 |
| 3. Materiali e metodi                                                                                | 50 |
| 3.1. Processo di caseificazione                                                                      | 50 |
| 3.2. Preparazione dell'estratto acquoso di <i>Carlina acanthifolia</i> All. sub. <i>acanthifolia</i> | 51 |
| 3.3. Campionamento                                                                                   | 51 |
| 3.4. Determinazione del pH                                                                           | 52 |
| 3.5. Valutazione della popolazione microbica                                                         | 52 |
| 3.6. Preparazione dei bulk di colonia                                                                | 53 |
| 3.7. Estrazione del DNA cellulare                                                                    | 53 |
| 3.7.1. Estrazione del DNA microbico totale da matrice                                                | 53 |
| 3.7.2. Estrazione del DNA fungino                                                                    | 54 |
| 3.7.3. Estrazione del DNA batterico                                                                  | 55 |
| 3.8. Quantizzazione del DNA estratto                                                                 | 55 |

|                                                        |                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.9.                                                   | <i>Ceppi di riferimento</i>                                                                                    | 56  |
| 3.10.                                                  | <i>Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)</i>                          | 57  |
| 3.10.1.                                                | <i>Amplificazione via PCR del DNA fungino</i>                                                                  | 57  |
| 3.10.2.                                                | <i>Amplificazione via PCR del DNA batterico</i>                                                                | 58  |
| 3.10.3.                                                | <i>Elettroforesi su gel di agarosio</i>                                                                        | 59  |
| 3.10.4.                                                | <i>Analisi DGGE</i>                                                                                            | 59  |
| 3.11.                                                  | <i>Analisi Illumina MySeq</i>                                                                                  | 60  |
| 3.11.1.                                                | <i>Amplificazione e analisi del DNA batterico</i>                                                              | 60  |
| 3.11.2.                                                | <i>Analisi dei dati e identificazione delle sequenze tramite QIIME</i>                                         | 61  |
| 3.12.                                                  | <i>Analisi statistica</i>                                                                                      | 61  |
| <b>4.</b>                                              | <b>Risultati</b>                                                                                               | 62  |
| 4.1.                                                   | <i>Valutazione valori di pH</i>                                                                                | 62  |
| 4.2.                                                   | <i>Conte vitali</i>                                                                                            | 63  |
| 4.3.                                                   | <i>Analisi PCR-DGGE</i>                                                                                        | 65  |
| 4.3.1.                                                 | <i>Analisi del DNA fungino</i>                                                                                 | 65  |
| 4.3.2.                                                 | <i>Analisi del DNA batterico</i>                                                                               | 72  |
| 4.4.                                                   | <i>Sequenziamento con sistema Illumina MySeq</i>                                                               | 78  |
| <b>5.</b>                                              | <b>Discussione e conclusione</b>                                                                               | 81  |
| <b>6.</b>                                              | <b>Bibliografia</b>                                                                                            | 87  |
| <b>Capitolo III – Tradizione: salame tipo Fabriano</b> |                                                                                                                | 93  |
| <b>1.</b>                                              | <b>Introduzione</b>                                                                                            | 94  |
| 1.1.                                                   | <i>Il Salame e le sue origini</i>                                                                              | 94  |
| 1.2.                                                   | <i>Microflora del salame</i>                                                                                   | 95  |
| 1.2.1.                                                 | <i>Batteri</i>                                                                                                 | 96  |
| 1.2.2.                                                 | <i>Muffe e lieviti</i>                                                                                         | 97  |
| 1.2.3.                                                 | <i>Microrganismi patogeni</i>                                                                                  | 98  |
| 1.3.                                                   | <i>Starter commerciali e conservanti</i>                                                                       | 98  |
| 1.3.1.                                                 | <i>Starter commerciale</i>                                                                                     | 98  |
| 1.3.2.                                                 | <i>Sale</i>                                                                                                    | 100 |
| 1.3.3.                                                 | <i>Nitrati e nitriti</i>                                                                                       | 100 |
| <b>2.</b>                                              | <b>Scopo del lavoro</b>                                                                                        | 102 |
| <b>3.</b>                                              | <b>Materiali e metodi</b>                                                                                      | 104 |
| 3.1.                                                   | <i>Processo produttivo del salame tipo Fabriano</i>                                                            | 104 |
| 3.2.                                                   | <i>Determinazione di umidità e pH</i>                                                                          | 105 |
| 3.3.                                                   | <i>Conte microbiche</i>                                                                                        | 105 |
| 3.4.                                                   | <i>Estrazione del RNA microbico totale</i>                                                                     | 106 |
| 3.5.                                                   | <i>Quantizzazione del RNA estratto</i>                                                                         | 106 |
| 3.6.                                                   | <i>Sintesi del cDNA</i>                                                                                        | 106 |
| 3.7.                                                   | <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (RT-PCR-DGGE)</i> | 107 |
| 3.7.1.                                                 | <i>Amplificazione via PCR</i>                                                                                  | 107 |

|                                                                                                 |                                                                                     |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.7.2.                                                                                          | <i>Elettroforesi su gel di agarosio ed analisi DGGE</i>                             | 108 |
| 3.8.                                                                                            | <i>Analisi Illumina MySeq</i>                                                       | 108 |
| 3.8.1.                                                                                          | <i>Amplificazione e analisi del cDNA batterico</i>                                  | 108 |
| 3.8.2.                                                                                          | <i>Analisi dei dati e identificazione delle sequenze tramite QIIME</i>              | 108 |
| 3.9.                                                                                            | <i>Analisi statistica</i>                                                           | 109 |
| <b>4.</b>                                                                                       | <b>Risultati</b>                                                                    | 110 |
| 4.1.                                                                                            | <i>Determinazione di umidità e pH</i>                                               | 110 |
| 4.2.                                                                                            | <i>Conte vitali</i>                                                                 | 111 |
| 4.3.                                                                                            | <i>Analisi RT-PCR-DGGE</i>                                                          | 114 |
| 4.4.                                                                                            | <i>Sequenziamento con Sistema Illumina MySeq</i>                                    | 121 |
| <b>5.</b>                                                                                       | <b>Discussione e conclusione</b>                                                    | 124 |
| <b>6.</b>                                                                                       | <b>Bibliografia</b>                                                                 | 129 |
| <b>Capitolo IV – Innovazione: pani di frumento tenero ottenuti con impasti acidi di tipo II</b> |                                                                                     | 134 |
| <b>1.</b>                                                                                       | <b>Introduzione</b>                                                                 | 135 |
| 1.1.                                                                                            | <i>La panificazione: cenni storici</i>                                              | 135 |
| 1.2.                                                                                            | <i>Il pane e altri prodotti a lievitazione naturale</i>                             | 135 |
| 1.3.                                                                                            | <i>Impasto acido</i>                                                                | 136 |
| 1.3.1.                                                                                          | <i>Caratteristiche degli impasti acidi</i>                                          | 137 |
| 1.3.2.                                                                                          | <i>Classificazione degli impasti acidi</i>                                          | 139 |
| 1.3.3.                                                                                          | <i>Dinamica microbica dell'impasto acido</i>                                        | 141 |
| <b>2.</b>                                                                                       | <b>Scopo del lavoro</b>                                                             | 144 |
| <b>3.</b>                                                                                       | <b>Materiali e metodi</b>                                                           | 146 |
| 3.1.                                                                                            | <i>Disegno sperimentale</i>                                                         | 146 |
| 3.2.                                                                                            | <i>Preparazione degli Impasti Acidi</i>                                             | 146 |
| 3.2.1.                                                                                          | <i>Impasto acido di tipo I</i>                                                      | 146 |
| 3.2.2.                                                                                          | <i>Impasto acido di tipo II</i>                                                     | 147 |
| 3.3.                                                                                            | <i>Panificazione</i>                                                                | 147 |
| 3.4.                                                                                            | <i>Analisi chimiche e reologiche sulla farina</i>                                   | 148 |
| 3.5.                                                                                            | <i>Conte vitali in piastra</i>                                                      | 148 |
| 3.6.                                                                                            | <i>Allestimento dei bulk di colonia</i>                                             | 150 |
| 3.7.                                                                                            | <i>Determinazione del pH</i>                                                        | 150 |
| 3.8.                                                                                            | <i>Determinazione dell'acidità totale titolabile (Total titratable acidity-TTA)</i> | 151 |
| 3.9.                                                                                            | <i>Estrazione del DNA microbico</i>                                                 | 151 |
| 3.9.1.                                                                                          | <i>Estrazione del DNA totale da matrice</i>                                         | 151 |
| 3.9.2.                                                                                          | <i>Estrazione del DNA batterico da bulk di colonia</i>                              | 151 |
| 3.10.                                                                                           | <i>Analisi PCR-DGGE</i>                                                             | 151 |
| 3.11.                                                                                           | <i>Analisi del pane</i>                                                             | 152 |
| 3.11.1.                                                                                         | <i>Analisi del pH e dell'acidità totale titolabile</i>                              | 152 |
| 3.11.2.                                                                                         | <i>Determinazione volume specifico</i>                                              | 152 |
| 3.11.3.                                                                                         | <i>Analisi della texture</i>                                                        | 153 |
| 3.11.4.                                                                                         | <i>Analisi sensoriali</i>                                                           | 153 |

|                     |                                                                                      |     |
|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.12.               | <i>Analisi statistica</i>                                                            | 153 |
| <b>4.</b>           | <b>Risultati</b>                                                                     | 154 |
| 4.1.                | <i>Caratterizzazione chimica e reologica della farina</i>                            | 154 |
| 4.2.                | <i>Caratterizzazione degli impasti acidi</i>                                         | 154 |
| 4.3.                | <i>Analisi PCR-DGGE</i>                                                              | 156 |
| 4.4.                | <i>Caratterizzazione del pane</i>                                                    | 160 |
| <b>5.</b>           | <b>Discussione e conclusione</b>                                                     | 162 |
| <b>6.</b>           | <b>Bibliografia</b>                                                                  | 168 |
| <b>Capitolo V _</b> | <b>Innovazione: bevande fermentate analcoliche a base di cereali o pseudocereali</b> | 174 |
| <b>1.</b>           | <b>Introduzione</b>                                                                  | 175 |
| 1.1.                | <i>Bevande fermentate: cenni storici</i>                                             | 175 |
| 1.2.                | <i>Cereali e pseudocereali</i>                                                       | 176 |
| 1.2.1.              | <i>Riso rosso</i>                                                                    | 177 |
| 1.2.2.              | <i>Orzo</i>                                                                          | 178 |
| 1.2.3.              | <i>Grano saraceno</i>                                                                | 180 |
| 1.3.                | <i>Fermentazione dei cereali</i>                                                     | 181 |
| 1.4.                | <i>Dolcificanti naturali</i>                                                         | 183 |
| 1.4.1.              | <i>Sciroppo d'acero</i>                                                              | 184 |
| <b>2.</b>           | <b>Scopo del lavoro</b>                                                              | 186 |
| <b>3.</b>           | <b>Materiali e metodi</b>                                                            | 188 |
| 3.1.                | <i>Colture di batteri lattici di riferimento</i>                                     | 188 |
| 3.2.                | <i>Preparazione dei substrati di fermentazione</i>                                   | 188 |
| 3.3.                | <i>Prove preliminari di fermentazione</i>                                            | 189 |
| 3.3.1.              | <i>Determinazione del pH</i>                                                         | 189 |
| 3.3.2.              | <i>Analisi sensoriale</i>                                                            | 191 |
| 3.4.                | <i>Allestimento delle precolture</i>                                                 | 191 |
| 3.5.                | <i>Preparazione delle bevande e analisi durante la shelf life</i>                    | 191 |
| 3.5.1.              | <i>Determinazione della vitalità cellulare</i>                                       | 192 |
| 3.5.2.              | <i>Determinazione dell'acidità totale titolabile (Total titratable acidity-TTA)</i>  | 192 |
| 3.5.3.              | <i>Determinazione del contenuto di fosforo totale e di acido fitico</i>              | 193 |
| 3.5.4.              | <i>Analisi bromatologiche</i>                                                        | 193 |
| 3.6.                | <i>Analisi statistica</i>                                                            | 193 |
| <b>4.</b>           | <b>Risultati</b>                                                                     | 194 |
| 4.1.                | <i>Prove preliminari</i>                                                             | 194 |
| 4.1.1.              | <i>Valutazione dell'attività fermentativa delle colture di batteri lattici</i>       | 194 |
| 4.1.2.              | <i>Valutazione del profilo sensoriale</i>                                            | 195 |
| 4.2.                | <i>Analisi delle bevande</i>                                                         | 197 |
| 4.2.1.              | <i>Monitoraggio della vitalità cellulare</i>                                         | 197 |
| 4.2.2.              | <i>Valutazione del pH</i>                                                            | 198 |
| 4.2.3.              | <i>Determinazione dell'acidità totale titolabile</i>                                 | 199 |
| 4.2.4.              | <i>Determinazione del contenuto di fosforo totale e di acido fitico</i>              | 200 |

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 4.2.5. <i>Analisi bromatologiche</i> | 200 |
| 4.2.6. <i>Profilo sensoriale</i>     | 202 |
| <b>5. Discussione e conclusione</b>  | 204 |
| <b>6. Bibliografia</b>               | 209 |
| <b>7. Appendice</b>                  | 218 |
| <b>Capitolo VI _ Pubblicazioni</b>   | 221 |

## Abstract

La fermentazione è uno dei metodi più antichi ed economici utilizzati nella conservazione degli alimenti, caratterizzata da una conversione lenta dei composti organici mediata da microrganismi o enzimi di origine vegetale o animale. I cibi fermentati sono fortemente legati alla cultura e alla tradizione soprattutto nelle zone rurali; infatti, l'uso di ingredienti locali e di tecniche di produzione tipiche sono parte integrante della cultura regionale e nazionale. Il processo di fermentazione consiste principalmente nella conversione di carboidrati in alcool, anidride carbonica ed acidi organici, in condizioni anaerobiche operata da lieviti e/o batteri. Gli alimenti fermentati rappresentano i più importanti consorzi di microrganismi, derivanti dal microbiota indigeno delle materie prime, dall'aria, dagli utensili e dall'ambiente di lavorazione o dall'aggiunta di colture starter. La fermentazione migliora le caratteristiche organolettiche degli alimenti, la loro accettabilità e appetibilità per i consumatori e prolunga la *shelf life* del prodotto. La fermentazione, inoltre, mediante una modificazione biochimica ed organolettica delle materie prime, determina un incremento del valore nutrizionale del prodotto, correlato in molti casi all'acquisizione di proprietà benefiche per la salute umana. I batteri lattici sono comunemente presenti in alimenti e bevande fermentate prodotte in tutto il mondo e i generi ad oggi maggiormente isolati sono: *Alkalibacterium*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella*. Il ruolo dei batteri lattici è stato ampiamente valutato e molti ricercatori hanno evidenziato un'importante azione di questi batteri nei confronti della salute umana. Ad esempio, alcune specie di batteri lattici, associate a cibi fermentati, sono note per la produzione, in alcuni casi ceppo-dipendente, di composti bioattivi ad azione antimicrobica quali, ad esempio, perossido di idrogeno, acidi organici e batteriocine. Altre specie includono ceppi probiotici, con effetti benefici sulla salute dell'intestino umano e per questo utilizzati nelle preparazioni farmaceutiche e/o alimentari. Alcuni ceppi di batteri lattici sono, invece, in grado di stimolare e regolare la risposta immunitaria naturale ed acquisita, mentre recenti studi hanno evidenziato possibili effetti benefici di questi microrganismi nei confronti di infezioni della cavità orale. Sulla base di queste premesse, i batteri lattici sono indubbiamente agenti di trasformazione molto promettenti per la valorizzazione dei prodotti tradizionali e/o lo sviluppo di

nuovi prodotti e applicazioni in campo alimentare, soprattutto in relazione alla crescente attenzione dei consumatori nei confronti di un'alimentazione sana ed equilibrata. Inoltre, il crescente numero di soggetti lattosio-intolleranti, celiaci, piuttosto che vegani e vegetariani, costituisce un forte stimolo alla ricerca di alimenti innovativi che possano unire ai caratteri tradizionali di alimenti fermentati anche possibili effetti benefici per la salute umana. Il presente Dottorato ha avuto l'obiettivo di caratterizzare dal punto di vista microbiologico, fisico-chimico e in alcuni casi sensoriale, prodotti fermentati sia della tradizione italiana sia innovativi, con particolare riferimento alla comprensione delle dinamiche microbiche. Relativamente agli alimenti fermentati tradizionali, sono stati presi in studio il formaggio *Caciofiore della Sibilla* e il salame tipo Fabriano, mentre per i prodotti innovativi, sono state sviluppate tre bevande fermentate a base rispettivamente di riso rosso, grano saraceno ed orzo, e pani a base di farina di frumento tenero ottenuti con impasti acidi di tipo II.

Il *Caciofiore della Sibilla* è un formaggio a pasta tenera ottenuto dalla coagulazione di latte crudo ovino con estratto acquoso di giovani foglie e steli della pianta *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*, prodotto senza l'aggiunta di starter commerciali e dunque soggetto a fermentazione spontanea operata da batteri lattici naturalmente associati alle materie prime e all'ambiente di caseificazione. Il *Caciofiore della Sibilla* è un formaggio tradizionale, prodotto in una zona limitata della provincia di Macerata (Marche, Italia) con l'uso di un coagulante vegetale ottenuto dalla macerazione di porzioni della pianta *C. acanthifolia* All. che cresce spontaneamente nei pascoli di alta quota del Parco Nazionale dei Monti Sibillini. L'antica procedura di produzione del coagulante, tramandata di padre in figlio, e la limitata finestra temporale in cui le giovani foglie di questa specie vegetale sono disponibili rendono questo formaggio un prodotto di nicchia di cui, negli ultimi 50 anni, si era totalmente persa la continuità produttiva. Inoltre, variazioni stagionali correlate alla temperatura e alle precipitazioni influenzano notevolmente la disponibilità della pianta, rendendo la produzione di questo formaggio un evento occasionale e con produzioni molto limitate. Pur essendo un formaggio tradizionale, prodotto e consumato in una zona geografica limitata, il *Caciofiore della Sibilla* rappresenta un perfetto modello di formaggio mediterraneo realizzato con caglio vegetale. La tradizionalità dei formaggi a caglio vegetale nel territorio marchigiano è evidenziata dalla presenza di formaggi quali la "Caciotta vaccina al caglio vegetale" e il "Caprino al lattice di fico" nell'elenco dei prodotti agro-alimentari tradizionali delle Marche (S.O. n. 176 del 29 luglio 2017). In relazione a quanto esposto sulla limitata produzione di questo formaggio tipico, è stata

analizzata una singola produzione di *Caciofiore della Sibilla* realizzata presso il Caseificio degli Angeli di Pieve Torina (MC) nelle Marche. In dettaglio, tre forme di *Caciofiore della Sibilla* sono state prodotte ed analizzate in comparazione ad altrettante forme di Pecorino tradizionale, ottenuto utilizzando lo stesso *batch* di latte e caglio animale in polvere. Entrambi i formaggi sono stati sottoposti a valutazione del pH ed a caratterizzazione microbiologica attraverso un approccio molecolare polifasico basato su tecniche coltura-indipendenti (*Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*, PCR-DGGE e *Illumina sequencing*) e coltura-dipendenti (conte vitali in piastra di lieviti e muffe, lattobacilli, lattococchi, cocchi termofili, cocchi coagulasi negativi, mesofili aerobi totali, enterococchi, Enterobacteriaceae). Nello specifico, sono stati analizzati campioni di latte crudo ovino, caglio vegetale (estratto acquoso di *C. acanthifolia* All.), cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte ovino con caglio animale commerciale e caglio vegetale e formaggio (*Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale) campionato a diversi tempi di maturazione. In linea generale, nel formaggio *Caciofiore della Sibilla*, è stato possibile identificare un ampio numero di *taxa* fungini e batterici. In particolare, è stato possibile osservare un impatto marginale o pressoché nullo del caglio vegetale sulla composizione e le dinamiche della popolazione fungina del formaggio, mentre un impatto più evidente è stato evidenziato sulla popolazione batterica. Dall'analisi della popolazione fungina, la specie *Debaryomyces hansenii* è risultata stabilmente presente in entrambi i formaggi durante il periodo di stagionatura, mentre *Meyerozyma guilliermondii* è stata identificata esclusivamente nel formaggio *Caciofiore della Sibilla*. Tra i numerosi *taxa* batterici, sono stati identificati batteri alterativi, ambientali e pro-tecnologici principalmente ascritti all'ordine Lactobacillales. In particolare, rappresentanti del gruppo *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius* e *Lactobacillus plantarum/paraplanarum/pentosus* sono stati rilevati analizzando i DNA estratti direttamente dalla pianta, dal caglio vegetale e dalla cagliata ottenuta mediante coagulazione con caglio vegetale. Attraverso l'analisi PCR-DGGE è, inoltre, emersa la presenza nel *Caciofiore della Sibilla* di specie batteriche verosimilmente derivanti dal caglio vegetale quali *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides*. I dati ottenuti mediante *Illumina sequencing* hanno mostrato per entrambi i formaggi, a fine stagionatura, la dominanza di batteri appartenenti all'ordine Lactobacillales, evidenziando però la co-dominanza dei generi *Lactobacillus* e *Leuconostoc* nel formaggio *Caciofiore della Sibilla* e la dominanza del genere *Lactococcus* seguito dal genere *Lactobacillus* nel formaggio Pecorino

tradizionale. Le differenze evidenziate nella composizione della popolazione batterica tra i due formaggi a fine maturazione sono state confermate anche dall'analisi PCR-DGGE.

Il salame di Fabriano (o semplicemente salame Fabriano) è un prodotto tipico della tradizione marchigiana, prodotto esclusivamente nella zona geograficamente definita dai comuni di Fabriano, Arcevia, Cerreto D'esi, Genga, Serra San Quirico, Sassoferrato, Matelica, Esanatoglia, Serra S'Abbondio, Frontone, Pergola, Pioraco e Fiuminata, secondo i requisiti stabiliti dal disciplinare di produzione, redatto dal Consorzio per la Tutela di questo salume (<http://www.salamedifabriano.it/docs/consorzio/ilconsorzio.asp>) e approvato dal Consiglio Comunale di Fabriano. Le origini del salame Fabriano si perdono nella notte dei tempi; numerose sono, infatti, le testimonianze sulla sua produzione, ma due sono le date importanti nella storia di questo salume lardellato. La prima risale al 1877, anno in cui Oreste Marcoaldi, autore del libro "Le Usanze e i pregiudizi del Popolo Fabrianese", in un dizionarietto definisce il salame come una "specialità di Fabriano, così come di Bologna è la mortadella e di Modena è lo zampone". Seconda data importante nella storia di questo salume è il 22 aprile 1881, data in cui Giuseppe Garibaldi scrisse una lettera per ringraziare l'amico Benigno Bigonzetti dei preziosi salami fabrianesi ricevuti in dono. Il salume prodotto secondo la tradizionale ricetta prevede la macellazione delle parti più pregiate e di prima qualità del suino, quali spalla (solo il fiocco), coscia (il prosciutto) e fondello, di razze esclusivamente autoctone dell'entroterra marchigiano. Il grasso aggiunto in ragione dell'8-12% viene prelevato esclusivamente dalla fascia adiposa dorsale, la più pregiata, e tagliato a cubetti di circa 0,5-1 cm. All'impasto vengono infine aggiunti sale, pepe nero (macinato ed in grani) e vino bianco e dunque insaccato nel budello gentile. I salumi insaccati vengono dunque chiusi all'estremità con uno spago e appesi a coppie per la prima fase di asciugatura; la maturazione va generalmente dai 50 ai 60 giorni ed è tradizionalmente condotta in cantine e solai areati. La produzione del salame Fabriano è quasi esclusivamente invernale, generalmente effettuata nel periodo ricompreso tra fine settembre/inizio ottobre a marzo/giugno.

Nel corso del presente Dottorato è stata analizzata una produzione sperimentale di salame tipo Fabriano ottenuta presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione di Perugia, seguendo il disciplinare per la scelta delle carni, del tipo di lardo e di budello. Obiettivo della Ricerca è stato quello di caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico (valutazione del pH e dell'umidità relativa) e microbiologico

(enumerazione di Enterobacteriaceae, stafilococchi coagulasi-positivi e -negativi, batteri lattici, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Salmonella* spp.; profilo del microbiota batterico via *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* RT-PCR-DGGE e Illumina *sequencing*) i salami sperimentali prodotti con concentrazioni variabili di nitrati e nitriti, in assenza o aggiunta di starter commerciale di batteri lattici, al fine di valutare l'influenza dei conservanti sulla diversità e le dinamiche microbiche delle popolazioni residenti e/o aggiunte. Nello specifico, per ciascuna tipologia di fermentazione considerata (naturale o guidata) sono stati analizzati salami prodotti con 0 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/0 mg kg<sup>-1</sup> nitrito, 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito e 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito. Le analisi condotte sui salami sperimentali di tipo Fabriano hanno permesso di rilevare l'assenza di specie patogene quali *Clostridium botulinum*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, evidenza questa della qualità microbiologica delle materie prime. L'analisi RT-PCR-DGGE ha permesso di evidenziare una notevole similarità nella composizione del microbiota dei salami prodotti con e senza aggiunta di starter commerciale. Per quanto riguarda l'effetto dei nitrati/nitriti sulla popolazione microbica, all'aumentare della concentrazione di tali conservanti, la RT-PCR-DGGE ha evidenziato una progressiva scomparsa, durante la fase di stagionatura, di alcuni generi e/o specie quali *Pseudomonas* spp., *Serratia liquefaciens* e *Staphylococcus* spp. A differenza della tecnica RT-PCR-DGGE, il sequenziamento con il metodo Illumina ha permesso di differenziare, seppur in modo limitato, i salumi prodotti con e senza starter, consentendo, inoltre, di rilevare la presenza dei generi *Pseudomonas* e *Staphylococcus* lungo tutto il periodo di stagionatura. Entrambe le tecniche hanno, infine, mostrato la dominanza della specie *Lactobacillus sakei* in tutti i salumi analizzati indipendentemente dalla concentrazione di nitrati/nitriti aggiunti.

Il consumo di bevande fermentate analcoliche a base di cereali è diffuso in molti paesi e colture soprattutto dell'Europa dell'Est, dell'Africa e dell'Asia. Prodotti tipici quali Boza (Bulgaria e Turchia), Togwa (Africa), Mahewu (Zimbabwe), ecc. sono ampiamente diffusi tra le popolazioni di questi paesi non solo per la loro appetibilità ma anche per le proprietà benefiche intrinseche. Negli ultimi anni, lo sviluppo di prodotti e bevande funzionali con proprietà organolettiche e nutrizionali di pregio ha attratto l'interesse della comunità scientifica; in questo contesto nuove bevande fermentate non alcoliche a base di cereali si stanno affacciando progressivamente sul mercato globale. In linea con questo nuovo trend, nel corso del Dottorato sono state sviluppate tre

bevande fermentate non alcoliche con caratteristiche sensoriali apprezzabili, prive di latte, e quindi potenzialmente adatte al consumo da parte di soggetti intolleranti o allergici al lattosio, utilizzando ceppi selezionati di batteri lattici e cereali o pseudocereali scelti sulla base di spiccate proprietà organolettiche e/o nutrizionali (contenuto in specifiche vitamine, sali minerali, assenza di glutine, presenza di composti funzionali, ecc.). Nello specifico, 23 ceppi di batteri lattici, conservati presso la Collezione di colture dei laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche, sono stati saggiati, in monocultura, in substrati di fermentazione a base di riso rosso, grano saraceno o orzo, per la valutazione della capacità acidificante e il profilo sensoriale. Al termine dello *screening*, per ogni cereale o pseudocereale in studio sono state selezionate 3/4 colture, successivamente utilizzate per la produzione di bevande fermentate analcoliche. Durante il periodo di conservazione (30 giorni) a temperatura di refrigerazione (+ 4°C), le bevande sperimentali sono state regolarmente sottoposte ad enumerazione di batteri lattici mesofili su terreno di coltura MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) Agar e monitoraggio di pH e acidità totale titolabile (TTA - *Total Titratable Acidity*). Al termine della *shelf life*, le bevande sono state, inoltre, sottoposte a valutazione del contenuto in fosforo totale e acido fitico, del profilo sensoriale mediante *panel test* e a determinazione di sostanza secca, proteine, lipidi, carboidrati, fibra alimentare e ceneri. Dei 23 ceppi di batteri lattici preliminarmente saggiati, 8 colture sono state selezionate sulla base della migliore performance fermentativa in substrati a base di cereali o pseudocereali e del profilo sensoriale: BZ21-*Lactobacillus casei*; BZ22-*Lactobacillus paracasei*; BZ33-*Lactobacillus casei*; BZ34-*Lactobacillus casei/paracasei*; BZ35-*Lactobacillus casei*; BZ44-*Lactobacillus coryniformis*; BZ47-*Lactobacillus casei/paracasei*; CBL35-*Lactobacillus rhamnosus*. Tali ceppi sono stati quindi utilizzati per la formulazione di tre colture miste successivamente impiegate nella produzione sperimentale di bevande fermentate non alcoliche a base di riso rosso (BZ22-*Lact. paracasei*, BZ33-*Lact. casei*, BZ44-*Lact. coryniformis*, CBL35-*Lact. rhamnosus*), grano saraceno (BZ21-*Lact. casei*, BZ22-*Lact. paracasei*, BZ35-*Lact. casei*) e orzo (BZ33-*Lact. casei*, BZ34-*Lact. casei/paracasei*, BZ47-*Lact. casei/paracasei*, CBL35-*Lact. rhamnosus*). Nel corso delle prime 24 h di fermentazione, in tutte le bevande si è osservato un innalzamento della carica di batteri lattici da  $\sim 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> a  $\sim 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, associato ad una contemporanea riduzione del pH, passato da valori prossimi alla neutralità a valori prossimi a 4. Il monitoraggio del pH e della carica di batteri lattici nel corso del periodo di *shelf life* (30 gg) a +4 °C ha

permesso di evidenziare la stabilità di entrambi i parametri. La caratterizzazione bromatologica ha evidenziato un'elevata similitudine tra le tre bevande sperimentali in termini di contenuto proteico, fibra alimentare e ceneri, mentre differenze significative sono state osservate per il contenuto in sostanza secca e carboidrati; in particolare la bevanda a base di riso rosso è risultata possedere un quantitativo di sostanza secca più elevato rispetto alle altre due bevande e, contestualmente, anche un contenuto in carboidrati più elevato. Infine, dall'analisi del profilo sensoriale la bevanda a base di riso rosso è risultata di maggiore gradimento da parte di un *panel* non addestrato, ricevendo un *global liking* medio di 8,42, statisticamente superiore rispetto al valore riscontrato per le altre due bevande, pari a 6,79 per il grano saraceno e 7,15 per l'orzo, considerando una scala compresa tra 1 e 9.

In panificazione l'impiego di lievito naturale o impasto acido è ampiamente diffuso a livello sia artigianale sia industriale, per la produzione di pani tipici (DOP, specialità regionali, ecc.), dolci delle ricorrenze, cracker, grissini, ecc. Gli impasti acidi sono classificati sulla base della tecnologia di produzione utilizzata in tre diverse tipologie. Gli impasti acidi di tipo I o impasti acidi tradizionali sono matrici solide o semi-solide caratterizzate dalla necessità di operare continui rinfreschi per il mantenimento della vitalità cellulare e dunque dell'attività metabolica e la capacità lievitante. L'impasto acido di tipo I, comunemente utilizzato sia a livello artigianale sia industriale, è prodotto per successivi rinfreschi ad una temperatura di 20-30 °C e si caratterizza per un pH di ~4. Gli impasti di tipo II sono ottenuti da un'unica fase di fermentazione prolungata, alla quale segue lo stoccaggio in ambiente refrigerato per diversi giorni. Sono impasti liquidi o semi-liquidi con un pH < 3,5 dopo 24 h di fermentazione a temperature pari o superiori a 30 °C ed il loro impiego è soprattutto volto all'acidificazione dell'impasto e all'apporto di composti importanti per la definizione del sapore e dell'odore dei prodotti a lievitazione naturale. Gli impasti acidi di tipo II sono per loro natura poveri di lieviti endogeni e pertanto la lievitazione è favorita dall'uso di lievito commerciale. Gli impasti acidi di tipo III, infine, sono impasti essiccati ottenuti a partire da impasti acidi liquidi di tipo II, utilizzati quasi esclusivamente a livello industriale. Questi impasti permettono di ottenere un'elevata standardizzazione del processo produttivo e del prodotto finale. L'acidità dell'impasto di tipo III è strettamente legata e direttamente proporzionale alla *Dough Yield* dell'impasto di tipo II di partenza. Le tre tipologie di impasti acidi si differenziano notevolmente per la composizione della popolazione batterica presente soprattutto in termini di batteri lattici. Infatti, seppur l'impasto acido di

tipo I mostri una popolazione microbica costituita da lieviti ( $10^5$ - $10^7$  UFC g<sup>-1</sup>) e batteri ( $10^7$ - $10^9$  UFC g<sup>-1</sup>) in rapporto 1:100, negli impasti acidi di tipo II la concentrazione di lieviti decresce notevolmente e ancor più negli impasti acidi di tipo III, dove la forte acidità limita la crescita fungina. I batteri lattici presenti negli impasti acidi, soprattutto eterofermentanti facoltativi e obbligati, sono responsabili della produzione di elevate quantità di acidi organici. Contestualmente, la produzione di composti volatili, quali 3-metilbutanale, ottanale, nonanale, 3-ottanone, ecc, determina le caratteristiche aromatiche ed organolettiche del prodotto. Nel corso del presente Dottorato è stato sperimentato l'uso di impasti acidi di tipo II per la produzione di pane da sfarinati di frumento tenero macinato a pietra. Obiettivo della Ricerca è stato quello di valutare l'applicabilità di impasti acidi liquidi ottenuti a partire da impasti acidi di tipo I, nell'ambito della panificazione artigianale. Nello specifico, sono state realizzate due produzioni di impasto acido di tipo II a cui sono seguite due panificazioni sperimentali presso il panificio "Il Biroccio" di Filottrano (AN). In ciascuna prova, sono stati prodotti due impasti acidi di tipo II (DY 350) utilizzando come inoculo un impasto acido di tipo I (DY 156) aggiunto al 25% (peso su peso dell'impasto), conservato presso i laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali. Gli impasti acidi liquidi ottenuti sono stati sottoposti a determinazione di pH e acidità totale titolabile e ad enumerazione di batteri lattici sul mezzo selettivo mSDB (*Sourdough Bacteria* modificato). Tali impasti sono stati, inoltre, caratterizzati microbiologicamente mediante estrazione del DNA e successiva analisi PCR-DGGE. I pani prodotti utilizzando gli impasti acidi liquidi sono stati sottoposti a determinazione di pH, acidità totale titolabile, volume specifico, *texture* ed infine grado di apprezzamento da parte di un *panel* di assaggiatori non addestrati ma familiari al consumo di pane. L'impasto acido di tipo I, utilizzato come inoculo per la realizzazione degli impasti acidi di tipo II, è stato caratterizzato per una carica di batteri lattici pari a 9,23 log UFC g<sup>-1</sup>, un pH medio di 3,97 e un'acidità totale titolabile media di 9,8 mL di NaOH 0,1 N. Dall'analisi PCR-DGGE dello stesso impasto è, inoltre, emersa la presenza della specie *Lactobacillus brevis* e di rappresentanti del gruppo *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius*. Le successive analisi condotte sugli impasti acidi di tipo II dopo 96 h di fermentazione hanno evidenziato una carica di batteri lattici pari a ~ 9,08 log UFC g<sup>-1</sup>; l'analisi PCR-DGGE di tali impasti ha confermato la presenza della specie *Lactobacillus brevis* e di rappresentanti del gruppo *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius*, dato questo che sottolinea come i parametri di processo selezionati (T: 30 °C; t: 96h; rpm: 300) non abbiano alterato la

composizione del microbiota. Come atteso, nel corso del processo di fermentazione, si è osservata una progressiva riduzione del pH, che ha raggiunto un valore minimo medio pari a 3,54 a 72 h, a cui è seguito un leggero rialzo fino ai valori iniziali, registrati al termine del processo fermentativo (96 h). In analogia all'andamento del pH, la misurazione dell'acidità totale titolabile ha permesso di rilevare indirettamente la massima concentrazione di acidi organici a 72 h di fermentazione (TTA media 10,95 mL di NaOH 0,1 N). Le analisi condotte sul pane prodotto utilizzando impasto acido di tipo I, impasto acido di tipo II e lievito commerciale hanno evidenziato differenze significative per quanto riguarda i valori di pH, acidità totale titolabile e grado di apprezzamento dei pani in studio mentre non sono state rilevate differenze significative per la *texture* e il volume specifico.

## **Capitolo I - Introduzione**

“L’uomo è ciò che mangia” è con questa affermazione semplice, ma al tempo stesso complessa, che il filosofo Feuerbach (1862) afferma l’importanza dell’alimentazione per l’uomo e più in generale per la società.

L’alimentazione rappresenta la base della cultura di un popolo, riti, tradizioni ed uso di ingredienti peculiari definiscono l’identità storica e comunitaria di una società. Nell’uomo, il legame tra psicologia e alimentazione ha radici forti legate ad abitudini familiari, a tradizioni locali, regionali o nazionali, nonché a fattori religiosi e culturali.

In un mondo sempre più globalizzato, però, il rapporto tra uomo e alimentazione sta lentamente cambiando in funzione di influssi ambientali, economici, sociali, etnici e religiosi sempre più forti, definendo così una globalizzazione alimentare. Sebbene tale processo sia positivo al fine dell’integrazione dei popoli e delle culture, d’altro canto tale fenomeno risulta estremamente rischioso per le produzioni locali o tradizionali, che rischiano di essere abbandonate portando con sé l’entità storica di un territorio. Prodotti di nicchia, con produzioni limitate per ragioni climatiche o di disponibilità di materie prime, rischiano dunque di sparire, determinando così la perdita di un patrimonio culturale e microbiologico peculiare e non riproducibile. È dunque in tale contesto che lo studio di prodotti alimentari tradizionali risulta fondamentale per la salvaguardia della diversità microbica e alimentare. Lo studio di prodotti fermentati e delle dinamiche microbiche alla base dei processi produttivi rappresenta un aspetto importante per la valorizzazione di questi prodotti e/o lo sviluppo di nuovi prodotti e applicazioni in campo alimentare che rispondano alla crescente attenzione dei consumatori nei confronti di un’alimentazione sana ed equilibrata e al crescente numero di soggetti lattosio-intolleranti, celiaci, piuttosto che vegani e vegetariani.

### *1. Cenni storici*

La fermentazione è una delle forme più antiche ed economiche di trasformazione e conservazione degli alimenti destinati al consumo umano, caratterizzata da una modificazione lenta dei composti organici ad opera di microrganismi o enzimi di origine vegetale o animale (Walker, 1988; Chavan & Kadam, 1989; Billings, 1998). Prime testimonianze storiche della produzione e del consumo di prodotti fermentati a base di latte, vegetali e cereali risalgono al 6000 a.C. nella zona della Mezzaluna Fertile in Medio Oriente, dove cibi e

bevande fermentate venivano preparati in maniera totalmente artigianale senza alcuna conoscenza sulle dinamiche microbiologiche alla base della produzione stessa (Blandino *et al.*, 2003).

La rivoluzione industriale (metà 1700) prima e lo sviluppo della microbiologia come scienza (1850) poi, sono da considerarsi i due eventi chiave nella produzione di prodotti fermentati; infatti, se con la rivoluzione industriale si posero le basi per l'industrializzazione del processo produttivo di molteplici cibi e bevande, fu solo con lo sviluppo della microbiologia che si rese possibile iniziare a comprendere le dinamiche dei processi biologici e dunque porre le basi per la delineazione delle fermentazioni guidate (Caplice & Fitzgerald, 1999). La preparazione di molti cibi e bevande fermentate tipiche o tradizionali permane ad oggi come un'arte casalinga; molteplici sono i prodotti fermentati con produzione esclusivamente domestica o su piccola scala la cui tradizionalità permane saldamente legata alle zone di produzione. In tutto il mondo, e in particolare nei paesi in via di sviluppo, il consumo di cibi e bevande fermentate tradizionali risulta essere alla base della dieta giornaliera. Al contrario, nei paesi avanzati la preparazione di molti cibi e bevande ha subito, nel corso del tempo, un evidente processo di industrializzazione a causa della produzione commerciale su larga scala (Bol & de Vos, 1997) perdendo in parte il legame con la tradizione locale. Nell'ultimo decennio, però, sempre più spazio è stato dato alla ricerca di prodotti funzionali innovativi con caratteristiche peculiari, senza dimenticare le radici storiche e tradizionali di cibi e bevande fermentate. Per questo motivo, innumerevoli sono state le pubblicazioni riguardanti lo studio di prodotti tradizionali, allo scopo di caratterizzare microbiologicamente tali prodotti alla ricerca di generi o specie con caratteristiche metaboliche e fisiologiche consone all'applicazione a livello industriale per l'introduzione, il miglioramento o la modificazione di prodotti fermentati commerciali.

## 2. La fermentazione

La fermentazione è il processo metabolico mediante il quale i carboidrati vengono ossidati formando etanolo o altri acidi organici e anidride carbonica (CO<sub>2</sub>), che si sviluppa in condizioni di anaerobiosi ad opera di lieviti e/o batteri. La fermentazione è alla base della produzione di un numero estremamente elevato di cibi e bevande in tutto il mondo, sfruttando processi tecnologici, materie prime e microrganismi diversi.

Quattro sono i tipi di fermentazione utilizzate nella produzione di cibi e bevande fermentate: fermentazione alcolica, lattica, acetica e alcalina (Soni & Sandhu, 1990).

#### ➤ *Fermentazione alcolica*

La fermentazione alcolica è il processo biochimico anaerobio mediante il quale il glucosio viene metabolizzato ad etanolo e anidride carbonica ad opera sia di batteri che di lieviti.

Il processo è suddiviso in due fasi: la prima prevede la decarbossilazione del piruvato ad acetaldeide e CO<sub>2</sub> catalizzata dall'enzima piruvato decarbossilasi; la seconda prevede la riduzione dell'acetaldeide ad etanolo ad opera dell'enzima alcol deidrogenasi. La fermentazione alcolica, dunque, ha una resa netta di due molecole di etanolo e due molecole di CO<sub>2</sub> a partire da una singola molecola di glucosio.

Questo processo fermentativo risulta essere tra i più importanti in campo alimentare sia artigianale che industriale; mediante fermentazione alcolica spontanea o guidata, infatti, molti sono i prodotti alimentari di rilevanza mondiale commercializzati. Vino e birra, ma anche pane e lievitati da forno sono solamente alcuni degli esempi più enigmatici sull'importanza di questo processo metabolico. La fermentazione alcolica ricopre, inoltre, un importante ruolo nei processi industriali anche in ambito di produzione di etanolo e biocarburanti.

#### ➤ *Fermentazione lattica*

La fermentazione lattica rappresenta il processo metabolico attraverso il quale, in condizione anaerobie, una molecola di piruvato viene convertita in due molecole di acido lattico ad opera dei batteri lattici; questa non è una via metabolica esclusivamente batterica ma si sviluppa anche a livello del tessuto muscolare del uomo. La fermentazione può essere di tipo omolattica, dunque determinare la formazione esclusiva di molecole di acido lattico, o eterolattica, dunque essere caratterizzata dalla formazione contemporanea di acido lattico, acido acetico ed etanolo.

Dal punto di vista industriale ed artigianale, questo processo metabolico è molto importante in quanto si trova alla base della produzione di un numero estremamente elevato di prodotti alimentari quali ad esempio yogurt, formaggio, prodotti da forno ottenuti con impasto acido, bevande non alcoliche fermentate, ecc. In particolare,

la fermentazione eterolattica risulta di interesse tecnologico in relazione alla formazione di composti quali acetaldeide e diacetile, fondamentali nella determinazione del sapore e dell'aroma dei prodotti fermentati.

La fermentazione lattica ha, inoltre, un ruolo importante nel settore farmaceutico, tessile e chimico.

#### ➤ *Fermentazione alcalina*

Gli alimenti alcalini fermentati rappresentano un gruppo di alimenti poco conosciuti, ampiamente consumati in Asia e Africa, sono alimenti prodotti a partire da matrici molto diverse tra loro quali ad esempio soia, fagioli africani, semi di cotone o uova di pollame (Wang &Fung, 1996). Il processo fermentativo induce una degradazione delle proteine in peptidi e singoli amminoacidi, con formazione di ammoniaca che induce l'aumento del pH del prodotto, giustificandone il nome stesso, e contestualmente l'insorgenza di un odore ammoniacale piuttosto evidente. La fermentazione alcalina è generalmente condotta dalla specie *Bacillus subtilis* seppur altre specie del genere *Bacillus* sono ritenute responsabili della produzione di alimenti alcalini fermentati in processi di fermentazione spontanea (Wang &Fung, 1996; Parkouda *et al.*, 2009).

#### ➤ *Fermentazione acetica*

La fermentazione acetica è un processo ossidativo, che si sviluppa in ambiente aerobico, mediante il quale l'etanolo prodotto per via fermentativa viene trasformato in acido acetico ad opera di batteri appartenenti al genere *Acetobacter*. Questa via metabolica, che non risulta essere una fermentazione vera e propria, è alla base della produzione di aceto a partire da varie matrici quali vino, mele, pere, aceto di birra e aceto balsamico. Il verificarsi della fermentazione acetica è altresì indesiderata in altri alimenti fermentati, dove il suo sviluppo induce l'acquisizione di proprietà organolettiche particolarmente sgradevoli da parte del prodotto finito.

### *2.1. Vantaggi e benefici della fermentazione*

Il processo fermentativo alla base della produzione di cibi e bevande fermentate è importante in quanto determina variazioni profonde delle materie prime rispetto al prodotto finale. La fermentazione risulta essere, in primo luogo, un modo naturale ed economico per ridurre il volume degli alimenti e favorire così il trasporto

degli stessi (Simango, 1997), prolungandone contestualmente la *shelf life* (Smid e Lacroix, 2013; Mokoena *et al.*, 2016) e dunque la disponibilità per il consumatore.

La trasformazione biochimica, che si verifica durante il processo, determina un incremento del valore nutrizionale del prodotto rispetto alla materia prima utilizzata, riducendo l'energia richiesta per la cottura e rendendo il prodotto più sicuro (Simango, 1997). Inoltre, l'incremento del valore nutrizionale è spesso correlato all'acquisizione di proprietà benefiche del prodotto per la salute umana (Tamang *et al.*, 2016). La fermentazione, infine, migliora le caratteristiche organolettiche degli alimenti, la loro accettabilità e appetibilità per i consumatori stessi (Moroni *et al.*, 2009; Mokoena *et al.*, 2016).

### 3. Microbiota dei prodotti fermentati

Gli alimenti fermentati rappresentano i più importanti consorzi di microrganismi, derivanti dal microbiota indigeno delle materie prime, dall'aria, dagli utensili e dall'ambiente di lavorazione (Hesseltine, 1979; Franz *et al.*, 2014) o dall'aggiunta di colture starter (Holzapfel, 1997; Stevens e Nabors, 2009), in grado di modificare biochimicamente e organoletticamente i substrati, in prodotti finiti socialmente e culturalmente accettati dai consumatori (Campbell-Platt, 1994; Steinkraus, 1997; Tamang, 2010 a).

Il microbiota di moltissimi prodotti fermentati provenienti da tutto il mondo è stato ampiamente studiato permettendo così di ottenere una panoramica di insieme sui generi e specie microbiche eumicetiche e batteriche predominanti nei cibi e bevande a fermentazione spontanea o guidata (Tamang *et al.*, 2016).

Tra i generi di lieviti più frequentemente riscontrati nei cibi e bevande fermentate è possibile annoverare *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, ecc (Watanabe *et al.*, 2008; Tamang & Fleet, 2009; Lv *et al.*, 2013); mentre tra le muffe filamentose i generi più frequentemente isolati sono *Actinomyces*, *Amylomyces*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ecc (Nout & Aidoo, 2002; Chen *et al.*, 2014). Tra i batteri moltissimi sono i generi coinvolti nei processi di fermentazione delle matrici alimentari, tra questi è possibile annoverare il genere *Bacillus*, isolato frequentemente dai prodotti a base di legumi tipici di Asia e Africa, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, isolati da latte, carne e pesce fermentato (Martín *et al.*, 2006; Coton *et al.*, 2010), generi *Bifidobacterium*, *Brachybacterium*, *Brevibacterium* e *Propionibacterium*

isolati generalmente dal formaggio (Bourdichon *et al.*, 2012), generi *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Haloanaerobium*, *Halobacterium*, *Halococcus*, *Pseudomonas*, ecc isolati da svariate matrici alimentari (Tamang, 2010 a). Infine, tra la componente microbica tipica di cibi e bevande fermentate, il gruppo batterico più importante, in relazione alla diffusione e importanza a livello di trasformazione biochimica ed organolettica dei prodotti, è rappresentato dai batteri lattici; isolati comunemente in tutti i prodotti fermentati del mondo.

### 3.1. Batteri lattici

I batteri lattici sono un gruppo eterogeneo di microrganismi definiti tali per la loro capacità di produrre come principale prodotto della fermentazione acido lattico. Sono batteri Gram-positivi, asporigeni, immobili, anaerobi facoltativi/aerotolleranti, in alcuni casi microaerofili, in grado di svilupparsi preferenzialmente in condizioni di basse concentrazioni di ossigeno; mancano di catena respiratoria in relazione all'assenza di citocromi, e risultano privi di catalasi e nitrato riduttasi (Stiles & Holzapfel, 1997; Johnson-Green, 2002). Sono microrganismi acido-tolleranti e in alcuni casi acidofili; in base alla morfologia i batteri lattici possono essere classificati in cocci e bacilli, mentre sulla base del loro metabolismo possono essere classificati in omofermentanti, in grado di convertire i carboidrati esclusivamente in acido lattico, ed eterofermentanti capaci di produrre acido lattico, etanolo, acido acetico e anidride carbonica.

#### 3.1.1. Classificazione dei batteri lattici

Dal punto di vista tassonomico, i batteri lattici appartengono al Phylum Firmicutes, ordine Lactobacillales; 5 sono le famiglie tassonomiche in cui vengono generalmente distinti questi batteri: Lactobacillaceae (generi *Lactobacillus* e *Pediococcus*), Streptococcaceae (generi *Streptococcus* e *Lactococcus*), Leuconostocaceae (generi *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella*), Enterococcaceae (generi *Enterococcus*, *Tetragenococcus* e *Vagococcus*) e Carnobacteriaceae (generi *Alkalibacterium* e *Carnobacterium*) (Salminen *et al.*, 2004; Axelsson *et al.*, 2012; Holzapfel & Wood, 2014).

### ➤ Genere *Lactobacillus*

Genere microbico molto eterogeno con morfologia cellulare bastoncellare variabile. Nonostante le notevoli esigenze nutrizionali, il genere *Lactobacillus* è ubiquitariamente diffuso in alimenti di origine animale e vegetale, in insilati e normalmente presente come microbiota intestinale di uomo e alcuni animali. Il genere è suddiviso in relazione alle caratteristiche metaboliche in 3 diversi gruppi: omofermentanti obbligati, eterofermentanti facoltativi e eterofermentanti obbligati.

I lattobacilli omofermentanti obbligati sono in grado di fermentare carboidrati esosi producendo acido lattico e corrispondono ai Termobatteri di Orla-Jensen (1919) caratterizzati da temperature massime di crescita pari a 45 °C. Specie ascrivibili a questo gruppo microbico sono: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus farciminis* e *Lactobacillus amylovorus*.

I lattobacilli eterofermentanti facoltativi sono capaci di fermentare gli esosi producendo acido lattico e in determinate condizioni acido acetico, acido formico e etanolo, corrispondono ai Streptobatteri di Orla-Jensen, microrganismi mesofili con temperature ottimali di crescita comprese tra 30 e 37°C. Specie appartenenti a questo gruppo sono: *Lactobacillus alimentarius*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus sakei*. Infine, i lattobacilli eterofermentanti obbligati fermentano esclusivamente esosi producendo acido lattico, acido acetico, etanolo e CO<sub>2</sub> corrispondono ai Betabatteri di Orla-Jensen, caratterizzati per la capacità di produrre gas, in particolare CO<sub>2</sub>. Appartengono a questo gruppo microbico le specie *Lactobacillus fructosus*, *Lactobacillus bif fermentans*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus fructivorans*, *Lactobacillus viridescens* e *Lactobacillus reuteri*.

### ➤ Genere *Pediococcus*

Il genere *Pediococcus* comprende cocci con cellule disposte a tetradi, mesofili con optimum di temperatura piuttosto elevato (superiore a 40 °C), omofermentanti obbligati, alotolleranti e acidotolleranti. Specie importanti dal punto di vista alimentare sono *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* importanti nella

produzione rispettivamente dei formaggi a lunga stagionatura e degli impasti acidi. Alcune specie possono essere agenti alteranti in alimenti fermentati come birra, vino e semiconserve di vegetali.

➤ *Genere Streptococcus*

Il genere *Streptococcus* comprende cocchi disposti a coppie o a catenelle, termofili, omofermentanti obbligati. Fanno parte di questo genere specie saprofitiche o patogene per l'uomo e gli animali, l'unica specie importante nel settore alimentare è *Streptococcus thermophilus*, considerata come una delle specie protecnologiche per eccellenza, è normalmente associata a prodotti lattiero-caseari e normalmente usato come starter commerciale per la produzione di yogurt e formaggi.

➤ *Genere Lactococcus*

Genere costituito da cocchi omofermentanti obbligati, comprende poche specie e tra queste solo tre sono importanti dal punto di vista tecnologico nel settore lattiero-caseario. Le specie *Lactococcus lactis* e *Lactococcus cremoris* normalmente utilizzati per la produzione di burro e formaggi freschi e molli, e la specie *Lactococcus lactis* var. *diacetylactis* usata nella produzione di creme aromatizzate.

➤ *Genere Leuconostoc*

Genere rappresentato da cocchi ovoidali eterofermentanti obbligati, psicrotrofi e poco acidofili; nonostante mostri esigenze nutrizionali complesse è molto diffuso in natura, soprattutto a livello dei substrati di origine vegetale. I membri del genere *Leuconostoc* si caratterizzano per la loro capacità di fermentare il citrato, producendo così diacetile, molecola importante come aromatizzante in molti prodotti. Numerose sono le specie protecnologiche appartenenti a questo genere microbico, in particolare le specie *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc citrovorum* e *Leuconostoc dextranicum* sono importanti nel settore lattiero-caseario per la produzione di burro e alcuni formaggi freschi, mentre, le specie *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc citreum* sono importanti nel settore della panificazione in quanto presenti a livello di impasti acidi.

Caratteristica peculiare di alcune specie riguarda la produzione di elevate quantità di esopolisaccaridi, in particolare destrano, in grado di definire un aumento della viscosità del prodotto finito.

➤ *Genere Oenococcus*

Genere microbico precedentemente classificato come *Leuconostoc*, è rappresentato da un'unica specie *Oenococcus oeni* responsabile della fermentazione malolattica nel vino. In particolare, *O. oeni* è sfruttato per la produzione di starter commerciali atti a garantire un rapido avvio ed un'efficace conclusione della fermentazione, definendo in tal modo il profilo organolettico del vino stesso.

➤ *Genere Weissella*

Il genere *Weissella* comprende esclusivamente sei specie eterofermentanti obbligate generalmente non impiegate come starter nel settore alimentare precedentemente classificate nei generi *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Alcune specie sono associate a prodotti di origine carnei in relazione alla loro capacità di svilupparsi a basse temperature e in particolare la specie *Weissella hellenica* è stata associata alla produzione di salsicce greche.

➤ *Genere Enterococcus*

Il genere è costituito da cocchi ovoidali omofermentanti, la cui presenza in campioni di acqua, prodotti carnei e prodotti di origine vegetale è considerata indice di contaminazione fecale, mentre in prodotti quali latte e derivati come il formaggio sono considerati parte normale della microflora risultando importanti nelle fasi di stagionatura.

Due sono le specie principali *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium*, entrambe le specie sono responsabili della produzione di ammine biogene, in particolare istamina e tiramina, e per questo cariche microbiche superiore a  $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> sono da considerarsi pericolose per la salute del consumatore in relazione all'insorgenza di possibili fenomeni di intossicazione.

➤ *Genere Carnobacterium*

Il genere *Carnobacterium*, precedentemente classificato come *Lactobacillus*, è costituito da batteri psicrofili, eterofermentanti obbligati, non acido-resistenti. Si caratterizzano per la capacità di produrre sostanze antimicrobiche come le carnocine, con attività inibente nei confronti di microrganismi alterativi e patogeni. Possono svilupparsi sulle carni refrigerate e confezionate in atmosfera protetta.

### 3.1.2. Ruolo dei batteri lattici nei prodotti fermentati

I batteri lattici sono considerati tra le specie microbiche più importanti nel settore dell'industria alimentare, seppur esistono delle specie alterative per alcune classi di alimenti (Johnson-Green, 2002), dell'industria chimica, farmaceutica e nella produzione biotecnologica dell'acido lattico utilizzato nell'industria petrolchimica (Hamdan & Sonomoto, 2011). In particolare, nell'industria alimentare, la fermentazione operata dai batteri lattici determina un miglioramento del valore nutrizionale, delle proprietà sensoriali e funzionali delle materie prime. Il processo fermentativo è sfruttato ad, esempio nel caso dei cereali per ridurre il contenuto di elementi antinutrizionali come i fitati e i tannini o per il miglioramento della biodisponibilità di micronutrienti (Hotz & Gibson, 2007).

Il ruolo dei batteri lattici nell'ambito della produzione di cibi fermentati è stato ampiamente valutato e molti ricercatori hanno evidenziato un'importante azione di questi batteri nei confronti della salute umana. Ad esempio, alcune specie di batteri lattici, associate a cibi fermentati, sono note per la produzione, in alcuni casi ceppo-dipendente, di composti bioattivi ad azione antimicrobica quali, ad esempio, perossido di idrogeno, acidi organici e batteriocine (Florou-Paneri *et al.*, 2013, Mokoena *et al.*, 2016). Altre specie includono ceppi probiotici, con effetti benefici sulla salute dell'intestino umano e per questo utilizzati nelle preparazioni farmaceutiche e/o alimentari (Mokoena *et al.*, 2016). Alcuni ceppi di batteri lattici sono, invece, in grado di stimolare e regolare la risposta immunitaria naturale ed acquisita (Toma & Pokrotnieks, 2006), mentre recenti studi hanno evidenziato possibili effetti benefici di questi microrganismi nei confronti di infezioni della cavità orale (Meurman, 2005; Galgano *et al.*, 2012; Jain & Sharma 2012).

#### ➤ Batteri lattici come agenti probiotici

I batteri lattici rappresentano una componente microbica molto importante nell'ambito del microbiota intestinale umano, promuovendo importanti effetti benefici a livello del tratto gastrointestinale. Specie probiotiche appartenenti ai generi microbici *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Leuconostoc* sono state selezionate e sfruttate per la produzione di prodotti fermentati, yogurt, latte fermentato e alimenti e bevande con effetti benefici sull'intestino. La naturale presenza o l'aggiunta selettiva di probiotici negli alimenti ha lo scopo di migliorare le caratteristiche nutrizionale degli stessi, stimolando il microbiota

intestinale e le difese dell'organismo nei confronti di agenti patogeni (Toma & Pokrotnieks, 2006; Bonifait *et al.*, 2009; Kore *et al.*, 2012). L'azione di molti probiotici, in particolare, si esplica attraverso una colonizzazione transitoria del tratto gastrointestinale atta a favorire la modulazione del microbiota indigeno dell'organismo, mediata dall'adesione all'epitelio intestinale e l'incremento dell'azione barriera della mucosa intestinale nei confronti di agenti patogeni quali *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. (Sherman *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008). Le proprietà funzionali dei probiotici sono state dimostrate in varie applicazioni terapeutiche, seppur tali proprietà sono spesso identificate per essere ceppo-specifiche, in tal contesto, ad esempio, ceppi quali *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus casei* Shirota sono stati identificati per la loro efficienza nella gestione dei casi di intolleranza al lattosio, di diarrea causata da infezione da rotavirus e di diarrea associata a trattamenti antibiotici (Shah, 2007).

I batteri lattici ad azione probiotica sono, inoltre, molto importanti nella stimolazione e regolazione delle difese immunitarie naturali o acquisite. Uno studio condotta da Selhub e collaboratori (2014) ha identificato un'azione indiretta dei probiotici sulla salute mentale dell'uomo; infatti, gli agenti probiotici stimolando la corretta funzionalità intestinale, induce la produzione di composti bioattivi e neuropeptidi che possono in parte influenzare il benessere psicologico.

#### ➤ *Produzione di molecole bioattive*

I batteri lattici si caratterizzano per la produzione di molecole bioattive con azione antimicrobica, in particolare alcuni ceppi si caratterizzano per la produzione di molecole ad azione non specifica quali acidi grassi a corta catena, perossido di idrogeno, mentre altri si caratterizzano per la produzione di molecole ad azione specifica come le batteriocine (Gillor *et al.*, 2008).

Gli acidi grassi a corta catena (acido formico, acetico, propionico, butirrico e lattico) prodotti durante la fermentazione dei carboidrati, determinano una riduzione del pH inducendo una forte azione antimicrobica nei confronti di microrganismi patogeni e funghi (Schnurer & Magnusson, 2005), così come il perossido di idrogeno esplica un'analoga azione inibente nei confronti di agenti esogeni (Falagas *et al.*, 2007).

Le batteriocine sono un gruppo eterogeneo di piccoli peptidi costituiti da 30/60 amminoacidi attivi generalmente nei confronti di batteri Gram-positivi (Holzapfel *et al.*, 1995). Le batteriocine possono esplicare

un'azione batteriostatica o battericida in relazione a fattori quali: dosi prodotte, purezza delle batteriocine stesse e stato fisiologico delle cellule bersaglio (Cintas *et al.*, 2001). Le batteriocine possono essere applicate come conservanti alimentari in relazione alle loro caratteristiche peculiari quali, ad esempio, la natura proteica, l'assenza di tossicità, la termoresistenza e l'azione mirata sulla membrana cellulare (Juodeikiene *et al.*, 2012; Galvez *et al.*, 2007). L'uso di batteriocine nell'industria alimentare risulta utile ed importante in relazione all'estensione della *shelf life* dei prodotti, alla riduzione del rischio di trasmissione di patogeni, alla riduzione delle perdite economiche correlate al deterioramento dei prodotti alimentari, alla riduzione dei conservanti, alla riduzione dei trattamenti termici con conseguente miglioramento delle caratteristiche nutrizionali e sensoriali dei prodotti fermentati e alla possibilità di commercializzazione di nuovi prodotti funzionali a ridotto contenuto di acido e sale ed a elevato contenuto di acqua (Galvez *et al.*, 2007).

#### ➤ *Produzione di vitamine ed enzimi*

I batteri lattici sono in grado di produrre vitamine essenziali per la salute umana come la vitamina B9 (folato), vitamina B12 (cobalamina), vitamina K e vitamina B2 (riboflavina) (O'Connor *et al.*, 2005; LeBlanc *et al.*, 2011). La produzione di vitamine è un aspetto molto importante soprattutto per l'industria alimentare, in relazione alla possibilità di commercializzare alimenti funzionali ricchi in vitamine utili per coadiuvare il trattamento di patologie specifiche come ad esempio: osteoporosi e malattie cardiache causate da un deficit di vitamina B9 (LeBlanc *et al.*, 2007); anemia perniziosa o disturbi del sistema nervoso causati dal deficit di vitamina B12 (Molina *et al.*, 2008); emorragie intracraniche neonatali e fratture ossee causate da carenza di vitamina K (LeBlanc *et al.*, 2011); danni al fegato causati dal deficit di vitamina B2 (O'Connor *et al.*, 2005). La produzione di enzimi è un altro aspetto molto importante soprattutto in relazione all'azione sinergica svolta da queste molecole sulla digestione e i sintomi del malassorbimento intestinale (Naidu *et al.*, 1999). Gli enzimi prodotti dai batteri lattici risultano, inoltre, molto importanti nelle produzioni alimentari grazie alla definizione di caratteristiche sensoriali ed aromatiche specifiche in pane, formaggi, vino ed altri prodotti fermentati (Flou-Paneri *et al.*, 2013).

### ➤ *Produzione di esopolisaccaridi*

La produzione di esopolisaccaridi da parte di batteri lattici è stata fonte di interesse per molti ricercatori. Questi biopolimeri sono stati ampiamente valutati nell'industria alimentare per il miglioramento delle caratteristiche di elasticità e viscosità di molti prodotti, come agenti gelificanti e stabilizzanti naturali, nell'industria farmaceutica e nell'industria chimica (Florou-Paneri *et al.*, 2013). Oltre ad avere aspetti positivi dal punto di vista tecnologico, alcuni esopolisaccaridi prodotti dai batteri lattici hanno mostrato effetti fisiologici benefici sulla salute dei consumatori. In particolare, infatti, aumentando la viscosità degli alimenti permette una maggiore permanenza nel tratto gastro-intestinale favorendo così la colonizzazione dei batteri probiotici (Duboc & Mollet 2001). Inoltre, la produzione di esopolisaccaridi sembra mostrare un'attività anti-tumorale, anti-ulcerosa, immuno-modulatrice e di abbassamento del colesterolo (Zhang *et al.*, 2011).

### ➤ *Produzione di dolcificanti*

Negli ultimi anni, molto interesse da parte di ricercatori, industrie e consumatori è nato nei confronti di sostanze zuccherine a basso indice calorico prodotte da batteri lattici. Polioli come mannitolo, sorbitolo e xilitolo sono risultati appropriati agenti dolcificanti per la produzione di alimenti destinati al consumo da parte di soggetti diabetici, caramelle senza zucchero, biscotti e *chewing gum* (Patra *et al.*, 2009; Monedero *et al.*, 2010). L'uso di questi biopolimeri come dolcificanti naturali è considerato un aspetto importante nell'alimentazione anche di bambini e soggetti a regime alimentare controllato in relazione al basso contenuto calorico e all'azione prebiotica (Patra *et al.*, 2009; Monedero *et al.*, 2010).

### *3.1.3. Batteri lattici come starter*

I batteri lattici sono da moltissimo tempo sfruttati nell'industria alimentare per la produzione di alimenti e bevande fermentate in relazione alla capacità di apportare miglioramenti nutrizionali, organolettici e in alcuni casi tecnologici. L'uso di batteri lattici come starter commerciali inoltre, permette non solo di ottenere i vantaggi legati al metabolismo stesso dei microrganismi ma permette soprattutto di ottenere un elevato controllo del processo di fermentazione e una standardizzazione del prodotto produttivo molto importante a livello industriali (Leroy & De Vuyst, 2004). Gli starter, utilizzati a livello industriale, possono essere disponibili in

forma congelata, refrigerata o liofilizzata (Joosten *et al.*, 1995) e usati direttamente per l'inoculo delle matrici da sottoporre a fermentazione guidata (Caplice & Fitzgerald, 1999). Caratteristiche che rendono una specie o un ceppo consono all'applicazione come starter commerciale risultano essere: i) elevata capacità di crescita su mezzo di coltura, al fine di aumentare la carica microbica totale; ii) elevata resistenza a temperature di congelamento ed essiccazione; iii) elevata acido-tolleranza, che garantisce sopravvivenza durante il transito a livello gastro-intestinale (Tamine *et al.*, 2005).

Seppur esistano già molteplici colture starter in commercio, la scienza è continuamente alla ricerca di nuove specie o ceppi con caratteristiche sempre più favorevoli non solo allo sviluppo, al controllo e alla sicurezza del processo produttivo, ma che siano in grado di conferire caratteristiche nutrizionali di pregio sempre più elevate. Proprio in questo contesto, si spiega la crescente attenzione alla commercializzazione di starter commerciale con caratteristiche probiotiche utilizzabili nella produzione di yogurt, bevande a base di yogurt, prodotti per neonati, prodotti carnei fermentati, integratori alimentari, ecc (Hansen, 2002).

#### *4. Prodotti fermentati*

Ad oggi, più di 5000 varietà di cibi e bevande fermentate, localmente o globalmente diffuse, sono prodotte e consumate nel mondo come alimenti base o componenti di cibi più complessi (Tamang, 2010a).

Sulla base delle materie prime utilizzate per la produzione di cibi e bevande fermentate, possono essere identificati nove gruppi di alimenti: prodotti fermentati a base di cereali, germogli di bambù e vegetali, legumi, radici e/o tuberi, latte e derivati, carne, pesce, prodotti vari e bevande alcoliche (Steinkraus, 1997; Tamang, 2010 a,b).

##### *4.1. Prodotti fermentati a base di latte*

I cibi e le bevande fermentate a base di latte possono essere suddivisi sulla base dei microrganismi coinvolti nel processo fermentativo in alimenti ottenuti ad opera esclusiva di batteri lattici o ad opera simultanea di funghi e batteri lattici. In particolare, nella prima categoria possono essere annoverati yogurt, burro, latte fermentato naturalmente ecc., mentre sono compresi nella seconda categoria formaggio, *kefir*, *koumiss*, *viili* ecc (Tamang *et al.*, 2016). Il formaggio e i suoi derivati rappresentano l'alimento più importante dal punto di vista

nutrizionale ed economico tra i prodotti fermentati a base di latte (De Ramesh *et al.*, 2006). La fermentazione di latte e di suoi derivati è generalmente condotta da due diverse tipologie di colture starter; la prima coinvolta nel processo iniziale di acidificazione della matrice, costituita generalmente dalle specie *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Leuconostoc* spp., e *Streptococcus thermophilus* (Parente & Cogan, 2004), la seconda responsabile della definizione delle caratteristiche organolettiche e strutturali del formaggio durante la maturazione è costituita dalle specie *Brevibacterium linens*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium camemberti* e *Penicillium roqueforti* (Coppola *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2011).

#### 4.2. Prodotti fermentati a base di cereali

I prodotti fermentati a base di cereali sono diffusi in tutto il mondo, ad esempio in Asia il cereale più utilizzato è il riso, mentre in Europa, America e Australia molto utilizzati sono frumento, segale, orzo e mais, i quali vengono sottoposti o a fermentazione naturale o a fermentazione guidata (Tamang *et al.*, 20016). Nel continente africano, molti prodotti fermentati a base di cereali sono utilizzati durante lo svezzamento dei neonati o come alimentazione base o complementare nei bambini e adolescenti (Tou *et al.*, 2007). Pratica molto diffusa in Europa risulta essere la produzione di pane senza aggiunta di lievito commerciale, utilizzando esclusivamente impasto acido (Hammes & Ganzle, 1998; Brandt, 2007; De Vuyst *et al.*, 2009).

La fermentazione dei cereali può essere condotta da lieviti e batteri lattici, singolarmente o in mix, e i generi più frequentemente isolati sono *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* tra i batteri (de Vuyst *et al.*, 2009; Guyot, 2010; Moroni *et al.*, 2011), e *Saccharomyces*, *Candida*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kazachstania*, *Pichia*, *Trichosporon*, e *Yarrowia* tra i lieviti (Iacumin *et al.*, 2009; Weckx *et al.*, 2010; Johnson & Echavarri-Erasun, 2011).

#### 4.3. Prodotti fermentati a base di vegetali

In Asia e in vari paesi europei, molti sono i vegetali sottoposti a fermentazione al fine di prolungare la *shelf life* ed evitare così fenomeni di deperimento, tra questi verdure a foglia larga, cavoli, cetrioli, ravanelli, germogli di bambù, cipolle e senape sono i più diffusi (Tamang *et al.*, 20016; Liu & Tong, 2017). La fermentazione dei vegetali è generalmente condotta dai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus*, altri generi che possono essere coinvolti nel processo sono *Leuconostoc*, *Weissella*, *Tetragenococcus* e *Lactococcus*

#### 4.4. Prodotti fermentati a base di semi di soia e legumi

L'uso della soia nella produzione di alimenti fermentati è diffuso in Asia fin dall'antichità (Tamang, 2015), ma nell'ultimo decennio la diffusione di questi prodotti è aumentata notevolmente in tutto il mondo in relazione al suo utilizzo come sostituto del latte e dei suoi derivati (Battistini *et al.*, 2017). La fermentazione della soia può essere operata o da batteri del genere *Bacillus* o da muffe filamentose appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* (Tamang, 2010a).

#### 4.5. Prodotti fermentati a base di radici e tuberi

Un tubero comunemente usato soprattutto nel continente africano, in Brasile, Malesia e Indonesia è la manioca o cassava, una pianta originaria del Sudamerica caratterizzata da una radice tuberizzata commestibile, ad elevato contenuto di amido. La tecnica di produzione di derivati fermentati di questo tubero prevede in primo luogo una fermentazione ad opera di *Corynebacterium manihot* (Oyewole *et al.*, 2004) seguita poi dalla fermentazione ad opera di *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus plantarum* (Oguntinyinbo & Dodd, 2010).

#### 4.6. Prodotti fermentati a base di carne

I prodotti a base di carne fermentati ad opera di batteri lattici, stafilococchi coagulasi-negativi, micrococchi ed Enterobacteriaceae sono diffusi in tutto il mondo con nomi e caratteristiche peculiari. Il consumo di carne e suoi derivati è ampiamente diffuso per le caratteristiche nutrizionali di questi alimenti, fonte di proteine, grassi, aminoacidi, minerali e vitamine (Biesalski, 2005); nel ultimo decennio però l'attenzione si è spostata molto

sui problemi di sicurezza alimentare, etici e sanitari legati al consumo di questi prodotti e molte ricerche sono state condotte al fine di ottenere prodotti di alta qualità e sicuri con aggiunta minima o nulla di additivi chimici (Ojha *et al.*, 2015).

#### 4.7. *Prodotti fermentati a base di pesce*

La fermentazione del pesce è una delle tecniche tradizionalmente utilizzate, assieme a processi quali essiccazione al sole o l'affumicatura e la salatura, soprattutto nelle zone costiere o a ridosso di laghi e fiumi soprattutto in paesi come Filippini, India, Corea, Indonesia, Vietnam, Giappone, Tailandia, Malesia e Svezia (Tamang *et al.*, 2017). Innumerevoli sono le specie responsabili della fermentazione dei prodotti ittici ascrivibili a moltissimi generi diversi tra i quali possono essere annoverati *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, ecc. (Tamang *et al.*, 2017).

#### 4.8. *Bevande fermentate*

Nel mondo tantissime bevande alcoliche e non alcoliche fermentate vengono prodotte a partire da matrici molto diverse tra loro. Bevande alcoliche prodotte in aree geografiche ben definite possono essere rappresentate da bevande non filtrate e non distillate (*bhaati jaanr*, *mkgeolli*), filtrate e non distillate (*sakè*), distillate (*shochu*, *soju*), mentre altre diffuse in tutto il mondo possono essere rappresentate da vino, birra, sidro, whisky e brandy. Un ampio numero di bevande fermentate a base di cereali è diffuso in molte regioni del mondo e negli ultimi anni, lo sviluppo di bevande funzionali con proprietà organolettiche e nutrizionali di pregio ha attratto l'interesse della comunità scientifica, con particolare interesse alla produzione di bevande fermentate non alcoliche a base di cereali (Coda *et al.*, 2017; Kohajdová, 2017; Gupta & Bajaj, 2017; Freire *et al.*, 2017).

#### 4.9. *Prodotti fermentati vari*

Oltre alle classi appena descritte, molti sono i cibi fermentati di varia natura prodotti e consumati in zone diverse del mondo, alcuni di essi sono tipici di zone geografiche definite e il loro consumo è limitato soprattutto in Africa, Asia e Cina, mentre altri sono oggi a diffusione mondiale. Né sono un esempio evidente l'aceto di vino (Solieri & Giudici, 2008), il tè nero (Tanasupawat *et al.*, 2007; Mo *et al.*, 2008) e il cioccolato

(Lefeber *et al.*, 2010; Papalexandratou *et al.*, 2011) ottenuti attraverso processi di fermentazione naturale delle materie prime (Tamang *et al.*, 2017).

Concludendo è possibile affermare che i batteri lattici sono promettenti fonti di nuovi prodotti e applicazioni soprattutto nella produzione di alimenti fermentati che possano soddisfare le crescenti richieste dei consumatori per un'alimentazione sana e naturale, che prevede il consumo di cibi funzionali specifici anche in risposta di stili nutrizionali specifici. L'uso di batteri lattici inoltre non è da considerarsi limitatamente alla nutrizione umana in quanto questi possono essere sfruttati anche per la definizione di un profilo nutrizionale specifico anche negli animali domestici.

Nonostante gli innumerevoli progressi, lo studio dei batteri lattici, delle loro proprietà specifiche e delle possibili applicazioni tecnologiche è ancora un campo emergente di ricerca che deve ancora realizzare il suo pieno potenziale.

## Bibliografia

- Axelsson, L., Rud, I., Naterstad, K., Blom, H., Renckens, B., Boekhorst, J., Kleerebezem, M., Van Hijum, S., Siezen, R.J. 2012. Genome sequence of the naturally plasmid-free *Lactobacillus plantarum* strain NC8 (CCUG61730). *Journal of Bacteriology* 194: 2391-2392.
- Battistini, C., Gullón, B., Sayuri Ichimura, E., Pereira Gomez, A.M., Ribeiro, E.P., Kunigk, L., Vieira Moreira, J.U., Jurkiewicz, C. 2017. Development and characterization of an innovative synbiotic fermented beverage based on vegetable soybean. *Brazilian Journal of Microbiology*. In Press. doi.org/10.1016/j.bjm.2017.08.006.
- Biesalski, H.K. 2005. Meat as a component of a healthy diet-are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science* 70:509-524. 1.
- Billings, T. 1998. On fermented foods. Available: <http://www.livingfoods.com>.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverage. *Food Research International* 36:527-543.
- Bol, J., de Vos, W.M. 1997. Fermented foods: an overview. In J. Green (Ed.), *Biotechnological innovations in food processing*. Oxford: Butterworth-Heinemann. 45-76.
- Bonifait, L., Chandad, F., Grenier, D. 2009. Probiotics for oral health: myth or reality. *JCDA* 75:585-590.
- Brandt, M.J. 2007. Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology* 24:161-164.
- Campbell-Platt, G. 1994. Fermented foods - a world perspective. *Food Research International* 27:253-257
- Caplice, E., Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50:131-149.
- Chavan, J.K., Kadam, S.S. 1989. Critical reviews in food science and nutrition. *Food Science* 28:348-400.
- Chen, B., Wu, Q., and Xu, Y. 2014. Filamentous fungal diversity and community structure associated with the solid state fermentation of Chinese Maotai-flavor liquor. *International Journal of Food Microbiology* 179:80-84.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernandez, P.E. 2001. Review: Bacteriocins Of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International* 7:281-305.
- Coda, R., Montemurro, M., Rizzello, C.G. 2017. Yogurt-Like Beverages Made With Cereals. *Yogurt in Health and Disease Prevention*, Chapter 10: 183-201
- Coppola, S., Fusco, V., Andolfi, R., Aponte, M., Blaiotta, G., Ercolini, D., Moschetti, G. 2006. Evaluation of microbial diversity during the manufacture of Fior di Latte di Agerola, a traditional raw milk pasta-filata cheese of the Naples area. *Journal of Dairy Research* 73:264-272.
- De Ramesh, C.C., White, C.H., Kilara, A., Hui Y.H. 2006. Manufacturing Yogurt and fermented milks. Oxford, Black well Publishing.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S. 2009. Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology* 26:666-675.
- Duboc, P., Mollet, B. 2001. Application Of Exopolysaccharides In The Dairy Industry. *International Dairy Journal* 11:759-768.
- Falagas, M.E., Betsi, G.I., Athanasiou, S. 2007. Probiotics For The Treatment Of Women With Bacterial Vaginosis. *Clinical Microbiology and Infection* 13:657-664.
- Florou-Paneri, P., Christaki, E., Bonos, E. 2013. Lactic Acid Bacteria as Source of Functional Ingredients. *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. Chapter 25.

- Franz, C.M., Huch, M., Mathara, J.M., Abriouel, H., Benomar, N., Reid, G., Galvez, A., Holzapfel, W.H. 2014. African fermented foods and probiotics. *International Journal of Food Microbiology* 190:84-96.
- Freire, A.L., Lacerda Ramos, C., da Costa Souza, P.N., Cardoso, M.G.B., Schwan, R.F. 2017. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *International Journal of Food Microbiology* 248: 39-46.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R.L., Omar, N.B. 2007. Bacteriocin-Based Strategies For Food Biopreservation. *International Journal of Food Microbiology* 120:51-70.
- Gillor, O., Etzion, A., Riley, M.A. 2008. The Dual Role Of Bacteriocins As Anti- And Probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 81:591-606.
- Gupta, M., Bajaj, B.K. 2017. Development of fermented oat flour beverage as a potential probiotic vehicle. *Food Bioscience* 20: 104-109.
- Guyot, J.P. 2010. Fermented cereal products. *Fermented Foods and Beverages of the World*, eds J.P. Tamang and K. Kailasapathy (New York, NY: CRC Press, Taylor and Francis Group). 247-261.
- Hamdan, A.M., Sonomoto, K. 2011. Production Of Optically Pure Lactic Acid For Bioplastics. In: Sonomoto K, Yokota A, editors. *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria: Current Progress in Advanced Research*. Caister Academic Press, Portland, USA.
- Hammes, W.P., Ganzle M.G. 1998. Sourdough breads and related products. in *Microbiology of fermented foods*, 2<sup>nd</sup> Edn., ed B.J.B. Wood (Glasgow:Blackie Academic and Professional. 199-216.
- Hansen, E.B. 2002. Commercial Bacterial Starter Cultures For Fermented Food Of The Future. *International Journal of Food Microbiology* 78:119-131.
- Hesseltine, C.W. 1979. Some important fermented foods of Mid-Asia, the Middle East, and Africa. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 56:367-374.
- Holzapfel, W.H. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8:241-258.
- Holzapfel, W.H., Geisen, R., Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24:343-62.
- Holzapfel, W.H., Wood, B.J.B. 2014. *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*. New York, NY: Wiley-Blackwell, 632.
- Hotz, C., Gibson, R.S. 2007. Traditional food-processing and preparation practices to enhance the bioavailability of micronutrients in plant-based diets. *Journal of Nutrition* 137:1097-1100.
- Iacumin, L., Cecchini, F., Manzano, M., Osualdini, M., Boscolo, D., Orlic, S., Comi, G. 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 26:128-135.
- Johnson, E.A., Echavarri-Erasun, C. 2011. Yeast Biotechnology. in *The Yeasts: A Taxonomic Study* 5<sup>th</sup> Edn., Vol. I, eds C. Kurtzman, J. W. Fell, and T. Boekhout (Amsterdam:Elsevier). 23.
- Johnson-Green, P. 2002. Introduction To Food Biotechnology. *CRC Press*, Boca Raton.
- Joosten, H.M.L.J., Gaya, P., Nunez, M. 1995. Isolation Of Tyrosin Decarboxylaseless Mutants Of A Bacteriocin-Producing Enterococcus Faecalis Strain And Their Application In Cheese. *Journal of Food Protection* 58:1222-1226.
- Juodeikiene, G., Bartkiene, E., Viskelis, P., Urbonaviciene, D., Eidukonyte, D., Bobinas, C. 2012. Fermentation processes using lactic acid bacteria producing bacteriocins for preservation and improving functional properties of food products. In: Petre M, editor. *Advances in applied biotechnology*. Intech, Croatia. 63-100.

- Kohajdová, Z. 2017. Fermented Cereal Products. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering. *Food and Beverages Industry*. Chapter 4: 91-117.
- Kore, K.B., Pattanaik, A.K., Sharma, A.K., Marajkar, P.P. 2012. Effect of feeding traditionally prepared fermented milk dahi (curd) as probiotics on nutritional status, hindgut health and haematology in dogs. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 11:35-49.
- LeBlanc, J.G., de Giori, G.S., Smid, E.J., Hugenholtz, J., Sesma, F. 2007. Folate Production By Lactic Acid Bacteria And Other Food-Grade Microorganisms. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* 1:329-339.
- LeBlanc, J.G., Laino, J.E., Juarez del Valle, M., Vannini, V., van Sinderen, D., Taranto, M.P., Font de Valdez, G., Savoy de Giori, G. 2011. B-Group Vitamin Production By Lactic Acid Bacteria – Current Knowledge And Potential Applications. *Journal of Applied Microbiology* 111:1297-1309.
- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N., De Vuyst, L. 2010. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 76:7708-7716.
- Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic Acid Bacteria As Functional Starter Cultures For The Food Fermentation Industry. *Trends in Food Science & Technology* 15:67-78.
- Lin, C.K., Tsai, H.C., Lin, P.P., Tsen, H.Y., Tsai, C.C. 2008. *Lactobacillus Acidophilus* LAP5 Able To Inhibit The *Salmonella Cholerasuis* Invasion To The Human Caco-2 Epithelial Cell. *Anaerobe*. 14:251-255.
- Liu, D., Tong, C. 2017. Bacterial community diversity of traditional fermented vegetables in China. *LWT - Food Science and Technology* 86:40-48.
- Ly, X.-C., Huang, X.-L., Zhang, W., Rao, P.-F., Ni, L. 2013. Yeast diversity of traditional alcohol fermentation starters for Hong Qu glutinous rice wine brewing, revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Control* 34:183-190.
- Mo, H., Zhu, Y., and Chen, Z. 2008. Microbial fermented tea – a potential source of natural food preservatives. *Trends in Food Science & Technology* 19:124-130.
- Mokoena, M.P., Mutanda, T., Olaniran, A.O. 2016. Perspectives on the probiotic potential of lactic acid bacteria from African traditional fermented foods and beverages. *Food & Nutrition Research* 60: 29630.
- Molina, V., Medici, M., Taranto, M.P., Font de Valdez, G. 2008. Effects Of Maternal Vitamin B12 Deficiency From End Of Gestation To Weaning On The Growth And Haematological And Immunological Parameters In Mouse Dams And Offspring. *Archives of Animal Nutrition* 62:162-168.
- Monedero, V., Perez-Martínez, G., Yebra, M.J. 2010. Perspectives Of Engineering Lactic Acid Bacteria For Biotechnological Polyol Production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 86:1003–1015.
- Moroni, A.V., Arendt, E.K., Bello, F.D. 2011. Biodiversity of lactic acid bacteria and yeasts in spontaneously-fermented buckwheat and teff sourdoughs. *Food Microbiology* 28:497-502.
- Moroni, A.V., Dal Bello, F., Arendt, E.K. 2009. Sourdough in gluten-free bread-making: an ancient technology to solve a novel issue? *Food Microbiology* 26:676-684.
- Naidu, A.S., Bidlack, W.R., Clemens, R.A. 1999. Probiotic Spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 38:13-126.
- Nout, M. J. R., Aidoo, K. E. 2002. Asian fungal fermented food. in *The Mycota*, ed H. D. Osiewacz. 23-47. doi:
- O'Connor, E.B., Barrett, E., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C., Ross, R.P. 2005. Production Of Vitamins, Exopolysaccharides And Bacteriocins By Probiotic Bacteria. In: Tamime AY, editor. *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

- Oguntoyinbo, F.A., Dodd, C.E.R. 2010. Bacterial dynamics during the spontaneous fermentation of cassava dough in *gari* production. *Food Control* 21:306-312.
- Ojha, K.S., Kerry, J.P., Duffy, G., Beresford, T., Tiwari, B.K. 2015. Technological advances for enhancing quality and safety of fermented meat products. *Trends in Food Science & Technology* 44:105-16.
- Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. Mem. Acad. Roy. Sci. Danemark, Sect.sci., 8 ser., 5.
- Oyewole, O.B., Olatunji, O.O., Odunfa, S.A. 2004. A process technology for conversion of dried cassava chips into 'gari'. *Nigerian Food Journal* 22:65-76.
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P., and de Vuyst, L. 2011. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiology* 28:1326-1338.
- Parente, E., Cogan, T.M. 2004. Starter cultures: general aspects, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, 3<sup>rd</sup> Edn, ed P.O. Fox (Oxford:Elsevier). 123-147.
- Parkouda, C., Nielsen, D.S., Azokpota, P., Ouoba, L., Amoa-Awua, W.K., Thorsen, L., Hounhouigan, J.D., Jensen, J.S., Tano-Debrah, K., Diawara, B., Jakobsen, M. 2009. The microbiology of alkaline-fermentation of indigenous seeds used as food condiments in Africa and Asia. *Critical Reviews in Microbiology* 35:139-156.
- Patra, F., Tomar, S.K., Arora, S. 2009. Technological And Functional Applications Of Low-Calorie Sweeteners From Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Science* 74:16-21.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D. 2011. Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150:81-94.
- Salminen, S., Wright, A.V., Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. 3<sup>rd</sup> Edn., New York, NY: Marcel Dekker.
- Schnurer, J., Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology* 16: 0-78.
- Selhub, E.M., Logan, A.C., Bested, A.C. 2014. Fermented foods, microbiota, and mental health: ancient practice meets nutritional psychiatry. *Journal of Physiological Anthropology* 33:3.
- Shah, N.P. 2007. Functional Cultures And Health Benefits. *International Dairy Journal* 17:1262-1277.
- Sherman, P.M., Johnson-Henry, K.C., Yeung, H.P., Ngo, P.S.C., Goulet, J., Tompkins, T.A. 2005. Probiotics Reduce Enterohemorrhagic *Escherichia Coli* O157:H7- And Enteropathogenic *E. Coli* O127:H6-Induced Changes In Polarized T84 Epithelial Cell Monolayers By Reducing Bacterial Adhesion And Cytoskeletal Rearrangements. *Infection and Immunity* 73:5183-5188.
- Simango, C., 1997. Potential use of traditional fermented foods for weaning in Zimbabwe. *Social Science & Medicine* 44:1065-1068.
- Smid, E.J., Lacroix, C. 2013. Microbe – microbe interactions in mixed culture food fermentations. *Current Opinion in Biotechnology* 24:148-154.
- Solieri, L., Giudici, P. 2008. Yeasts associated to traditional balsamic vinegar: ecological and technological features. *International Journal of Food Microbiology* 125:36-45.
- Soni, S. K., Sandhu, D. K. 1990. Indian fermented foods: microbiological and biochemical aspects. *Indian Journal of Microbiology* 30:135-157.
- Steinkraus, H.K. 2002. Fermentations in world food processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* Vol. 1:23-32.
- Steinkraus, K.H. 1997. Classification of fermented foods: world wide review of household fermentation techniques. *Food Control* 8:331-17.

- Stevens, H.C., Nabors, L. 2009. Microbial food cultures: a regulatory update. *Food Technology* 63:36-41.
- Stiles, M.E., Holzapfel, W.H. 1997. Lactic Acid Bacteria Of Foods And Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36:1-29.
- Tamang, J. P., Fleet, G. H. 2009. Yeasts diversity in fermented foods and beverages. in *Yeasts Biotechnology: Diversity and Applications*, eds T. Satyanarayana, and G. Kunze. 169-198.
- Tamang, J.P. 2010 a. Diversity of fermented foods, Tamang JP, Kailasapathy, K. (Eds.) *Fermented Foods and Beverages of the World*, CRC Press, Taylorand Francis Group, New York. 41-84.
- Tamang, J.P. 2010 b. Diversity of fermented beverages, Tamang JP, Kailasapathy, K. (Eds.) *Fermented Foods and Beverages of the World*, CRC Press, Taylorand Francis Group, New York. 85–125.
- Tamang, J.P. 2015. Naturally fermented ethnic soybean foods of India. *Journal of Ethnic Foods* 2:8-17.
- Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzapfel, W.H. 2016. Review: Diversity of Microorganisms in Global Fermented Foods and Beverages. *Frontiers in Microbiology* 7:2-28.
- Tamine, A.Y., Saarela, M., Korslund Sondergaard, A., Mistry, V.V., Shah, N.P. 2005. Production And Maintenance Of Viability Of Probiotic Micro-organisms In Dairy Products. In: Tamine AY, editor. *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. pp. 39-72.
- Tanasupawat, S., Pakdeeto, A., Thawai, C., Yukphan, P., Okada, S. 2007. Identification of lactic acid bacteria from fermented tea leaves (miang) in Thailand and proposals of *Lactobacillus thailandensis* sp. nov., *Lactobacillus camelliae* sp. nov., and *Pediococcus siamensis* sp. nov. *The Journal of General and Applied Microbiology* 53:7-15.
- Toma, M.M., Pokrotnieks, J. 2006. Probiotics as functional food: microbiological and medical aspects. *Acta Universitatis Latviensis ser. Biology* 710:117-129.
- Tou, E.H., Mouquet-River, C., Rochette, I., Traoré, A.S., Treche, S., Guyot, J.P. 2007. Effect of different process combinations on the fermentation kinetics, microflora and energy density of *ben-saalga*, a fermented gruel from Burkina Faso. *Food Chemistry* 100:935-943.
- Walker P.M.B. 1988. *Chambers Science and Technology Dictionary*, Chambers, Cambrige University Press, UK.
- Wang, J., Fung, D.Y. 1996. Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. *Critical Reviews in Microbiology* 22:101-138.
- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T., Demberel, S. 2008. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in airag and tarag, traditional fermented milk products from Mongolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1313-1325.
- Weckx, S., Meulen, van der., Maes, R., Scheirlinck, D., Huys, I., Vandamme, G. P., De Vuyst, L. 2010. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology* 27:1000-1008.
- Zhang, Y., Li, S., Zhang, C., Luo, Y., Zhang, H., Yang, Z. 2011. Growth And Exopolysaccharide Production By *Lactobacillus Fermentum* F6 In Skim Milk. *African Journal of Biotechnology* 10:2080-2091.

## **Capitolo II – Tradizione: *formaggio Caciofiore della Sibilla***

## 1. Introduzione

### 1.1. Formaggio: cenni storici

Il termine “formaggio” deriva dalla parola greca “formos” che indicava il paniere di vimini nel quale veniva tipicamente riposto il latte cagliato per dargli la forma desiderata, il termine fu poi convertito dai romani in “forma” e successivamente dai francesi in “fromage”. L’origine del formaggio è strettamente legata a molte legende, tra le quali sicuramente la più nota è quella del mercante arabo, il quale dovendo attraversare il deserto decise di riporre del latte in un otre fatto con lo stomaco di pecora essiccato. Gli enzimi presenti nello stomaco, il caldo e i movimenti del viaggio indussero verosimilmente un’acidificazione del latte con conseguente coagulazione e formazione di piccoli grumi di formaggio.

Molti sono i testi che descrivono la produzione di prodotti lattiero-caseari fin dall’antichità, il formaggio, già presente nelle raffigurazioni dell’antico Egitto, venne descritto nell’Iliade e nell’Odissea da Omero, successivamente altri autori greci tra cui Erodoto (484 – 408 a.C.) e Aristotele (384 -322 a.C.) menzionarono l’uso di caglio vegetale nella produzione casearia (Fox & McSweeney, 2004).

La più completa descrizione del processo caseario fu data sicuramente da Lucius Junius Moderatus Columella, nel trattato di agricoltura “*De Re Rustica*” (50 a.C.). Nell’opera viene descritto in modo dettagliato un processo caseario del tutto analogo alle moderne tecniche di produzione di prodotti lattiero-caseari. In particolare, nel trattato vengono discussi differenti tipologie di caglio, tra i quali spicca l’uso di caglio vegetale ottenuto da *Cynara Cardunculus* e *Carthamus tinctorius* (Fox & McSweeney, 2004).

### 1.2. Flora microbica nei formaggi

I microrganismi sono componenti essenziali nel processo di caseificazione e giocano un ruolo cruciale durante la produzione e la stagionatura dei formaggi.

In particolar modo, infatti, mentre i processi tecnologici di produzione svolgono un ruolo chiave nella determinazione delle caratteristiche tecnologiche del formaggio, la microflora e le interazioni che si stabiliscono in essa rappresentano un punto critico e centrale nella definizione delle caratteristiche organolettiche peculiari per ogni specifico formaggio (Beresford *et al.*, 2001). Nelle fasi iniziali del processo di caseificazione, infatti, i batteri lattici starter, in particolare *Lactococcus lactis* e *Streptococcus thermophilus* inducono una rapidissima

acidificazione del latte permettendo in tal modo, nei giorni subito successivi, lo sviluppo di lieviti e muffe. Specie quali *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum* e *Penicillium camemberti* sono responsabili della colonizzazione della superficie del formaggio e della conseguente deacidificazione della superficie stessa consentendo in tal modo lo sviluppo di specie batteriche appartenenti alla flora microbica secondaria, quali *Arthobacter arilaitensis*, *Brevibacterium aurantiacum*, *Brevibacterium linens* e *Corynebacterium casei*, che risultano essere meno acido-tolleranti rispetto alla flora batterica iniziale.

La microflora del formaggio, in relazione alle peculiari proprietà metaboliche intrinseche, può essere suddivisa in due diversi gruppi: i) la flora microbica iniziale, rappresentata da batteri lattici, deputata alla produzione di acidi organici durante le prime fasi produttive e ii) la flora microbica secondaria, rappresentata da una gamma eterogenea di microrganismi, responsabile della stagionatura del prodotto (Beresford *et al.*, 2001).

#### *1.2.1. Flora microbica iniziale*

La flora microbica iniziale è rappresentata da batteri lattici appartenenti ai generi microbici *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ed *Enterococcus* responsabili dell'iniziale acidificazione del latte.

L'azione acidificante dei batteri lattici è strettamente correlata alla capacità di produrre acidi organici, prevalentemente acido lattico, in grado di indurre una riduzione del pH a valori inferiori a 5,3 in 6 ore ad una temperatura di 30-37 °C (Beresford *et al.* 2001). I batteri lattici iniziali si caratterizzano inoltre, per la produzione di composti aromatici, che definiscono le caratteristiche sensoriali del formaggio durante la stagionatura (Fox & Wallace, 1997).

Proprio sulla base delle capacità e velocità di acidificazione, di produrre sostanze aromatiche e sull'attività proteolitica, le specie microbiche appartenenti ai generi microbici citati possono essere utilizzati come starter commerciali per la produzione di formaggi. I batteri lattici, infatti, possono essere aggiunti deliberatamente durante il processo di caseificazione, come starter, o possono essere naturalmente presenti nel latte utilizzato. Generalmente durante la fase di produzione, la carica microbica si innalza fino a raggiungere concentrazioni di  $10^8$  UFC/g entro poche ore. La crescita microbica e l'equilibrio tra le varie specie di batteri lattici varia notevolmente tra la superficie e il nucleo del formaggio (Monfredini *et al.*, 2012) e soprattutto è strettamente legata alla natura e ai livelli iniziali dei ceppi microbici presenti (Charlet *et al.*, 2009).

### 1.2.2. Flora microbica secondaria

La flora microbica secondaria è costituita da batteri lattici, diversi da quelli appartenenti alla flora microbica primaria, batteri propionici, batteri corineformi, lieviti e muffe responsabili di tipiche proprietà strutturali e organolettiche durante la produzione e stagionatura del formaggio.

I batteri lattici facenti parte della flora microbica secondaria, sono rappresentati essenzialmente da pediococchi e lattobacilli mesofili caratteristici di molti formaggi durante il periodo di stagionatura; questi infatti non crescendo nel latte (Cogan *et al.*, 1997), non fanno parte della flora microbica iniziale e non contribuiscono dunque al processo di acidificazione. Nel formaggio sono generalmente presenti lattobacilli eterofermentanti facoltativi appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum/paraplantarum/pentosus*, *Lactobacillus graminis/curvatus*, *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*. Tra i pediococchi invece le specie più comunemente riscontrate sono *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus*.

I batteri propionici (PAB, *Propionic Acid Bacteria*) sono un gruppo di microrganismi legati in particolare alla produzione di formaggi svizzeri come Emmentaler e Gruyère, responsabili della formazione delle caratteristiche occhiature e delle peculiari proprietà strutturali ed organolettiche di questi formaggi. I batteri propionici sono batteri anaerobi che crescono bene nella pasta del formaggio, sono in grado di metabolizzare sia zuccheri sia acido lattico, inducendo la produzione di acido propionico, acido acetico e anidride carbonica (McSweeney, 2004). Avendo una bassa capacità proteolitica, il loro contributo durante la maturazione del formaggio è legato per lo più all'autolisi. I batteri propionici sono presenti nei formaggi appena prodotti con un ordine di grandezza attorno a  $10^3$  UFC g<sup>-1</sup> per poi raggiungere concentrazioni attorno a  $10^8$ - $10^9$  UFC g<sup>-1</sup> durante la stagionatura.

I batteri corineformi sono un gruppo microbico eterogeneo che comprende generi quali *Micrococcus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Arthrobacter*, caratterizzati dalla stretta aerobiosi che li rende microrganismi tipici della crosta. Questi microrganismi sono importanti soprattutto per la loro attività proteolitica e lipolitica, e contribuiscono alla maturazione del formaggio producendo composti aromatici.

I lieviti e le muffe svolgono un ruolo importante nella stagionatura di molti formaggi, grazie alla loro capacità di escrezione di fattori di crescita, quali vitamine; di metabolizzare il lattato agevolando così la crescita della

flora microbica secondaria, di produrre metaboliti alcalini e composti aromatici (Beresford *et al.*, 2001; Jacques & Casaregola, 2008; Panelli *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2015). Lo sviluppo di lieviti appartenenti ai generi *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces* e di muffe appartenenti ai generi *Penicillium* e *Geotrichum* è particolarmente importante nella produzione di alcuni formaggi tipici come Gorgonzola, Camembert e Brie.

Gli eumiceti possono però, anche agire come microrganismi *spoilage*, causando difetti quali gonfiore precoce, occhiature indesiderate, ammorbidimento della crosta, scolorimento superficiale e lo sviluppo di sapori sfavoriti (Fleet, 1990; Jakobsen & Narvhus, 1996; Carreira *et al.* 1998; Wyder *et al.*, 1999).

### 1.3. Formaggi a caglio vegetale

La produzione di formaggi ottenuti dalla coagulazione di latte crudo ovino o caprino, o da un mix di entrambi, con agenti coagulanti vegetali è ampiamente diffusa in molte area dell’Africa Occidentale (García *et al.*, 2012), dei paesi dell’America Latina (Fox, 1999) e del Mediterraneo, in particolare nella Penisola Iberica (Roseiro *et al.*, 2003) e in Italia (Aquilanti *et al.*, 2011). Svariate sono le specie vegetali utilizzate come caglio, a partire da frutta come ananas e papaya fino ad arrivare a vegetali come zucca e cardi (Roseiro *et al.*, 2003). Le specie vegetali più comunemente utilizzate appartengono al genere *Cynara*, in particolare tre sono le specie più frequentemente annoverate in letteratura *Cynara scolymus* L., *Cynara humilis* e soprattutto *Cynara cardunculus* L.

Molto apprezzati e studiati sono i formaggi ottenuti con l’estratto grezzo di quest’ultima specie soprattutto in Portogallo e Spagna dove formaggi quali la Serra da Estrela, la Serpa, l’Azeitao, La Serena, la Torta del Casar e il Los Pedroches sono prodotti inseriti nell’elenco dei formaggi di origine controllata (Protected Designation of Origin, PDO). I formaggi ottenuti con caglio vegetale sono generalmente prodotti in aziende casearie a conduzione familiare o artigianale, spesso situate in aree marginali (ad esempio pascoli di alta quota, terre secche o isole) la cui produzione è spesso legata all’andamento stagionale della matrice vegetale di partenza.

La tecnica di produzione del caglio vegetale, le quantità utilizzate e le modalità di caseificazione sono generalmente strettamente legate alle conoscenze del maestro casaro e per tanto spesso prevede protocolli piuttosto empirici (Roseiro *et al.*, 2003). Diversi studi sono stati condotti per valutare l’attività coagulante di caglio

vegetale di varia origine, e particolare interesse è stato rivolto al caglio vegetale ottenuto dalle foglie e dai fiori di *C. cardunculus* L. (Roseiro *et al.*, 2003). Gli estratti grezzi di fiori o foglie, a seconda del processo produttivo sfruttato, si caratterizzano per un'elevata termostabilità ed attività proteolitica (Fox, 1999) grazie alla presenza di proteasi aspartiche, in particolare 3 sono gli enzimi identificati come cinarasi 1, 2 e 3 (Heimgartner *et al.*, 1990). Altre importanti proteasi identificate negli estratti grezzi sono state le cardosine A e B con elevata specificità per le caseine (Roseiro *et al.*, 2003) le cardosine C e D, isolate successivamente da Pimentel e collaboratori (2007). L'elevata attività proteolitica dei cagli vegetali di cardo risulta essere un vantaggio per la produzione di formaggi prodotti da latte ovino, come dimostrato dalla forte produzione casearia nella Penisola Iberica, mentre si dimostra una forte limitazione nella produzione di formaggi a latte bovino in relazione alla comparsa di difetti di *texture* e sapore sgradevole del prodotto, legato verosimilmente ad una diversa natura della caseina bovina rispetto a quella ovina (Roseiro *et al.*, 2003). Aspetto molto importante risulta comunque legato alla quantità di caglio utilizzato nel processo tecnologico, questo fattore infatti influenza notevolmente il sapore finale del formaggio stesso, in quanto un eccesso di caglio può indurre un'eccessiva amarezza del prodotto finale.

#### *1.4. Formaggi Caciofiore*

Il termine *Caciofiore* si riferisce a formaggi italiani a pasta molle, tradizionalmente prodotti con latte crudo ovino crudo e un caglio vegetale ottenuto prevalentemente da fiori secchi di piante erbacee perenni originarie dell'area occidentale e centrale del Mediterraneo. Comunemente noti come “cardi”, queste piante erbacee spermatofite dicotiledoni sono scientificamente ascrivibili alla tribù Cardueae Cass.= Cynareae Less. (Cassini, 1819) appartenenti alla famiglia Asteraceae e specificamente ai generi *Cynara* (carciofo o cardo selvatico), *Scolymus* (cardo d'oro o cardo ostrica), *Carlina* (cardo nano o bianco) e *Silybum* (cardo di latte o cardo mariano).

In Italia, tre sono i formaggi Caciofiore prodotti secondo antiche tecniche tradizionali: il *Caciofiore Aquilano*, il *Caciofiore di Columella* ed il *Caciofiore della Sibilla*.

#### ❖ *Caciofiore Aquilano*

Il *Caciofiore Aquilano* è un formaggio tipico della tradizione abruzzese, legato ai pascoli di altura, prodotto con latte intero di pecore di razza merinizzata miste a razze lattifere, coagulato con il caglio vegetale ottenuto dal cardo selvatico *Carlina acaulis*. Il formaggio dalla forma cilindrica ha generalmente un peso variabile tra i 500 – 1000 g, con una pasta morbida e cremosa caratterizzata da una colorazione bianca avorio e un sottocrosta generalmente di colore ambrato con una tipica scolpitura superficiale. Questo formaggio ampiamente utilizzato in cucina ha un aroma delicato di latte e un sapore molto tenue e fine.

#### ❖ *Caciofiore di Columella*

Il *Caciofiore di Columella* o *Caciofiore della campagna romana* è un formaggio a pasta molle tipico del Lazio considerato l'antenato del Pecorino romano tradizionale. Si caratterizza per la sua forma a parallelepipedo a base quadrata e un peso medio che si aggira attorno ai 300-500 g. Questo formaggio prodotto con latte ovino crudo coagulato esclusivamente con il caglio vegetale ottenuto dal fiore del cardo *C. scolymus* o *C. cardunculus*, si caratterizza per la presenza di una crosta rugosa di color grigio/nocciola ed una pasta color avorio caratterizzata da una lieve presenza di occhiature irregolari. Dal punto di vista organolettico questo formaggio presenta un gusto intenso e deciso con un aroma di fieno umido e verdure cotte.

#### ❖ *Caciofiore della Sibilla*

Il *Caciofiore della Sibilla* è un formaggio a pasta tenera prodotto in una piccola area pedemontana dei Monti Sibillini nelle Marche (Marche, Italia). Attualmente la produzione di questo formaggio è limitata esclusivamente a due piccoli caseifici a conduzione familiare rispettivamente a Pieve Torina e Belforte del Chienti, entrambi in provincia di Macerata. Per la produzione di questo formaggio viene usato esclusivamente latte crudo di pecore di razza *Sopravissana* coagulato con l'estratto acquoso della pianta *Carlina acanthifolia* All. subsp. *Acanthifolia* usato come caglio vegetale, senza l'aggiunta di starter commerciali. Il formaggio ha una crosta rugosa e giallastra, con una pasta morbida e compatta caratterizzata dalla presenza di piccole occhiature, si caratterizza per il suo sapore delicato, leggermente amaro, con un profumo intenso di erbe selvatiche misto

ad un dolce profumo di burro. La forma generalmente piccola con un peso variabile dai 200 agli 800 g ha un'altezza massima di 3-4 cm e viene consumato fresco a seguito di una breve stagionatura.

## 2. Scopo del lavoro

I formaggi tradizionali giocano un ruolo chiave nel legame tra territorio e popolazione, sono infatti riconosciuti da molti consumatori come alimenti di qualità sensoriale eccellente, caratterizzati da aromi peculiari, strettamente legati a tradizioni antiche, nate e tramandatesi in un particolare territorio.

Le materie prime utilizzate rappresentano l'elemento chiave nella definizione delle qualità sensoriale e nutrizionale dei formaggi sia in termini di biodiversità animale che vegetale. L'importanza di questi prodotti tradizionali, a produzione locale, è strettamente legata non solo ad aspetti di tipo nutrizionale, qualitativo e culturali, ma anche ad aspetti socio-economici altrettanto importanti. Non meno importanti però sono gli aspetti legati al patrimonio biologico di questi prodotti, sempre più spesso oggetto di studio per le loro peculiari caratteristiche microbiologiche. Nell'ultimo ventennio, l'impatto dei coagulanti vegetali sulla coagulazione del latte e le caratteristiche fisico-chimiche, sensoriali e strutturali del formaggio è stato ampiamente approfondito in molti lavori scientifici (Sanjuán *et al.*, 2002; Tejada *et al.*, 2007; García *et al.*, 2012; Llorente *et al.*, 2014; Ordiales *et al.*, 2014), mentre il contributo di questi estratti vegetali sulla diversità e sulla dinamica microbica dei formaggi è stato indubbiamente meno esplorato, con solo pochi studi effettuati a questo scopo specifico (Sousa & Malcata, 1997; Vioque *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2001; Roseiro *et al.*, 2003; Tejada & Fernández-Salguero, 2003; Aquilanti *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2012; Ordiales *et al.*, 2013).

Il *Caciofiore della Sibilla* è un formaggio a pasta tenera ottenuto dalla coagulazione di latte crudo ovino con l'estratto acquoso di giovani foglie e steli della pianta *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*, prodotto senza l'aggiunta di starter commerciali e dunque soggetto a fermentazione spontanea operata da batteri lattici naturalmente associati alle materie prime e all'ambiente di caseificazione. Il *Caciofiore della Sibilla* è un formaggio tradizionale, prodotto in una zona limitata della provincia di Macerata (Marche, Italia) con l'uso di un coagulante vegetale ottenuto dalla macerazione di porzioni della pianta *C. acanthifolia* All. che cresce spontaneamente nei pascoli di alta quota del Parco Nazionale dei Monti Sibillini. L'antica procedura di produzione del coagulante, tramandata di padre in figlio, e la limitata finestra temporale in cui le giovani foglie di questa specie vegetale sono disponibili rendono questo formaggio un prodotto di nicchia di cui, negli ultimi 50 anni, si era totalmente persa la continuità produttiva. Inoltre, variazioni stagionali correlate alla temperatura e alle

precipitazioni influenzano notevolmente la disponibilità della pianta, rendendo la produzione di questo formaggio un evento occasionale e con produzioni molto limitate. Pur essendo un formaggio tradizionale, prodotto e consumato in una zona geografica limitata, il *Caciofiore della Sibilla* rappresenta un perfetto modello di formaggio mediterraneo realizzato con caglio vegetale la cui produzione non è mai stata documentata.

Sulla base di queste premesse, scopo del presente lavoro è stato dunque la caratterizzazione chimico-fisica e microbiologica di una singola produzione di questo formaggio artigianale a latte crudo prodotto presso il Caseificio degli Angeli di Pieve Torina (MC) nelle Marche, a ridosso del comprensorio pedemontano del parco dei Monti Sibillini. L'analisi chimico-fisica e microbiologica del formaggio *Caciofiore* prodotto con caglio vegetale, e del Pecorino tradizionale a latte crudo, prodotto con caglio animale (produzione di controllo) è stata effettuata attraverso la determinazione del pH e lo studio della complessità microbica coinvolta nel processo di produzione e maturazione del formaggio stesso. In particolare, la diversità e la dinamica microbica dei formaggi *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo, sono state valutate attraverso un approccio molecolare polifasico basato su tecniche cultura-indipendenti (PCR-DGGE, *Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* e Illumina Sequencing) e tecniche cultura-dipendenti (enumerazione di lieviti e muffe, lattobacilli, lattococchi, cocchi termofili, cocchi coagulasi negativi, mesofili aerobi totali, enterococchi, Enterobacteriaceae).

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Processo di caseificazione

Il formaggio *Caciofiore della Sibilla* e il formaggio Pecorino di controllo sono stati prodotti in un caseificio a conduzione familiare (Caseificio degli Angeli) situato nel comprensorio pedemontano del Parco Nazionale dei Monti Sibillini, in località Pieve Torina (MC) nelle Marche.

Il latte ovino ottenuto da un'unica mungitura giornaliera è stato filtrato per allontanare le particelle grossolane, suddiviso in due diversi tini di coagulazione in acciaio inox e successivamente riscaldato fino a raggiungere una temperatura di circa 35-36 °C.

In particolare, il latte presente nel primo tino di coagulazione, identificato dunque come primo batch produttivo, è stato coagulato con l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. al fine di ottenere la produzione di tre diverse forme di formaggio *Caciofiore della Sibilla*, identificate con la sigla "Cf". A tal scopo, approssimativamente 10 L di latte sono stati coagulati con circa 100 mL di estratto acquoso. Al contrario, il latte presente nel secondo tino, secondo batch produttivo, è stato coagulato mediante aggiunta del caglio commerciale della ditta Caglifacio Clerici (Cadorago, CO, Italia; 1:10,000) al fine di produrre tre forme di formaggio Pecorino tradizionale usate come controllo, identificate con la sigla "C", seguendo le indicazioni dell'azienda produttrice.

Per entrambi i batch produttivi, dopo 30 minuti dalla coagulazione, le cagliate sono state sottoposte a spinatura manuale da parte del casaro al fine di ottenere granuli di dimensioni inferiori rispetto ad un chicco di riso. A seguito di tale fase, il coagulo rotto è stato estratto e posto all'interno di fuscelle in plastica con dimensioni di 8 x 8 cm e sottoposte a drenaggio manuale del siero, mediante pressatura e ribaltamento periodico. Le forme così ottenute sono state dunque sottoposte a stufatura in cella termostata a temperatura di 12-13 °C per 4h e successivamente salate a secco. Le forme sono state infine stagionate per 20 giorni in celle a condizioni controllate di temperatura (12-13 °C) e di umidità relativa (70%).

### 3.2. Preparazione dell'estratto acquoso di *Carlina acanthifolia* All. sub. *acanthifolia*

L'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. è stato prodotto seguendo un'antica ricetta tramandata di generazione in generazione, utilizzando esclusivamente la porzione basale del fusto e la regione basale di inserzione delle giovani foglie sul fusto della pianta raccolta in aree incolte del Parco Nazionale dei Monti Sibillini. Il processo produttivo che verrà di seguito descritto è illustrato in Figura II.1. Gli steli e le foglie fresche sono stati lavati e finemente sminuzzati con l'ausilio di un coltello mezzaluna, le porzioni così ottenute sono state successivamente sottoposte a macerazione per 18 h a temperatura ambiente in una soluzione di acqua ed aceto di vino in rapporto 1:1. Il composto così ottenuto è stato successivamente filtrato attraverso un panno di cotone al fine di allontanare le particelle grossolane ed il filtrato ottenuto è stato dunque utilizzato come caglio vegetale in rapporto di 100 mL a 10 L di latte crudo ovino.

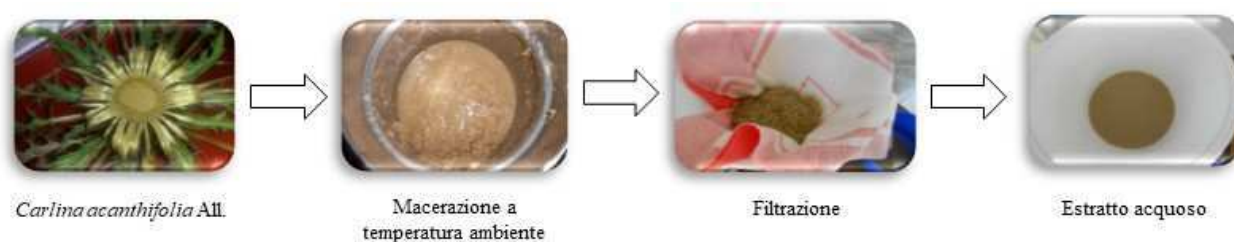


**Figura II.1.** Diagramma di flusso della preparazione dell'estratto acquoso di *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*.

### 3.3. Campionamento

Per l'allestimento delle prove sperimentali campioni di latte crudo ovino, caglio vegetale (estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*), cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con il caglio animale commerciale, cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., e formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale a diversi tempi di maturazione (1, 3, 6, 10 e 20 giorni di stagionatura) sono stati prelevati direttamente dal caseificio durante le fasi di produzione e stagionatura dei formaggi stessi. Al fine di valutare la composizione della flora microbica della *C. acanthifolia* All., piante fresche intere raccolte presso il Parco Nazionale dei Monti Sibillini sono state sottoposte ad analisi. Tutti i campioni riposti in opportuni contenitori sterili, sono stati trasportati in laboratorio in condizioni refrigerate (+4 °C) e processati entro 24 h dal campionamento.

### 3.4. Determinazione del pH

A seguito del campionamento, i campioni di latte crudo ovino, caglio vegetale, cagliata ottenuta con caglio animale commerciale e caglio vegetale sono stati analizzati per la determinazione del pH, così come i formaggi *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale durante la fase di produzione e stagionatura. La misurazione è stata condotta in triplicato per ogni campione mediante apposito pH-metro con elettrodo solido HI2031 (modello 300, Hanna Instruments, Padova, Italia).

### 3.5. Valutazione della popolazione microbica

Per l'allestimento delle conte microbiche, 10 g di caglio vegetale, cagliata ottenuta con caglio animale commerciale e vegetale, *Carlina acanthifolia* All. e formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale sono stati addizionati di 90 mL di soluzione acquosa peptonata sterile (0,1 % peptone, p/v) ed omogenati con un omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 Circulator (International PBI, Milano, Italia), per 2 minuti a 260 rpm (Osimani *et al.*, 2009). 1 mL diretto di campione di latte e degli omogenati ottenuti è stato dunque utilizzato per l'allestimento di diluizioni scalari decimali in soluzione acquosa peptonata sterile. Aliquote di 100 µL di ciascuna diluizione decimale sono state quindi seminate in doppio sui seguenti terreni solidi:

- i) *Rose Bengal Agar* (RBA; VWR International S.r.l., Pennsylvania, Stati Uniti) addizionato con 0,1 g L<sup>-1</sup> di cloramfenicolo (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), incubato a 25 °C per 48h in condizione di aerobiosi per l'enumerazione di lieviti e muffe;
- ii) M17 (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) incubato a 22 °C per 48h in condizione di aerobiosi per l'enumerazione dei lattococchi;
- iii) M17 (Merck KGaA) incubato a 45 °C per 24h in condizione di aerobiosi per l'enumerazione dei cocchi termofili;
- iv) *de Man, Rogosa, Sharpe Agar* (MRSA; VWR International S.r.l.) terreno di coltura parzialmente selettivo addizionato con 250 mg L<sup>-1</sup> di cicloesimide incubato a 37 °C per 48h in condizioni di aerobiosi per l'enumerazione dei lattobacilli (De Man *et al.*, 1960; Osimani *et al.*, 2009);

- v) *Mannitol Salt Agar* (MSA, VWR International S.r.l.) terreno di coltura selettivo e differenziale, incubato a 37 °C per 24-48h in condizioni di aerobiosi per l'enumerazione e l'isolamento dei cocchi coagulasi-negativi (Chapman, 1945);
- vi) *Plate Count Agar* (PCA, VWR International S.r.l.) terreno non selettivo ne differenziale incubato a 30 °C per 48h per l'enumerazione dei microrganismi mesofili aerobi totali (*American Public Health Association*, 1978);
- vii) *Slanetz-Bartley Agar* (Merck KGaA) incubato a 37 °C per 24-48 h in aerobiosi per l'enumerazione degli enterococchi (Slanetz & Bartley, 1957);
- viii) *Violet Red Bile Glucose Agar* (VRBGA, VWR International S.r.l.) terreno selettivo e differenziale incubato a 37°C per 24h per l'enumerazione delle Enterobacteriaceae (*American Public Health Association*, 1978).

### 3.6. Preparazione dei bulk di colonia

Per la valutazione della comunità microbica, le piastre di terreno RBA, MRSA e M17 presentanti un numero di colonie comprese tra 30 e 300 (alta diluizione) e presentanti colonie confluenti (bassa diluizione) sono state selezionate ed utilizzate per l'allestimento di *bulk* di colonia sulla base del metodo descritto per la prima volta da Ercolini e collaboratori nel 2001 e successivamente modificato da Garofalo e colleghi nel 2015.

In dettaglio, per tutti i campioni, ad eccezione del formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale per i quali sono state selezionate esclusivamente le piastre ad alta diluizione, le colonie presenti sulle piastre ad alta e bassa diluizione sono state raccolte con 1,5 mL di soluzione sterile contenente il 50% di NaCl (0,85% p v<sup>-1</sup>) e il 50% di glicerolo (99,5%) con l'ausilio di un'ansa ad L sterile monouso. La sospensione cellulare così ottenuta è stata raccolta con l'ausilio di pipette monouso, trasferita in provette sterile, conservata a -20 °C e successivamente sottoposta ad estrazione del DNA cellulare d analisi molecolari.

### 3.7. Estrazione del DNA cellulare

#### 3.7.1. Estrazione del DNA microbico totale da matrice

Per i campioni di latte crudo ovino, caglio vegetale, cagliata ottenuta con caglio animale commerciale, cagliata ottenuta con caglio vegetale e formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo il DNA

microbico totale è stato estratto direttamente dall'omogenato utilizzando il kit commerciale *PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit* (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA) seguendo il protocollo operativo specifico fornito dalla ditta costruttrice.

### 3.7.2. Estrazione del DNA fungino

L'estrazione di DNA fungino da *bulk* di colonia è stata condotta secondo la procedura descritta da Makimura e collaboratori (1999) ed in parte modificata come di seguito descritto:

- centrifugare 300 µL della sospensione cellulare a 14.000 g per 3 minuti e rimuovere il surnatante;
- aggiungere 300 µL di tampone TE [10 mM Tris-HCl (pH 8), 1 mM EDTA (pH 8)];
- centrifugare a 14.000 g per 3 minuti;
- risospendere il pellet in 300 µL di *DNA extraction buffer* [0,1 M Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA (pH 8), 1% Sodio Dodecil Solfato, SDS] in una microprovetta da 1,5 mL contenente sferette di vetro in ragione di circa 2/3 del volume della microprovetta;
- agitare al *vortex* per 1 minuto;
- porre in ghiaccio per 1 minuto;
- agitare al *vortex* per 3 minuti;
- porre l'estratto cellulare in acqua bollente (~100 °C) per 10 minuti al fine di denaturare le DNasi;
- aggiungere alla sospensione 20 µL di tampone Tris-HCl 1 M [0,5 M EDTA (pH 8), 10% SDS ed acetato di potassio (5 M)];
- mantenere in ghiaccio per 10 minuti;
- centrifugare a 14.000 g per 10 minuti;
- prelevare 600 µL di surnatante ed aggiungere 600 µL di isopropanolo (rapporto 1:1).
- mantenere il campione a -20°C per 15 minuti.
- rimuovere il surnatante ed aggiungere 500 µL di etanolo al 70%;
- centrifugare a 14.000 g per 5 minuti;
- rimuovere l'etanolo di lavaggio

- lasciare asciugare a temperatura ambiente sotto cappa a flusso laminare per una notte;
- risospendere il *pellet* in 100  $\mu\text{L}$  di tampone TE;
- conservare la sospensione di DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7.3. Estrazione del DNA batterico

L'estrazione di DNA batterico da *bulk* di colonia è stata condotta secondo la metodica descritta da Hynes e collaboratori (1992) e successivamente modificata da Osimani *et al.* (2015) come di seguito esplicata:

- centrifugare 300  $\mu\text{L}$  della sospensione cellulare a 14.000 g per 3 minuti e rimuovere il surnatante;
- aggiungere 300  $\mu\text{L}$  di tampone TE [(10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0))];
- centrifugare a 14.000 g per 3 minuti;
- risospendere il *pellet* in 1 mL di *Buffer* STE [10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8,0), 20% saccarosio (w v<sup>-1</sup>)] contenente lisozima alla concentrazione di 25 mg mL<sup>-1</sup>;
- incubare a 37°C per 3 ore;
- centrifugare a 14.000 g per 3 minuti;
- risospendere il *pellet* in 1 mL di *Buffer* di lisi [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,45% Tween 20 (w v<sup>-1</sup>) 0,45% Triton X-100 (w v<sup>-1</sup>)] con 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  di proteinasi K;
- incubare a 60°C per 3 ore;
- inattivare la proteinasi K trattando i campioni a 95°C per 10 min.
- conservare la sospensione di DNA a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.8. Quantizzazione del DNA estratto

Il DNA microbico estratto direttamente dalla matrice o dai *bulk* di colonia è stato sottoposto a quantizzazione spettrofotometrica con spettrofotometro *Spectrophotometer UV-1800* (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone) ad una lunghezza d'onda di 260 nm.

In dettaglio, 5 µL di DNA sono stati aggiunti di 495 µL di acqua deionizzata sterile ottenendo così una sospensione con diluizione 1:100 in cuvette in quarzo per spettrofotometro.

La quantità di DNA presente in ciascun campione è stata definita sulla base della seguente formula:

$$1 A_{260\lambda} : 50 \mu\text{g mL}^{-1} = X A_{260\lambda} : Y \mu\text{g mL}^{-1}$$
$$Y \mu\text{g mL}^{-1} \times 100 \text{ (fattore di diluizione)} = \text{DNA ng } \mu\text{L}^{-1}$$

### 3.9. Ceppi di riferimento

Al fine di identificare preliminarmente le specie microbiche presenti nel profilo DGGE ottenuto per tutti i campioni in esame, sono stati costruiti tre *ladder* rispettivamente per le analisi del DNA di lieviti, muffe e batteri sfruttando ceppi di riferimento di collezione.

In particolare, 5 colture pure di lievito sono state usate per costruire il *ladder* indicato come “Mix L”, che sono rispettivamente: *Wickerhamomyces anomalus* DBVPG 6613 (L1), *Starmerella bombicola* DBVPG 3827 (L2), *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171T (L3), *Kazachstania exigua* DBVPG 6481 (L4) e *Candida humilis* CBS 6897T (L5). 3 colture pure di muffa sono state utilizzate per la costruzione del *ladder* “Mix M” rispettivamente: *Alternaria alternata* (M1), *Cladosporium* spp. (M2) e *Mucor racemosus* (M3); ed infine 6 colture pure di batteri lattici sono state utilizzate per la costruzione del *ladder* batterico “Mix B”: *Lactobacillus plantarum* DSMZ 2601 (B1), *Pediococcus pentosaceus* DSMZ 20336<sup>T</sup> (B2), *Lactobacillus parabuchneri* DSMZ 5708 (B3), *Lactobacillus buchneri* DSMZ 20057 (B4), *Lactobacillus paracasei* NRRL 4560<sup>T</sup> (B5), *Lactobacillus casei* NCIMB 4114 (B6).

Tutti i ceppi di lieviti e batteri analizzati sono stati acquistati rispettivamente da: “Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università di Perugia” (DBVPG *Industrial Yeasts Collection*, Perugia, Italia, <http://www.dbvpg.unipg.it/index.php/it/>), “Centraalbureau voor Schimmelcultures” (CBS, Utrecht, Olanda, <http://www.cbs.knaw.nl/index>), “National Center for Agricultural Utilization Research” (NRRL Collection, Peoria, USA, <http://nrrl.ncaur.usda.gov/>), “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen” (DSMZ Collection, Braunschweig, Germania, <http://www.dsmz.de/>) e “National Collections of Industrial and Marine Bacteria” (NCIMB, Aberdeen, Scozia, Regno Unito, [www.ncimb.co.uk/](http://www.ncimb.co.uk/)).

Al contrario tutte le mufte utilizzate come *ladder* fanno parte della Collezione di colture dei laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche precedentemente isolate ed identificate da Garofalo *et al.*, 2012.

### 3.10. Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE)

#### 3.10.1. Amplificazione via PCR del DNA fungino

La regione D1/D2 del gene codificante per il 26S rDNA è stata amplificata mediante i *primers* NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') e LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3') (Cocolin *et al.*, 2000). Per l'allestimento delle analisi DGGE il *primer forward* NL1 è stato aggiunto di una CG-clamp all'estremità 5' (5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G-3') come precedentemente descritto da Sheffield e collaboratori (1989).

Per la reazione di PCR 2  $\mu\text{L}$  di DNA, con una concentrazione di 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , sono stati amplificati in un volume finale di 25 $\mu\text{L}$ , secondo la miscela di reazione riportata in Tabella II.1.

L'amplificazione è stata condotta in termociclatore *Mycycler Thermal cycler* (Biorad, Hercules, Canada) secondo il protocollo presente in Figura II.2.

**Tabella II.1.** Composizione della mix di reazione per l'amplificazione della regione D1/D2 del gene 26S rDNA via PCR.

|                        | <i>Ci</i>              | <i>Cf</i>                          | <i>Vi</i>          |
|------------------------|------------------------|------------------------------------|--------------------|
| <i>Buffer</i>          | 10 x                   | 1 x                                | 2,50 $\mu\text{L}$ |
| dNTPs                  | 10 mM                  | 0,25 mM                            | 0,62 $\mu\text{L}$ |
| <i>Primer Forward</i>  | 10 $\mu\text{M}$       | 0,5 $\mu\text{M}$                  | 1,25 $\mu\text{L}$ |
| <i>Primer Reverse</i>  | 10 $\mu\text{M}$       | 0,5 $\mu\text{M}$                  | 1,25 $\mu\text{L}$ |
| <i>Taq-polimerase*</i> | 5 U $\mu\text{L}^{-1}$ | 0,75 U (25 $\mu\text{L}$ ) $^{-1}$ | 0,15 $\mu\text{L}$ |
| H <sub>2</sub> O       |                        | Fino a volume                      |                    |

\**Taq DNA Polymerase* (SibEnzyme Ltd. Novosibirsk, Russia).

Ci: concentrazione iniziale; Cf: concentrazione finale; Vi: volume iniziale.

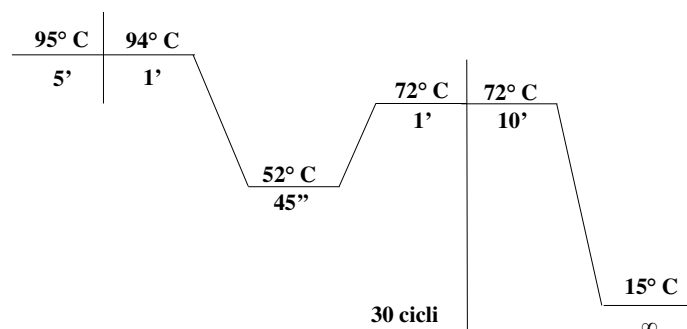


**Figura II.2.** Condizioni di amplificazione della regione D1/D2 del gene codificante per il 26S rDNA

### 3.10.2. Amplificazione via PCR del DNA batterico

La regione variabile V3 del gene codificante il 16S rDNA è stata amplificata mediante l'uso dei *primer* universali 338f (5'-ACT CCT ACG GGA GGCAGC AG-3') e 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Alessandria *et al*, 2010). Per l'analisi DGGE il *primer forward* 338F è stato aggiunto all'estremità 5' della CG-clamp (5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG-3') come descritto da Ampe e collaboratori (1999). 2 µL di DNA, con una concentrazione di 50 ng µL<sup>-1</sup>, sono stati amplificati in un volume totale di 25 µL secondo la miscela di reazione riportata in Tabella II.1. L'amplificazione è stata condotta nel termociclatore *Mycycler Thermal cycler* (Biorad, Hercules, Canada) secondo il protocollo presente in Figura II.3.

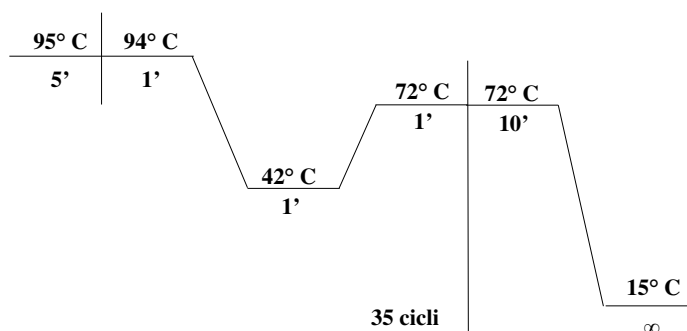


**Figura II.3.** Condizioni di amplificazione della regione variabile V3 del gene codificante il 16S rDNA

### 3.10.3. Elettroforesi su gel di agarosio

Al fine di valutare la corretta amplificazione del DNA estratto, 5  $\mu\text{L}$  di ogni prodotto di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1,5% ( $\text{p v}^{-1}$ ) in tampone TBE *buffer* [54 g  $\text{L}^{-1}$  Tris base, 27,5 g  $\text{L}^{-1}$  acido borico, 20 mL EDTA 0,5M pH 8 in una soluzione stock di TBE 5X] contenente 2,5 % ( $\text{v v}^{-1}$ ) di bromuro di etidio (EtBr, 10 mg  $\text{mL}^{-1}$ ) (Sambrook *et al.*, 1989).

La migrazione elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 6 V  $\text{cm}^{-1}$  per 45 minuti in una vaschetta elettroforetica SUB-CELL<sup>®</sup> GT (Biorad) utilizzando il marcatore molecolare *HyperLadder* 100 bp (Londra, Regno Unito).

A seguito della corsa elettroforetica gli ampliconi sono stati visualizzati mediante transilluminatore ( $\lambda$  260 nm) e le immagini sono state digitalizzate utilizzando il sistema *Complete Photo* XT101 (Explera, Jesi, Italia).

### 3.10.4. Analisi DGGE

Gli ampliconi ottenuti a seguito della reazione di PCR sono stati separati su gel di poliacrilamide in gradiente denaturante di urea/formammide come descritto da Cocolin e collaboratori (2001) utilizzando l'apparato DGGE Bio-Rad D-code<sup>™</sup> (Bio-Rad Laboratories).

In particolare, 20  $\mu\text{L}$  di prodotto di PCR aggiunti di 5  $\mu\text{L}$  di *Atlas Load 6x Loading Dye Bromophenol Blue* (Bioatlas, Estonia) sono stati caricati su gel di poliacrilammide con gradiente denaturante 30-60% ( $\text{p v}^{-1}$ ). La separazione elettroforetica è stata condotta in *buffer* TAE 1X (0,04 mol  $\text{L}^{-1}$  Tris-acetate, 0,001 mol  $\text{L}^{-1}$  EDTA) a 60 °C per 4h ad un voltaggio costante di 130 V.

Per ottenere una standardizzazione della migrazione elettroforetica dei campioni e una prima identificazione, *ladder* mix specifici sono stati costruiti e caricati assieme ai campioni in analisi come descritto nel paragrafo 3.9; in particolare 2 *ladder* sono stati preparati per l'analisi della popolazione microbica fungina e un unico *ladder* è stato prodotto per lo studio della popolazione batterica.

A seguito della corsa elettroforetica il gel DGGE è stato posto per 20 minuti in *buffer* TAE 1X contenente SYBR *Green* I Stain 1X (Lonza, Walkersville, MD, USA) e successivamente visualizzato su transilluminatore e le immagini digitalizzate mediante il sistema *Complete Photo* XT101.

Le bande DGGE visualizzate su gel, identificate con un codice numerico progressivo, sono state excise dal gel stesso con opportuni puntali sterili e poste in 50  $\mu$ L di acqua sterile a +4°C *overnight* per garantire e favorire il passaggio in soluzione del DNA (Garofalo *et al.*, 2008).

5  $\mu$ L del DNA eluito sono stati quindi sottoposti ad amplificazione selettiva con la coppia di *primers* opportuni descritti nei paragrafi 3.10.1 e 3.10.2 privi delle CG-clamp e gli ampliconi ottenuti sono stati inviati alla ditta Genewiz (Hope End, Takeley, Inghilterra) per le successive operazioni di purificazione e sequenziamento.

Le sequenze in formato FASTA ottenute dal sequenziamento sono state successivamente analizzate mediante *database* GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sfruttando il software BLAST (*Basical Local Aligment Search Tool*) come descritto da Altschul e collaboratori (1990).

Per l'identificazione della popolazione microbica è stata definita come soglia di omologia tra le sequenze in esame e le sequenze omologhe depositate nel *database* un'identità di sequenza uguale o superiore al 97%.

### 3.11. *Analisi Illumina MySeq*

#### 3.11.1. *Amplificazione e analisi del DNA batterico*

Il DNA batterico ottenuto come descritto nel paragrafo 3.7.3 è stato analizzato mediante la tecnica di *Next Generation Sequencing* Illumina MySeq (Illumina, USA) per lo studio della diversità e delle dinamiche microbiche. Per tale analisi la regione V3-V4 del gene 16S rDNA (Posizione di riferimento da 341 a 805 in *Escherichia coli* con amplicone di 464 nucleotidi) è stata amplificata come descritto da Baker *et al.* (2003) e Claesson *et al.* (2010). Gli ampliconi ottenuti attraverso l'amplificazione selettiva sono stati trattati con il kit Agencourt AMPure (Beckman Coulter, Brea, California, Stati Uniti) al fine di eliminare gli ampliconi con lunghezza inferiore a 100 pb ed evitare così problemi di sequenziamento. A seguito di tale trattamento, la concentrazione di DNA dei vari ampliconi è stata determinata con l'ausilio del kit Quant-iT PicoGreen dsDNA (Invitrogen, Carlsbad, California, Stati Uniti) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Al fine di garantire l'assenza di *primers* dimerici e per saggiare la purezza e la qualità delle librerie di DNA, i campioni sono stati analizzati tramite Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) utilizzando il kit High Sensitivity DNA (Agilent). Dopo la quantizzazione, gli ampliconi sono stati combinati in rapporti equimolecolari e sottoposti ad analisi con la tecnica Illumina MySeq.

### 3.11.2. Analisi dei dati e identificazione delle sequenze tramite QIIME

Le sequenze ottenute attraverso l'analisi Illumina sono state analizzate con la versione 1.9 del software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) (Caporaso *et al.*, 2010).

*Barcode* identificativi sono stati assegnati ad ogni campione e per ogni *reads*, le coppie di frammenti originali sono state unite usando il QIIME *script*. Le sequenze con una qualità media superiore a 20 sono state assegnate alle Unità Tassonomiche Operative (*Operational Taxonomic Units*, OTUs) con una *threshold* del 97% (Edgar, 2010). Le sequenze rappresentative delle OTUs sono state successivamente classificate utilizzando il *Ribosomal Database Project* (RDP) *classifier* 2.0.1 (Maidak *et al.*, 2001). Le unità tassonomiche operative sono state allineate con il metodo PyNAST considerando una lunghezza di 150 pb e un'identità minima dell'80%. Sono state infine costruite le curve di rarefazione e calcolati gli indici di diversità (Caporaso *et al.*, 2010) e l'indice non parametrico Chao1 per la definizione della ricchezza in specie all'interno di ogni campione (Chao *et al.*, 2002). Tutti i dati generati dal sequenziamento sono stati depositati nel *database* NCBI *Sequence Read Archive* (SRA) con il seguente Ac. No. PRJNA340351.

### 3.12. Analisi statistica

Per ciascun lotto di formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale i valori medi di pH e conte vitali raccolti durante la produzione e la stagionatura, sono stati confrontati sulla base del *Tukey test* ( $\alpha = 0,05$ ). Inoltre, ad ogni tempo di campionamento, i due lotti "Cf" e "C" sono stati confrontati direttamente mediante il *t test di Student* ( $\alpha = 0,05$ ).

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il *software* Statistica 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 4. Risultati

### 4.1. Valutazione valori di pH

I risultati della misurazione del pH del latte crudo ovino, dell'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., delle due cagliate ottenute dalla coagulazione del latte con caglio vegetale e animale e dei due formaggi *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo sono riportati in Tabella II.2.

Il latte crudo ovino si è caratterizzato per un valore di pH medio di  $6,39 \pm 0,10$ , la cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con il caglio animale commerciale si è caratterizzata per valori paragonabili ( $6,43 \pm 0,01$ ), mentre al contrario la cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. ha mostrato un valore leggermente inferiore pari a  $5,14 \pm 0,02$ . Tale decremento è dovuto verosimilmente al pH molto basso ( $3,79 \pm 0,05$ ) definito per l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. utilizzato per la coagulazione. Differenze significative sono state identificate tra i formaggi *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale fino al decimo giorno di stagionatura degli stessi, con un successivo annullamento delle differenze fino al ventesimo giorno di stagionatura per il quale si registrano valori di pH simili.

**Tabella II.2.** Valori di pH identificati per il latte crudo ovino, l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con il caglio animale commerciale, cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo.

| Campioni              | <i>Caciofiore della Sibilla</i><br>(Cf) | Controllo<br>(C)  | <i>p</i> |
|-----------------------|-----------------------------------------|-------------------|----------|
| <b>pH</b>             |                                         |                   |          |
| Latte crudo ovino     | $6,39 \pm 0,10$                         |                   |          |
| Caglio                | $3,79 \pm 0,05$                         | n.a.              |          |
| Cagliata              | $5,14 \pm 0,02$                         | $6,43 \pm 0,01$   | <.0001*  |
| 1 gg di stagionatura  | $5,22 \pm 0,01^c$                       | $5,84 \pm 0,03^a$ | <.0001*  |
| 3 gg di stagionatura  | $5,31 \pm 0,02^b$                       | $5,04 \pm 0,02^b$ | <.0001*  |
| 6 gg di stagionatura  | $5,38 \pm 0,01^a$                       | $5,08 \pm 0,02^b$ | <.0001*  |
| 10 gg di stagionatura | $5,23 \pm 0,02^c$                       | $4,97 \pm 0,03^b$ | .0002*   |
| 20 gg di stagionatura | $5,02 \pm 0,03^d$                       | $4,94 \pm 0,15^b$ | 0.4169   |
| LSD                   | 0.048                                   | 0.177             |          |

#### 4.2. Conte vitali

I risultati delle conte vitali in piastra del latte crudo ovino, l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., della cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., della cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con il caglio animale commerciale, del formaggio *Caciofiore della Sibilla* e del formaggio Pecorino tradizionale di controllo sono mostrati in Tabella II.3.

L'analisi dei dati mostra come le giovani foglie e gli steli della pianta *C. acanthifolia* All. siano caratterizzate da alti livelli di aerobi mesofili totali, lattococchi, eumiceti, Enterobacteriaceae e cocchi coagulasi negativi, mentre si caratterizzano per bassi livelli di cocchi termofili, enterococchi e lattobacilli. Diversamente da quanto riscontrato per la *C. acanthifolia* All., l'estratto acquoso mostra livelli di carica microbica molto bassa sia per quanto riguarda i lieviti sia per quanto concerne i batteri. Nessuna differenza significativa è stata inoltre riscontrata tra il latte crudo ovino e le due cagliate in esame per quanto riguarda lattobacilli, aerobi mesofili totali, enterococchi ed Enterobacteriaceae, mentre al contrario differenze significative sono state identificate tra eumiceti, lattococchi, cocchi termofili e cocchi coagulasi negativi.

L'analisi dei due formaggi ha evidenziato un aumento progressivo di lattobacilli, aerobi mesofili totali, enterococchi ed Enterobacteriaceae nel formaggio *Caciofiore della Sibilla* durante il periodo di stagionatura. Nel formaggio Pecorino di controllo, al contrario, tutti i gruppi microbici analizzati mostrano un andamento meno regolare e soprattutto progressivo durante il periodo di stagionatura. A seguito dei 20 giorni di stagionatura entrambi i formaggi mostrano differenze significative per tutti i gruppi microbici analizzati fatta eccezione per i lattobacilli e le Enterobacteriaceae.

**Tabella II.3.** Conte vitali di latte crudo ovino, estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con il caglio animale commerciale, cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All., formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo.

|                                  | <i>Caciofiore della Sibilla</i>     | Controllo                 |          | <i>Caciofiore della Sibilla</i> | Controllo                 |          |
|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------|----------|---------------------------------|---------------------------|----------|
| Campioni                         | Eumiceti (RB)                       |                           |          | Lattococchi (M17 22°C)          |                           |          |
| Latte crudo ovino                | 2,42 ± 0,04                         |                           |          | 5,00 ± 0,06                     |                           |          |
| <i>Carlina acanthifolia</i> All. | 5,35 ± 0,01                         |                           |          | 6,68 ± 0,03                     |                           |          |
| Caglio                           | 3,54 ± 0,10                         |                           |          | 3,13 ± 0,14                     |                           |          |
| Cagliata                         | 3,50 ± 0,03                         | 3,51 ± 0,09               |          | 4,11 ± 0,00                     | 4,82 ± 0,12               |          |
| 1 gg di stagionatura             | 5,13 ± 0,03 <sup>d</sup>            | 4,65 ± 0,01 <sup>e</sup>  | <0.0001* | 5,56 ± 0,02 <sup>d</sup>        | 8,57 ± 0,01 <sup>c</sup>  | <0.0001* |
| 3 gg di stagionatura             | 7,12 ± 0,04 <sup>c</sup>            | 6,03 ± 0,01 <sup>c</sup>  | <.0001*  | 7,30 ± 0,00 <sup>c</sup>        | 7,98 ± 0,04 <sup>d</sup>  | 0.0016*  |
| 6 gg di stagionatura             | 5,41 ± 0,13 <sup>b</sup>            | 6,71 ± 0,08 <sup>b</sup>  | 0.0003*  | 8,62 ± 0,13 <sup>b</sup>        | 9,00 ± 0,14 <sup>b</sup>  | 0.1098   |
| 10 gg di stagionatura            | 7,89 ± 0,11 <sup>a</sup>            | 6,83 ± 0,02 <sup>a</sup>  | <0.0001* | 9,12 ± 0,18 <sup>a</sup>        | 9,14 ± 0,06 <sup>b</sup>  | 0.9113   |
| 20 gg di stagionatura            | 7,43 ± 0,01 <sup>b</sup>            | 5,42 ± 0,08 <sup>d</sup>  | <0,0001* | 8,90 ± 0,05 <sup>ab</sup>       | 9,52 ± 0,06 <sup>a</sup>  | 0.0079*  |
|                                  | <i>Caciofiore della Sibilla</i>     | Controllo                 |          | <i>Caciofiore della Sibilla</i> | Controllo                 |          |
|                                  | Cocchi termofili (M17 45°C)         |                           |          | Lattobacilli (MRSA)             |                           |          |
| Latte crudo ovino                | 4,08 ± 0,06                         |                           |          | 4,78 ± 0,02                     |                           |          |
| <i>Carlina acanthifolia</i> All. | 4,88 ± 0,04                         |                           |          | 3,54 ± 0,10                     |                           |          |
| Caglio                           | 2,10 ± 0,28                         |                           |          | 4,01 ± 0,00                     |                           |          |
| Cagliata                         | 4,67 ± 0,00                         | 4,28 ± 0,02               |          | 4,90 ± 0,06                     | 4,74 ± 0,11               |          |
| 1 gg di stagionatura             | 4,68 ± 0,00 <sup>e</sup>            | 7,50 ± 0,06 <sup>b</sup>  | 0.0002*  | 5,06 ± 0,05 <sup>d</sup>        | 8,57± 0,00 <sup>b</sup>   | 0.0001   |
| 3 gg di stagionatura             | 6,32 ± 0,01 <sup>d</sup>            | 7,37 ± 0,08 <sup>bc</sup> | 0.0028*  | 8,08 ± 0,00 <sup>c</sup>        | 8,89± 0,01 <sup>ab</sup>  | <0.0001  |
| 6 gg di stagionatura             | 8,26 ± 0,00 <sup>b</sup>            | 8,18 ± 0,08 <sup>a</sup>  | 0.3251   | 8,66 ± 0,09 <sup>b</sup>        | 9,03 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 0.0312*  |
| 10 gg di stagionatura            | 8,31 ± 0,00 <sup>a</sup>            | 8,00 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 0.0012*  | 8,68 ± 0,01 <sup>b</sup>        | 8,96 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 0.0009*  |
| 20 gg di stagionatura            | 7,42 ± 0,03 <sup>c</sup>            | 7,24 ± 0,05 <sup>c</sup>  | 0.0450*  | 9,05 ± 0,03 <sup>a</sup>        | 8,87 ± 0,22 <sup>ab</sup> | 0.3557   |
|                                  | <i>Caciofiore della Sibilla</i>     | Controllo                 |          | <i>Caciofiore della Sibilla</i> | Controllo                 |          |
|                                  | Cocchi coagulase-negativi (MSA)     |                           |          | Mesofili (PCA)                  |                           |          |
| Latte crudo ovino                | 4,01 ± 0,03                         |                           |          | 5,14 ± 0,16                     |                           |          |
| <i>Carlina acanthifolia</i> All. | 5,24 ± 0,01                         |                           |          | 7,27 ± 0,04                     |                           |          |
| Caglio                           | 3,06 ± 0,03                         |                           |          | 4,07 ± 0,04                     |                           |          |
| Cagliata                         | 5,06 ± 0,08                         | 4,52 ± 0,04               |          | 4,99 ± 0,01                     | 5,13 ± 0,07               |          |
| 1 gg di stagionatura             | 5,16 ± 0,02 <sup>d</sup>            | 6,75 ± 0,10 <sup>e</sup>  | 0.0022*  | 5,37 ± 0,02 <sup>e</sup>        | 8,45 ± 0,03 <sup>a</sup>  | <.0001*  |
| 3 gg di stagionatura             | 6,34 ± 0,02 <sup>c</sup>            | 7,97 ± 0,04 <sup>d</sup>  | 0.0003*  | 8,15 ± 0,08 <sup>d</sup>        | 8,87 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 0.0056*  |
| 6 gg di stagionatura             | 7,47 ± 0,04 <sup>b</sup>            | 8,91 ± 0,19 <sup>a</sup>  | 0.0086*  | 8,58 ± 0,00 <sup>c</sup>        | 8,71 ± 0,73 <sup>a</sup>  | 0.8181   |
| 10 gg di stagionatura            | 8,72 ± 0,02 <sup>a</sup>            | 8,40 ± 0,03 <sup>b</sup>  | 0.0059*  | 8,82 ± 0,01 <sup>b</sup>        | 9,10 ± 0,03 <sup>a</sup>  | 0.0073*  |
| 20 gg di stagionatura            | 7,44 ± 0,01 <sup>b</sup>            | 7,34 ± 0,01 <sup>d</sup>  | 0.0074*  | 9,20 ± 0,02 <sup>a</sup>        | 8,87 ± 0,00 <sup>a</sup>  | 0.0017*  |
|                                  | <i>Caciofiore della Sibilla</i>     | Controllo                 |          | <i>Caciofiore della Sibilla</i> | Controllo                 |          |
|                                  | Enterococchi (Slanetz-Bartley Agar) |                           |          | Enterobacteriaceae (VRBGA)      |                           |          |
| Latte crudo ovino                | 4,30 ± 0,06                         |                           |          | 3,93 ± 0,06                     |                           |          |
| <i>Carlina acanthifolia</i> All. | 3,97 ± 0,16                         |                           |          | 5,34 ± 0,03                     |                           |          |
| Caglio                           | 3,60 ± 0,01                         |                           |          | 1,00 ± 0,00                     |                           |          |
| Cagliata                         | 4,37 ± 0,01                         | 4,23 ± 0,05               |          | 1,10 ± 0,00                     | 3,39 ± 0,16               |          |
| 1 gg di stagionatura             | 4,60 ± 0,05 <sup>e</sup>            | 6,09 ± 0,05 <sup>e</sup>  | 0.0011*  | 1,74 ± 0,06 <sup>e</sup>        | 7,55 ± 0,05 <sup>a</sup>  | <.0001*  |
| 3 gg di stagionatura             | 5,14 ± 0,08 <sup>d</sup>            | 7,12 ± 0,02 <sup>c</sup>  | 0.0099*  | 2,19 ± 0,02 <sup>d</sup>        | 7,30 ± 0,01 <sup>b</sup>  | <.0001*  |
| 6 gg di stagionatura             | 7,78 ± 0,00 <sup>c</sup>            | 7,55 ± 0,01 <sup>b</sup>  | 0.0007*  | 5,41 ± 0,02 <sup>c</sup>        | 7,13 ± 0,07 <sup>b</sup>  | 0.0009*  |
| 10 gg di stagionatura            | 8,26 ± 0,01 <sup>b</sup>            | 7,90 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 0.0004*  | 6,17 ± 0,05 <sup>b</sup>        | 7,07 ± 0,09 <sup>b</sup>  | 0.0073*  |
| 20 gg di stagionatura            | 8,51 ± 0,07 <sup>a</sup>            | 6,94 ± 0,04 <sup>d</sup>  | 0.0012*  | 6,40 ± 0,00 <sup>a</sup>        | 6,32 ± 0,03 <sup>c</sup>  | 0.0597   |

Valori espressi come media log UFC g<sup>-1</sup>/mL<sup>-1</sup> ± deviazione standard

### 4.3. Analisi PCR-DGGE

#### 4.3.1. Analisi del DNA fungino

I profili DGGE ottenuti dall'analisi della regione D1/D2 del gene codificante per il 26S rDNA amplificata con i primers NL1-LS2 del DNA fungino estratto direttamente dalla matrice dei campioni sottoposti ad analisi e dai *bulk* cellulari sono mostrati nella Figure II.4.

La mappa dell'ecologia microbica di tutti i campioni sottoposti ad analisi PCR-DGGE è mostrata in Tabella II.4, mentre i risultati dettagliati ottenuti dal sequenziamento e successivo allineamento delle bande DGGE excise dal gel di poliacrilammide sono riportati in Tabella II.5.

Dall'analisi PCR-DGGE delle porzioni della pianta *C. acanthifolia* All. è stata evidenziata la presenza di specie fungine quali *Cladosporium coralloides*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Fusarium oxysporium*, *Candida zeylanoides*, *D. hansenii*. In particolare, queste ultime due specie sono state identificate anche nell'estratto acquoso usato come coagulante, assieme alle specie *Candida parapsilosis* e *G. candidum*.

Nel latte crudo ovino analizzato, le specie microbiche identificate sono state molteplici, seppur nel complesso la diversità eumicetica complessiva sia risultata inferiore rispetto a quella delle cagliate e dei relativi formaggi. Le specie identificate sono state le seguenti: *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *R. mucilaginosa* e *S. cerevisiae*. In particolare, quest'ultima specie risulta l'unica presente unicamente nel campione di latte, mentre le altre specie sono risultate comuni anche ad una o entrambe le cagliate analizzate.

Tra le specie appena citate, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *R. mucilaginosa* sono comuni oltre che al latte anche ad entrambe le cagliate, ottenute dalla coagulazione con caglio vegetale o animale, mentre le specie *Candida inconspicua*, *Meyerozyma guilliermondii* e *G. candidum* sono presenti esclusivamente nella cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte crudo ovino con il caglio vegetale, mentre *Candida membranifaciens*, *Cladosporium cladosporioides* e *Cryptococcus wieringae* sono state rilevate esclusivamente nella cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte ovino con il caglio animale commerciale.

Dall'analisi dei dati emerge inoltre come la specie *D. hansenii* sia, in assoluto, una specie ubiquitaria in entrambi i formaggi durante tutto il periodo di stagionatura, mentre la specie *M. guilliermondii* risulta l'unica

specie presente esclusivamente nel formaggio *Caciofiore della Sibilla* durante la maturazione e totalmente assente nel formaggio Pecorino di controllo.

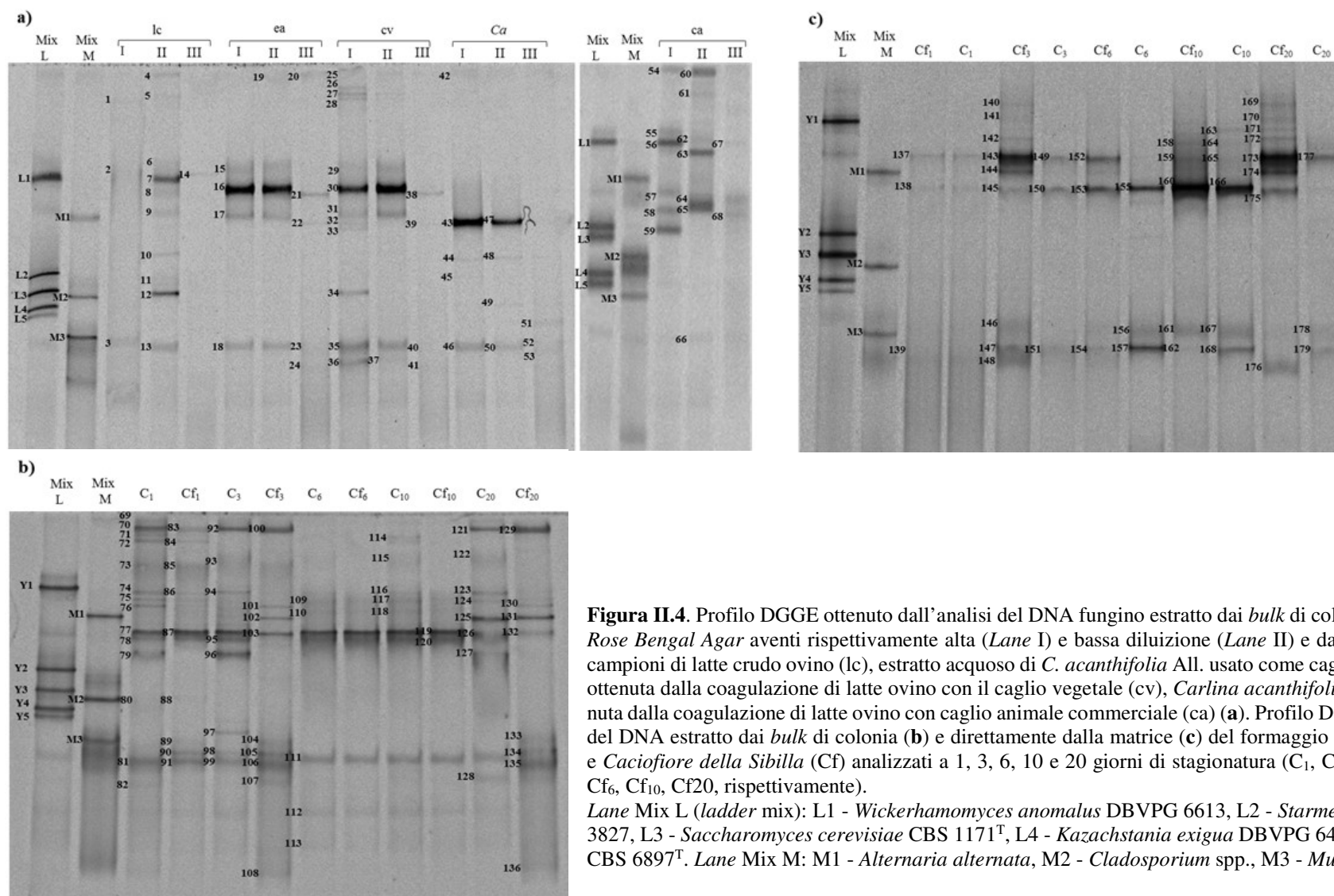


**Figura II.4.** Profilo DGGE ottenuto dall'analisi del DNA fungino estratto dai *bulk* di colonia raccolti da piastre di *Rose Bengal Agar* aventi rispettivamente alta (*Lane I*) e bassa diluizione (*Lane II*) e dalla matrice (*Lane III*) dei campioni di latte crudo ovino (*lc*), estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. usato come caglio vegetale (*ea*), cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con il caglio vegetale (*cv*), *Carlina acanthifolia* All. (*Ca*), cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio animale commerciale (*ca*) (**a**). Profilo DGGE ottenuto dall'analisi del DNA estratto dai *bulk* di colonia (**b**) e direttamente dalla matrice (**c**) del formaggio Pecorino tradizionale (*C*) e *Caciofiore della Sibilla* (*Cf*) analizzati a 1, 3, 6, 10 e 20 giorni di stagionatura (*C*<sub>1</sub>, *C*<sub>3</sub>, *C*<sub>6</sub>, *C*<sub>10</sub>, *C*<sub>20</sub> e *Cf*<sub>1</sub>, *Cf*<sub>3</sub>, *Cf*<sub>6</sub>, *Cf*<sub>10</sub>, *Cf*<sub>20</sub>, rispettivamente).

*Lane Mix L* (*ladder mix*): L1 - *Wickerhamomyces anomalus* DBVPG 6613, L2 - *Starmerella bombicola* DBVPG 3827, L3 - *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171<sup>T</sup>, L4 - *Kazachstania exigua* DBVPG 6481, L5 - *Candida humilis* CBS 6897<sup>T</sup>. *Lane Mix M*: M1 - *Alternaria alternata*, M2 - *Cladosporium* spp., M3 - *Mucor racemosus*.

**Tabella II.4.** Mappa dell'ecologia microbica, ottenuta mediante analisi PCR-DGGE, dei campioni di latte crudo ovino, *Carlina acanthifolia* All. subsp. *Acanthifolia*, estratto acquoso, cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con il caglio vegetale, cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con il caglio animale commerciale e dei formaggi *Caciofiore delle Sibilla* e Pecorino tradizionale durante la produzione e la stagionatura .

|                                 |                                  | <i>Candida inconspicua</i> | <i>Candida membranifaciens</i> | <i>Candida parapsilosis</i> | <i>Candida zeylanoides</i> | <i>Cladosporium coraloides</i> | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | <i>Cryptococcus wieringae</i> | <i>Debaryomyces hansenii</i> | <i>Fusarium oxysporum</i> | <i>Geotrichum candidum</i> | <i>Kluyveromyces marxianus</i> | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | <i>Penicillium sp.</i> | <i>Pichia kluyveri</i> | <i>Pichia kudriavzevii</i> | <i>Rhizopus stolonifer</i> | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------------|------------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| <i>Caciofiore della Sibilla</i> | Latte crudo ovino                |                            |                                | ●                           | ●                          |                                |                                     |                               | ●                            |                           |                            | ●                              |                                  |                        |                        |                            |                            | ●                               |                            | □                               |
|                                 | <i>Carlina acanthifolia</i> All. |                            |                                |                             | ○                          | ●                              | ■                                   |                               | ●                            | ●                         | ■                          |                                |                                  |                        |                        |                            |                            | ●                               |                            |                                 |
|                                 | Estratto acquoso                 |                            |                                | ●                           | ○ □                        |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         | ■                          |                                |                                  |                        |                        |                            |                            |                                 |                            |                                 |
|                                 | Cagliata                         | ●                          |                                | ●                           | ○                          |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         | ■                          |                                | ●                                |                        |                        |                            |                            | ●                               |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t1                     | ●                          | ●                              |                             | ●                          |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         |                            |                                |                                  |                        | ●                      | ●                          | ■                          | ●                               |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t3                     | ●                          |                                |                             |                            |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         | ●                          |                                | ●                                |                        | ●                      | ●                          | ■                          |                                 | ●                          |                                 |
|                                 | Formaggio t6                     |                            |                                |                             |                            |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         |                            |                                |                                  | ■                      |                        | ●                          | ■                          |                                 |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t10                    |                            |                                |                             |                            |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         |                            |                                |                                  | ■                      |                        | ●                          | ■                          |                                 |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t20                    | ●                          |                                |                             | ■                          |                                |                                     |                               | ■                            |                           | ●                          | ■                              | ●                                |                        | ●                      | ●                          | ■                          |                                 | ●                          |                                 |
| Pecorino di controllo           | Cagliata                         |                            | ●                              | ●                           | ●                          |                                | ■                                   | ●                             | ●                            |                           |                            | ●                              |                                  |                        |                        |                            |                            | ●                               |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t1                     |                            | ●                              |                             | ●                          |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         |                            | ●                              |                                  |                        | ●                      | ●                          | ■                          | ●                               | ●                          |                                 |
|                                 | Formaggio t3                     | ●                          |                                |                             | ●                          |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         |                            | ●                              |                                  | ■                      |                        | ●                          | ■                          |                                 |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t6                     |                            |                                |                             |                            |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         | ●                          |                                |                                  | ■                      |                        | ●                          | ■                          |                                 |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t10                    |                            | ●                              |                             | ●                          | ■                              |                                     |                               | ●                            | ■                         | ●                          |                                |                                  | ■                      |                        | ●                          | ■                          |                                 |                            |                                 |
|                                 | Formaggio t20                    |                            |                                |                             | ●                          |                                |                                     |                               | ●                            | ■                         | ●                          | ●                              |                                  | ■                      |                        | ●                          | ■                          |                                 |                            |                                 |

Bande DGGE risultanti dall'analisi del DNA fungino estratto dai *bulk* di colonie ottenuti dalle piastra di *Rose-Bengal* Agar (RBA) aventi una percentuale di identità  $\geq 97\%$  (●) o  $< 97\%$  (○) con le sequenze depositate nel *database* GenBank; bande DGGE ottenute dall'analisi del DNA fungino estratto direttamente dalla matrice dei campioni aventi una percentuale di identità  $\geq 97\%$  (■) o  $< 97\%$  (□) con le sequenze depositate nel *database* GenBank. t1, t3, t6, t10, t20: formaggio a 1, 3, 6, 10, 20 giorni di stagionatura.

**Tabella II.5.** Risultati del sequenziamento delle bande DGGE excise dal gel.

| Banda                             | Closest relative                 | % Ident. <sup>a</sup> | Acc.no. <sup>b</sup> | Acc.no. <sup>c</sup> |
|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| <b>1</b>                          | <i>Candida zeylanoides</i>       | 96%                   | KJ413172             | *                    |
| <b>2</b>                          | <i>Candida zeylanoides</i>       | 99%                   | JQ965864             | KU196966             |
| <b>3</b>                          | <i>Candida zeylanoides</i>       | 97%                   | KJ413172             | *                    |
| <b>4, 19, 20, 25, 42</b>          | <i>Candida zeylanoides</i>       | 94%                   | JQ965864             | *                    |
| <b>5</b>                          | <i>Candida zeylanoides</i>       | 97%                   | KJ413172             | *                    |
| <b>6</b>                          | <i>Candida zeylanoides</i>       | 97%                   | KJ413164             | *                    |
| <b>7</b>                          | <i>Candida zeylanoides</i>       | 99%                   | KC442252             | KU196967             |
| <b>10</b>                         | <i>Kluyveromyces marxianus</i>   | 98%                   | KC512907             | KU196968             |
| <b>11, 45</b>                     | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>  | 99%                   | KM222349             | KU196969             |
| <b>12, 34</b>                     | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>  | 99%                   | KC160628             | KU196970             |
| <b>14</b>                         | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>  | 88%                   | JX867131             | *                    |
| <b>15, 29</b>                     | <i>Candida parapsilosis</i>      | 99%                   | JQ965833             | KU196971             |
| <b>8, 16, 30</b>                  | <i>Candida parapsilosis</i>      | 99%                   | JQ965866             | KU196972             |
| <b>9, 17, 31</b>                  | <i>Candida parapsilosis</i>      | 99%                   | JQ965835             | KU196973             |
| <b>21, 38</b>                     | <i>Galactomyces candidum</i>     | 99%                   | KM391959             | *                    |
| <b>24, 41</b>                     | Failed                           | -                     | -                    | -                    |
| <b>26</b>                         | <i>Candida parapsilosis</i>      | 99%                   | FJ746058             | *                    |
| <b>27</b>                         | <i>Candida parapsilosis</i>      | 98%                   | KF214402             | *                    |
| <b>28</b>                         | <i>Debaryomyces hansenii</i>     | 94                    | JX068679             | *                    |
| <b>33</b>                         | <i>Meyerozyma guilliermondii</i> | 98%                   | JX423569             | KU196974             |
| <b>36, 37</b>                     | <i>Candida inconspicua</i>       | 100%                  | KC512909             | KU196975             |
| <b>44, 48</b>                     | <i>Cladosporium coralloides</i>  | 98%                   | JQ388759             | KU196976             |
| <b>13, 18, 23, 35, 40, 46, 50</b> | <i>Debaryomyces hansenii</i>     | 98%                   | KJ794669             | KU196977             |
| <b>22, 32, 39, 43, 47</b>         | <i>Debaryomyces hansenii</i>     | 99%                   | JX068679             | KU196978             |
| <b>49</b>                         | <i>Fusarium oxysporum</i>        | 99%                   | EF363781             | KU196979             |
| <b>51</b>                         | Failed                           | -                     | -                    | -                    |
| <b>52</b>                         | Failed                           | -                     | -                    | -                    |
| <b>53</b>                         | Failed                           | -                     | -                    | -                    |
| <b>54</b>                         | <i>Candida zeylanoides</i>       | 95%                   | KC442252             | *                    |
| <b>55</b>                         | <i>Candida zeylanoides</i>       | 98%                   | FN554768             | KU196980             |
| <b>56</b>                         | <i>Candida zeylanoides</i>       | 100%                  | KC442252             | KU196981             |
| <b>57</b>                         | <i>Candida zeylanoides</i>       | 99%                   | KC442252             | KU196982             |
| <b>58</b>                         | <i>Kluyveromyces marxianus</i>   | 100%                  | KJ491106             | KU196983             |
| <b>59</b>                         | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>  | 99%                   | KP737852             | KU196984             |
| <b>60</b>                         | <i>Candida membranifaciens</i>   | 93%                   | JQ991936             | *                    |
| <b>61</b>                         | <i>Debaryomyces hansenii</i>     | 93%                   | KF214428             | *                    |
| <b>62</b>                         | <i>Candida parapsilosis</i>      | 100%                  | KF214407             | KU196985             |
| <b>63</b>                         | <i>Candida parapsilosis</i>      | 97%                   | KF214404             | KU196986             |
| <b>64</b>                         | <i>Debaryomyces hansenii</i>     | 98%                   | KC692228             | KU196987             |
| <b>65</b>                         | <i>Cryptococcus wieringae</i>    | 97%                   | HM627074             | KU196988             |
| <b>66</b>                         | <i>Candida parapsilosis</i>      | 95%                   | JQ965833             | *                    |
| <b>67</b>                         | Failed                           | -                     | -                    | -                    |

|                                               |                                     |      |           |          |
|-----------------------------------------------|-------------------------------------|------|-----------|----------|
| <b>68</b>                                     | <i>Cladosporium cladosporioides</i> | 99%  | KP780460  | KU196989 |
| <b>69</b>                                     | Failed                              | -    | -         | -        |
| <b>71, 114</b>                                | <i>Candida membranifaciens</i>      | 96%  | JQ991936  | *        |
| <b>72, 84</b>                                 | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 98%  | KC692228  | KU196990 |
| <b>73</b>                                     | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 98%  | JQ965865  | KU196991 |
| <b>75</b>                                     | Failed                              | -    | -         | -        |
| <b>76</b>                                     | <i>Yarrowia lipolytica</i>          | 98%  | JQ690257  | *        |
| <b>80</b>                                     | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>     | 92%  | FJ468469  | *        |
| <b>81, 91, 99, 106, 135</b>                   | <i>Pichia kluyveri</i>              | 100% | KC510043  | *        |
| <b>85</b>                                     | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 99%  | JX068679  | KU197002 |
| <b>77, 87, 119</b>                            | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 99%  | KF214439  | KU197003 |
| <b>88</b>                                     | <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>     | 97%  | FJ468469  | *        |
| <b>90, 98, 105, 134</b>                       | <i>Candida inconspicua</i>          | 99%  | HQ641283. | KU197004 |
| <b>70, 92, 121</b>                            | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 98%  | HQ641266  | KU196992 |
| <b>93</b>                                     | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 97%  | KJ794669  | *        |
| <b>74, 86, 94</b>                             | <i>Candida zeylanoides</i>          | 99%  | EU131538  | KU196993 |
| <b>78, 95, 120</b>                            | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 100% | HQ641266  | KU196994 |
| <b>79, 96, 127</b>                            | <i>Kluyveromyces marxianus</i>      | 99%  | KJ491105  | KU196995 |
| <b>89, 97</b>                                 | <i>Pichia kluyveri</i>              | 100% | KF738157  | KU196996 |
| <b>101, 130</b>                               | <i>Yarrowia lipolytica</i>          | 100% | JN021559  | KU197005 |
| <b>103, 132</b>                               | <i>Meyerozyma guilliermondii</i>    | 100% | KM103033  | KU197006 |
| <b>104, 133</b>                               | Failed                              | -    | -         | -        |
| <b>82, 107, 128</b>                           | <i>Pichia kudriavzevii</i>          | 95%  | KM234442  | *        |
| <b>111</b>                                    | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 99%  | KF214439  | KU197011 |
| <b>112</b>                                    | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 100% | EU816305  | KU197012 |
| <b>113</b>                                    | <i>Pichia kudriavzevii</i>          | 81%  | KJ472906  | *        |
| <b>110, 118</b>                               | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 99%  | KF214439  | KU196997 |
| <b>115 122</b>                                | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 98%  | JQ965865  | KU196998 |
| <b>116, 123</b>                               | <i>Candida zeylanoides</i>          | 99%  | EU131538  | KU196999 |
| <b>109, 117, 124</b>                          | <i>Galactomyces candidus</i>        | 96%  | KM391959  | *        |
| <b>126</b>                                    | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 100% | HQ641266  | *        |
| <b>83, 100, 129</b>                           | <i>Pichia kudriavzevii</i>          | 98%  | KM234448  | *        |
| <b>102, 125, 131</b>                          | <i>Galactomyces candidus</i>        | 99%  | KM115152  | KU197007 |
| <b>108, 136</b>                               | <i>Pichia kudriavzevii</i>          | 100% | KM234442  | KU197008 |
| <b>139</b>                                    | Failed                              | -    | -         | -        |
| <b>142, 172</b>                               | <i>Galactomyces candidus</i>        | 98%  | KM391959  | *        |
| <b>144, 174</b>                               | <i>Galactomyces candidus</i>        | 99%  | KM391959  | *        |
| <b>146</b>                                    | <i>Penicillium sp.</i>              | 98%  | KM249089  | *        |
| <b>138, 145, 150, 153, 155, 160, 166, 175</b> | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 99%  | JX068679  | KU197000 |
| <b>147, 151, 154, 157, 162, 168, 179</b>      | <i>Penicillium sp.</i>              | 99%  | KJ443120  | KU197001 |
| <b>158, 164</b>                               | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 99%  | JQ965865  | KU197009 |
| <b>156, 161, 167, 178</b>                     | <i>Debaryomyces hansenii</i>        | 99%  | JX068679  | KU197010 |
| <b>163, 171</b>                               | <i>Candida zeylanoides</i>          | 98%  | JQ965864  | *        |
| <b>140, 169</b>                               | <i>Galactomyces candidus</i>        | 99%  | KM115152  | *        |

|                                               |                              |     |          |   |
|-----------------------------------------------|------------------------------|-----|----------|---|
| 141, <b>170</b>                               | <i>Galactomyces candidus</i> | 99% | KM391959 | * |
| 148, <b>176</b>                               | <i>Galactomyces candidus</i> | 99% | KC967683 | * |
| 137, 143, 149, 152, 159, 165, 173, <b>177</b> | <i>Rhizopus stolonifer</i>   | 98% | AB250195 | * |

---

<sup>a</sup> Percentuale di identità tra la sequenza ottenuta dal sequenziamento e la sequenza nucleotidica relativa alla specie identificata dall'allineamento nel *database* GenBank. <sup>b</sup> *Accession number* relativo ad ogni specie identificata attraverso il BLAST. <sup>c</sup> *Accession number* delle sequenze identificate nel progetto e depositate nel *database* GenBank. \* Sequenze non depositate nel *database* GenBank in quanto più corte di 200bp.

#### 4.3.2. Analisi del DNA batterico

I profili DGGE ottenuti dall'analisi della regione V3 del gene codificante per il 16S rDNA amplificata con i primers 338f<sub>GC</sub>-518r del DNA batterico estratto direttamente dalla matrice dei campioni sottoposti ad analisi e dai *bulk* di colonia raccolti dai terreni di coltura selezionati sono mostrati nelle Figure II.5 e II.6.

La mappa dell'ecologia microbica di tutti i campioni sottoposti ad analisi PCR-DGGE è mostrata nelle Tabelle II.5 e II.6, mentre i risultati degli allineamenti condotti sulla piattaforma BLAST delle sequenze di DNA ottenute dal sequenziamento delle bande DGGE selezionate ed excise dal gel sono mostrati in Tabella II.7.

Dall'analisi DGGE emerge la presenza nel campione di latte crudo ovino delle seguenti specie microbiche *Acinetobacter johnsonii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Pseudomonas* spp. e *Lactococcus lactis*. Dall'analisi, è stato possibile rilevare la presenza nelle giovani fogli e steli della pianta *C. acanthifolia* All. di specie di *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Acinetobacter baumannii*, oltre ai membri dei gruppi *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius* e *Lactobacillus graminis/curvatus* e dei generi batterici *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e *Bacillus* spp. In particolare, membri di quest'ultimo genere sono stati rilevati anche nell'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. assieme ai membri del gruppo *Lactobacillus plantarum/paraplantarum/pentosus*. Composizione della popolazione batterica estremamente diversificata è stata inoltre riscontrata nelle due cagliate analizzate, infatti, mentre la cagliata ottenuta da caglio animale si caratterizza per la presenza di Enterobacteriaceae, la cagliata ottenuta dalla coagulazione con caglio vegetale, si caratterizzata per la presenza di specie di LAB quali *Lact. alimentarius/paralimentarius*, *Lact. plantarum/paraplantarum/pentosus*, specie *Pediococcus acidilactici*, e specie appartenenti al genere *Bacillus*.

Dall'analisi dei formaggi *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino di controllo emerge come alcune specie siano comuni ad entrambi i formaggi, come ad esempio *Enterococcus faecalis*, *L. lactis*, *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus*, *Lact. plantarum/paraplantarum/pentosus* e *Staphylococcus sciuri*. Mentre altre specie quali, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* e *Weissella* spp., sono state evidenziate solo nel formaggio *Caciofiore* e le specie *Bifidobacterium dentium*, *Citrobacter* spp., *E. hormaechei*, *Erwinia chrysanthemi* e *Lact. alimentarius/paralimentarius* sono state identificate solo nel formaggio Pecorino di controllo.

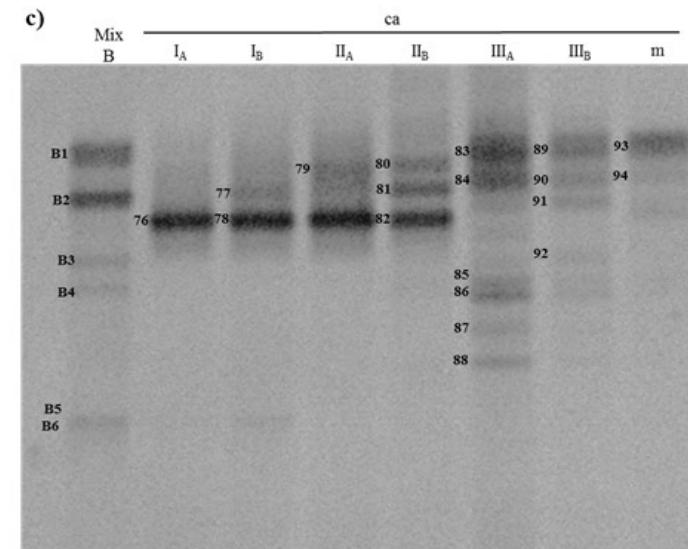
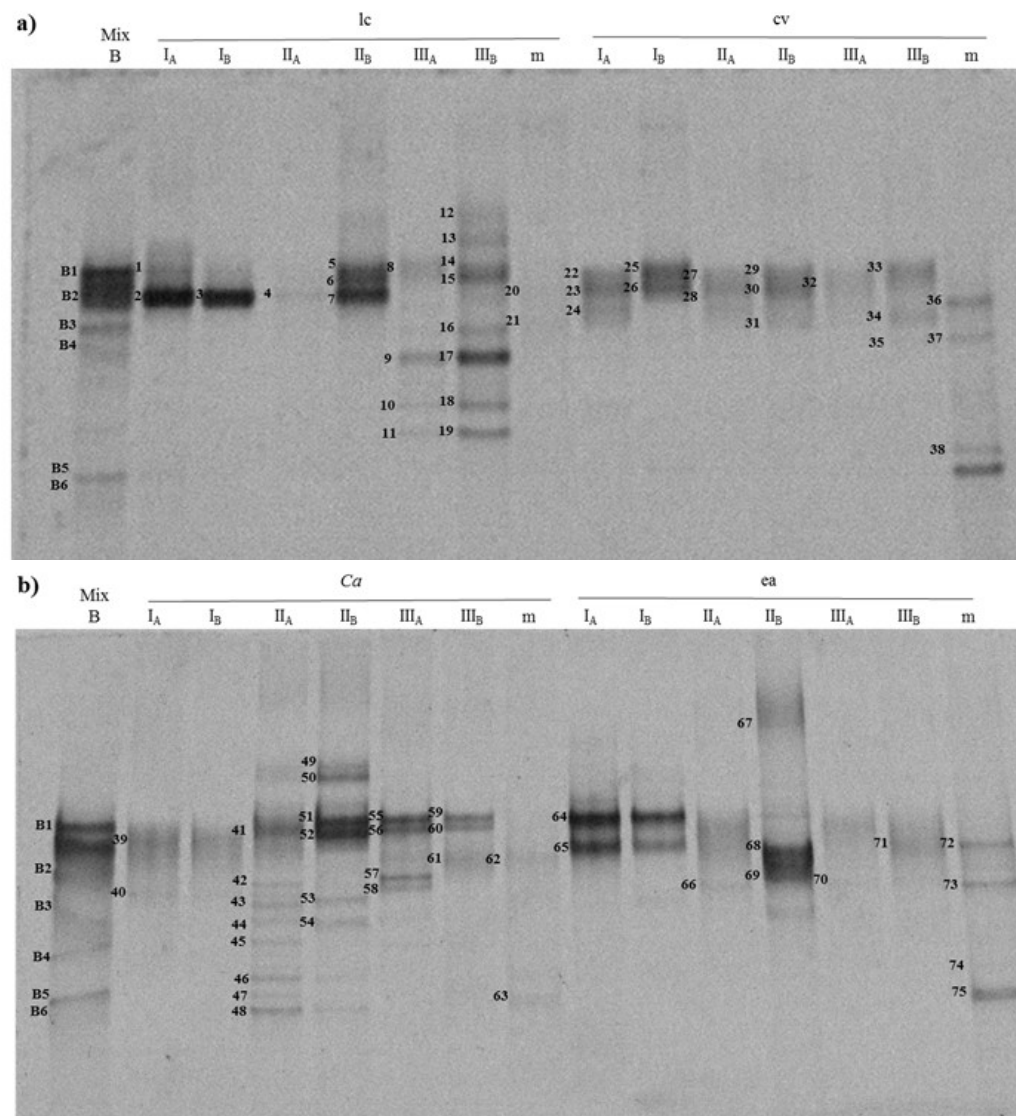


**Figura II.5.** Profilo DGGE del DNA batterico estratto dai *bulk* e dalla matrice dei campioni di latte crudo ovino (lc), cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte con il caglio vegetale (cv) (**a**), *Carlina acanthifolia* All. (*Ca*), estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. usato come caglio vegetale (ea) (**b**), cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte con il caglio animale commerciale (ca) (**c**).

Lanes I<sub>A</sub> - I<sub>B</sub>) DNA estratto dai *bulk* ottenuti dalle colonie raccolte nelle piastre di MRS agar aventi rispettivamente alta e bassa diluizione. Lanes II<sub>A</sub> - II<sub>B</sub>) DNA estratto dai *bulk* di colonia ottenuti da piastre di M17 agar incubate a 22 °C aventi rispettivamente alta e bassa diluizione. Lanes III<sub>A</sub> - III<sub>B</sub>) DNA estratto dai bulk cellulari ottenuti da piastre di M17 agar incubate a 45 °C aventi rispettivamente alta e bassa diluizione. Lane m) DNA totale estratto direttamente dal campione in esame. Lane Mix B (ladder mix): B1 - *Lactobacillus plantarum* DSMZ 2601; B2 - *Pediorococcus pentosaceus* DSMZ 20336<sup>T</sup>; B3- *Lactobacillus parabuchneri* DSMZ 5708; B4 - *Lactobacillus buchneri* DSMZ 20057; B5 - *Lactobacillus paracasei* NRRL 4560<sup>T</sup>; B6 - *Lactobacillus casei* NCIMB 4114.

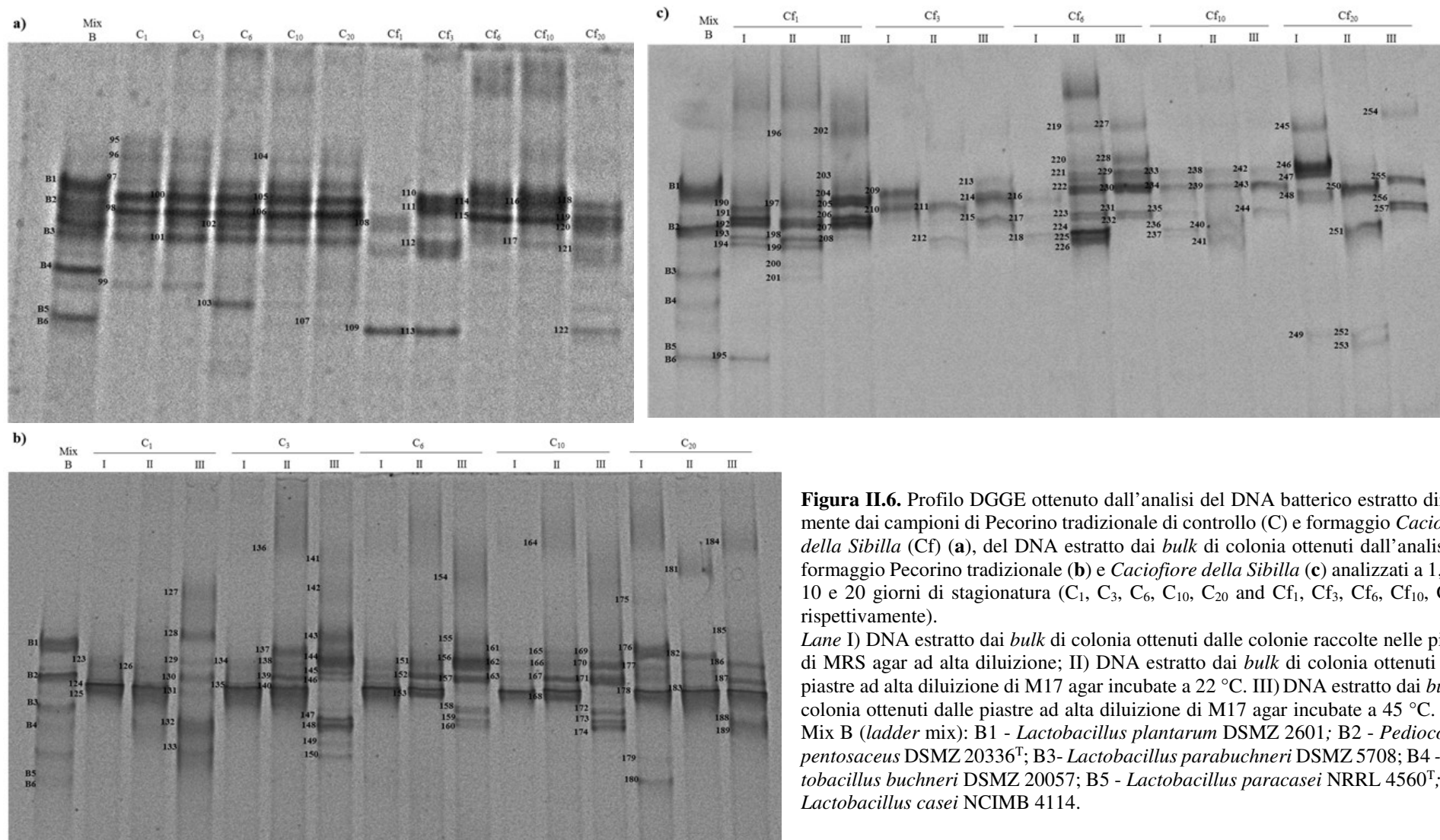


**Tabella II.5.** Specie batteriche identificate mediante analisi PCR-DGGE di latte crudo ovino, *Carlina acanthifolia* All. subsp. *Acanthifolia*, estratto acquoso, cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio vegetale e caglio animale commerciale.

| Specie batteriche                                                                 | Latte crudo ovino |   |             |   |             |   |   |     | <i>Carlina acanthifolia</i> All. |             |   |             |   |   |     |   | Estratto acquoso |   |             |   |   |     |   |             | Cagliata ottenuta da caglio vegetale |             |   |   |   |   |  |  | Cagliata ottenuta da caglio animale |  |  |  |  |  |  |  |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------|---|-------------|---|-------------|---|---|-----|----------------------------------|-------------|---|-------------|---|---|-----|---|------------------|---|-------------|---|---|-----|---|-------------|--------------------------------------|-------------|---|---|---|---|--|--|-------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|
|                                                                                   | MRS               |   | M17<br>22°C |   | M17<br>45°C |   | M | MRS |                                  | M17<br>22°C |   | M17<br>45°C |   | M | MRS |   | M17<br>22°C      |   | M17<br>45°C |   | M | MRS |   | M17<br>22°C |                                      | M17<br>45°C |   | M |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                   | A                 | B | A           | B | A           | B |   | A   | B                                | A           | B | A           | B |   | A   | B | A                | B | A           | B |   | A   | B | A           | B                                    | A           | B |   | A | B |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Acinetobacter baumannii</i>                                                    |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   | •           | • |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Acinetobacter johnsonii</i>                                                    |                   |   |             | • |             |   | • | •   |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             | •                                    | •           | • |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Bacillus cereus</i>                                                            |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   | • |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Bacillus</i> sp.                                                               |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   | •           |   | • |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Bacillus subtilis</i>                                                          |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   | • |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
|                                                                                   |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Enterobacter cloacae</i>                                                       |                   |   |             |   | •           |   | • |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             | • | • |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Enterobacter hormaechei</i>                                                    |                   |   |             |   | •           |   | • |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             | • | • |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Enterobacter</i> sp.                                                           |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             | • |             | • | • |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             | • | • |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Escherichia coli</i>                                                           |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             | • | • |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Kurthia gibsonii</i>                                                           |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             | • | • |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Lactobacillus alimentarius/</i><br><i>paralimentarius</i> group                |                   |   |             |   |             |   |   | •   |                                  | •           |   |             |   |   |     |   | •                |   | •           | • | • |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Lactobacillus graminis/</i><br><i>curvatus</i> group                           |                   |   |             |   |             |   |   | •   |                                  | •           |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Lactobacillus plantarum</i><br><i>/paraplantarum/</i><br><i>pentosus</i> group |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   | •                |   | •           |   | • |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Lactococcus lactis</i>                                                         |                   | • |             | • |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      | •           | • | • |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Pantoea agglomerans</i>                                                        |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             | • |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Pediococcus acidilactici</i>                                                   |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   | •                |   |             | • |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Pseudomonas alcaliphila</i>                                                    |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   | •           |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Pseudomonas</i> sp.                                                            |                   |   |             | • |             | • |   |     |                                  |             | • |             | • |   | •   |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             |   |   |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |
| <i>Staphylococcus chromogenes</i>                                                 |                   |   |             |   |             |   |   |     |                                  |             |   |             |   |   |     |   |                  |   |             |   |   |     |   |             |                                      |             | • | • |   |   |  |  |                                     |  |  |  |  |  |  |  |

• Bande DGGE risultanti dall'analisi del DNA estratto dalle colonie raccolte da piastre con alta (A) e bassa (B) diluizione o dal DNA estratto direttamente dalla matrice dei campioni (M) aventi una % di identità  $\geq 97\%$  con le sequenze presenti nel *database* GenBank.

**Tabella II.6.** Specie batteriche identificate tramite analisi PCR-DGGE durante la produzione e la stagionatura del formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo.

| Specie batteriche                                                      | t <sub>1</sub> |             |             |   | t <sub>3</sub> |             |             |   | t <sub>6</sub> |             |             |    | t <sub>10</sub> |             |             |    | t <sub>20</sub> |             |             |   |
|------------------------------------------------------------------------|----------------|-------------|-------------|---|----------------|-------------|-------------|---|----------------|-------------|-------------|----|-----------------|-------------|-------------|----|-----------------|-------------|-------------|---|
|                                                                        | MRS            | M17<br>22°C | M17<br>45°C | M | MRS            | M17<br>22°C | M17<br>45°C | M | MRS            | M17<br>22°C | M17<br>45°C | M  | MRS             | M17<br>22°C | M17<br>45°C | M  | MRS             | M17<br>22°C | M17<br>45°C | M |
| <i>Bifidobacterium dentium</i>                                         |                |             |             | ■ |                |             |             | ■ |                |             |             | ■  |                 |             |             | ■  |                 |             |             | ■ |
| <i>Citrobacter</i> sp.                                                 |                |             |             |   |                |             | ■           |   |                |             | ■           |    |                 |             | ■           |    |                 |             | ■           |   |
| <i>Enterobacter hormaechei</i>                                         |                |             |             | ■ |                |             |             | ■ |                |             |             |    |                 |             |             |    |                 |             |             |   |
| <i>Enterobacter</i> sp.                                                |                |             | ■           |   |                |             | ■           |   |                |             |             |    |                 |             |             |    |                 |             |             |   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                                           | ●              |             | ●■          |   |                |             |             |   | ■              | ●■          | ●■          |    | ■               | ■           | ■           |    |                 |             | ●■          |   |
| <i>Enterococcus faecium</i>                                            | ●              | ●           | ●           |   |                |             | ●           |   |                | ●           | ●           |    | ●               | ●           | ●           | ●  | ●               |             | ●           | ● |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>                                            |                |             |             | □ |                |             |             | □ |                |             |             | □  |                 |             |             | □  |                 |             |             | □ |
| <i>Lactobacillus alimentarius/</i><br><i>paralimentarius</i> group     |                |             |             | ■ |                |             |             | ■ |                |             |             | ■  |                 |             |             | ■  |                 |             |             | ■ |
| <i>Lactobacillus brevis</i>                                            | ●              |             |             |   | ●              | ●           |             |   |                |             |             |    |                 |             |             |    | ●               |             |             |   |
| <i>Lactobacillus casei/paracasei</i><br><i>/rhamnosus</i> group        |                |             |             | ● |                |             |             | ● |                |             |             |    |                 |             |             |    | ■               |             |             | ● |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>                                       | ●              | ●           | ●           |   |                | ●           |             |   | ●              | ●           |             |    | ●               | ●           |             |    |                 | ●           |             |   |
| <i>Lactobacillus</i><br><i>plantarum/ pentosus/paraplantarum</i> group | ●■             | ●■          | ●■          | ■ | ■              | ●■          |             | ■ | ●■             | ●■          | ■           | ●■ | ●■              | ●■          |             | ●■ | ■               | ●■          | ■           | ■ |
| <i>Lactococcus lactis</i>                                              | ●■             | ●■          | ●■          | ■ | ■              | ●■          |             | ■ | ●■             | ●■          | ■           | ●■ | ●■              | ●■          |             | ●■ | ■               | ●■          | ■           | ■ |
| <i>Leuconostoc mesenteroides/</i><br><i>pseudomesenteroides</i>        |                |             |             |   |                |             |             | ● |                |             |             |    |                 |             |             |    |                 | ●           |             | ● |
| <i>Staphylococcus sciuri</i>                                           |                | ●           | ●■          |   |                |             | ●■          |   | ●■             | ■           | ■           |    | ■               | ■           | ■           |    | ■               |             |             |   |
| <i>Weissella</i> sp.                                                   |                |             |             |   | ●              |             |             |   |                |             |             |    |                 |             |             |    |                 |             |             |   |

● Bande DGGE risultanti dall'analisi del DNA estratto dal campione di formaggio *Caciofiore della Sibilla* aventi una % di identità  $\geq 97\%$  con le sequenze presenti nel *database* GenBank; ■ Bande DGGE risultanti dall'analisi del DNA estratto dal campione di formaggio Pecorino tradizionale di controllo aventi una % di identità  $\geq 97\%$  con le sequenze presenti nel *database* GenBank; □ Bande DGGE risultanti dall'analisi del DNA estratto dal campione di formaggio Pecorino tradizionale di controllo aventi una % di identità  $< 97\%$  con le sequenze presenti nel *database* GenBank

t<sub>1</sub>: formaggio campionato ad un giorno di maturazione; t<sub>3</sub>: formaggio campionato a 3 giorni di maturazione; t<sub>6</sub>: formaggio campionato a 6 giorni di maturazione; t<sub>10</sub>: formaggio campionato a 10 giorni di maturazione; t<sub>20</sub>: formaggio campionato a 20 giorni di maturazione.

M: DNA estratto direttamente dalla matrice di formaggio *Caciofiore della Sibilla* o Pecorino tradizionale di controllo.

**Tabella II.7.** Risultati ottenuti dal sequenziamento delle bande excise dal gel DGGE.

| Banda                                                                                                                                                                                                  | Closest relative                  | % Ident. <sup>a</sup> | Acc.no. <sup>b</sup> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>1, 2, 3, 76, 78, 82, 98, 103, 106, 107, 115, 123, 124, 125, 126,</b> 129, 134, 135, <b>136,</b> 140, <b>153, 155,</b> 164, 168, 178, <b>180, 181,</b> 183, 184, 194, <b>199,</b> 218, 226, 237, 241 | <i>Lactococcus lactis</i>         | 100%                  | KT429894             |
| <b>4, 5, 7, 8, 14, 41, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 59</b>                                                                                                                                                  | <i>Pseudomonas sp.</i>            | 100%                  | HF546529             |
| <b>6, 15, 21, 77, 79, 80, 81</b>                                                                                                                                                                       | <i>Acinetobacter johnsonii</i>    | 99%                   | LN774358             |
| <b>43, 44, 46, 47, 48, 57, 58, 86, 127, 131, 132, 133, 142, 146, 149, 150</b>                                                                                                                          | <i>Enterobacter sp.</i>           | 100%                  | HQ439419             |
| <b>11, 12, 19, 85</b>                                                                                                                                                                                  | <i>Enterobacter cloacae</i>       | 99%                   | KP226566             |
| <b>13, 20, 36, 37, 38, 63, 66, 72, 73, 74, 75, 91, 100, 102, 105, 108, 114, 116, 161, 165, 169, 137, 138, 139, 182, 186, 201, 253</b>                                                                  | Failed                            |                       |                      |
| <b>9, 10, 16, 17, 18, 87, 88, 95, 99</b>                                                                                                                                                               | <i>Enterobacter hormaechei</i>    | 98%                   | HM584024             |
| <b>22, 25, 26, 29, 33, 64, 65, 175, 176, 246, 247, 249, 252</b>                                                                                                                                        | <i>Lactobacillus plantarum</i>    | 99%                   | KJ775808             |
|                                                                                                                                                                                                        | <i>/pentosus</i>                  |                       | KT634227             |
|                                                                                                                                                                                                        | <i>/paraplantarum</i>             |                       | KU315098             |
| <b>23, 27, 30, 32, 40, 101</b>                                                                                                                                                                         | <i>Lactobacillus alimentarius</i> | 98%                   | M58804               |
|                                                                                                                                                                                                        | <i>/paralimentarius</i>           |                       | AB626063             |
| <b>24, 28</b>                                                                                                                                                                                          | <i>Pediococcus acidilactici</i>   | 99%                   | KM921945             |
| <b>31, 34, 61, 62, 70, 200</b>                                                                                                                                                                         | <i>Bacillus sp.</i>               | 99%                   | HM755812             |
| <b>35, 69</b>                                                                                                                                                                                          | <i>Bacillus subtilis</i>          | 98%                   | GQ392055             |
| <b>39</b>                                                                                                                                                                                              | <i>Lactobacillus graminis</i>     | 96%                   | LC063167             |
|                                                                                                                                                                                                        | <i>/curvatus</i>                  |                       | KP117256             |
| <b>42, 45</b>                                                                                                                                                                                          | <i>Pantoea agglomerans</i>        | 99%                   | AB681812             |
| <b>54</b>                                                                                                                                                                                              | <i>Pseudomonas alcaliphila</i>    | 97%                   | EU144361             |
| <b>56, 60</b>                                                                                                                                                                                          | <i>Acinetobacter baumannii</i>    | 100%                  | AY269241             |
| <b>67, 68, 71</b>                                                                                                                                                                                      | <i>Bacillus cereus</i>            | 100%                  | KF782833             |
| <b>83, 89, 93</b>                                                                                                                                                                                      | <i>Kurthia gibsonii</i>           | 99%                   | KT165384             |
| <b>84, 90, 94</b>                                                                                                                                                                                      | <i>Staphylococcus chromogenes</i> | 99%                   | KR028439             |
| <b>92</b>                                                                                                                                                                                              | <i>Escherichia coli</i>           | 99%                   | KC539468             |
| <b>96, 104</b>                                                                                                                                                                                         | <i>Bifidobacterium dentium</i>    | 100%                  | AP012326             |
| <b>97</b>                                                                                                                                                                                              | <i>Erwinia chrysanthemi</i>       | 96%                   | DQ123809             |
| <b>109, 113, 122, 179</b>                                                                                                                                                                              | <i>Lactobacillus casei</i>        | 97%                   | KM921936             |
|                                                                                                                                                                                                        | <i>/paracasei</i>                 |                       | KT626389             |
|                                                                                                                                                                                                        | <i>/rhamnosus</i>                 |                       | KT626387             |
| <b>110, 111, 112, 118, 119, 120, 250</b>                                                                                                                                                               | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>  | 96%                   | KR137536             |
|                                                                                                                                                                                                        | <i>/pseudomesenteroides</i>       |                       | KJ186948             |
| <b>117, 121, 191, 195, 196, 202, 206, 213, 215, 219, 220, 221, 222, 223, 227, 228,</b> 229, 230, 231, 233, 234, 235, 238, 239, 242, 243, 244, 245, 254, 255, <b>256</b>                                | <i>Enterococcus faecium</i>       | 98%                   | KM921922             |
| <b>130, 152, 157, 163, 167, 171, 187, 192, 204, 207, 224, 232, 257</b>                                                                                                                                 | <i>Enterococcus faecalis</i>      | 98%                   | KP298396             |
| <b>128, 141, 143,</b> 144, <b>145,</b> 151, <b>154,</b> 156, 162, 166, <b>170,</b> 177, 197, <b>203, 205,</b> 214, 216                                                                                 | <i>Staphylococcus sciuri</i>      | 99%                   | JQ511682             |
| <b>147, 148, 158, 159, 160, 172, 173, 174, 185, 188, 189</b>                                                                                                                                           | <i>Citrobacter sp.</i>            | 99%                   | KP212094             |
| <b>190, 210, 211, 248</b>                                                                                                                                                                              | <i>Lactobacillus brevis</i>       | 99%                   | KP221640             |
| <b>193,</b> 198, 208, 212, 217, 225, 236, 240, 251                                                                                                                                                     | <i>Lactobacillus delbrueckii</i>  | 97%                   | JN969331             |
| <b>209</b>                                                                                                                                                                                             | <i>Weissella sp.</i>              | 99%                   | KF598906             |

<sup>a</sup> Percentuale di identità tra la sequenza ottenuta dal sequenziamento e la sequenza nucleotidica relativa alla specie identificata dall'allineamento nel database GenBank. <sup>b</sup> Accession number relativo ad ogni specie identificata attraverso il BLAST.

#### 4.4. Sequenziamento con sistema Illumina MySeq

I dati grezzi ottenuti dal sequenziamento della regione V3-V4 del gene 16S rDNA sono stati sottoposti alle operazioni di *splitting* e *trimming*, ottenendo in tal modo 62772 *reads* utili, da sottoporre alle successive analisi. Dopo l'allineamento, le unità tassonomiche operative sono state raggruppate utilizzando come parametro una distanza del 3% e le OTUs costituite esclusivamente da una o due *reads* (*singletons* e *doubles*) sono state escluse automaticamente dal software QIIME. Mediante l'indice Chao1 è stato calcolato il valore stimato di OTUs attese pari a 688 e  $231 \pm 43$  OTUs rispettivamente per il latte crudo ovino e i campioni di formaggio; tali dati confrontati con il numero di OTUs realmente identificate, pari a 661 e  $176 \pm 40$  OTUs, ha permesso di definire una copertura del 96% per il campione di latte e del 76% per i campioni di formaggio.

L'abbondanza relativa, espressa come %, dei differenti gruppi batterici identificati nel latte crudo ovino, nella cagliata ottenuta dalla coagulazione con caglio vegetale ed animale, e nei formaggi *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino di controllo a 1, 3 e 20 giorni di stagionatura è mostrata nella Figura II.7.

Dall'analisi delle abbondanze relative è emerso come molte OTU, identificate nei campioni analizzati, sono classificate come cloroplasti; in particolare queste OTUs risultano poco abbondanti nei campioni di latte, cagliata ottenuta con caglio animale commerciale e formaggio *Caciofiore della Sibilla* a 3 e 20 giorni di stagionatura, rappresentando meno del 1,2 % del numero di *reads* totali, ad eccezione del formaggio *Caciofiore della Sibilla* a 20 giorni di stagionatura dove rappresentano il 10,6% delle *reads* totali. Al contrario, nei campioni di cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte ovino con il caglio vegetale e di formaggio *Caciofiore della Sibilla* ad 1 giorno di stagionatura queste OTUs risultano particolarmente abbondanti, pari rispettivamente al 81,9 e 78,5 % delle *reads* totali.

Dall'analisi Illumina emerge come il 60% delle OTUs identificate nel campione di latte crudo ovino appartenano essenzialmente a due differenti ordini batterici (Lactobacillales e Clostridiales) e alla famiglia Enterobacteriaceae; ordine/famiglia/genere presenti in forma minoritaria sono inoltre Bacteroidales, Planococcaceae e *Staphylococcus*. Nella cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte crudo ovino con caglio animale commerciale sono stati identificati l'ordine Lactobacillales, le famiglie Planococcaceae ed Enterobacteriaceae e i generi *Staphylococcus* e *Macroccoccus* mentre nella cagliata vegetale sono stati identificati Lactobacillales, Enterobacteriaceae e *Staphylococcus*.

Per quanto riguarda entrambi formaggi, l'ordine Lactobacillales rappresenta circa il 65% delle OTUs identificate alla fine del periodo di stagionatura, assieme alla presenza della famiglia minoritaria Enterobacteriaceae nel formaggio Pecorino di controllo e del genere *Macrococcus* e del *phylum* Acidobacteria nel formaggio *Caciofiore della Sibilla*.

Una panoramica più dettagliata dei generi microbici appartenenti all'ordine Lactobacillales è mostrata nella Figura II.8. In particolare il latte crudo è stato caratterizzato dalla presenza dei generi *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* e *Weissella*, seppur gli ultimi due generi siano presenti con un'abbondanza relativa estremamente bassa inferiore allo 0,1 %. Dall'analisi si evince inoltre come il formaggio *Caciofiore della Sibilla* e la relativa cagliata sono stati caratterizzati dalla co-dominanza dei generi *Lactobacillus* e *Leuconostoc*, al contrario del formaggio Pecorino di controllo e della sua relativa cagliata che si caratterizzano per la presenza del genere *Lactococcus*.

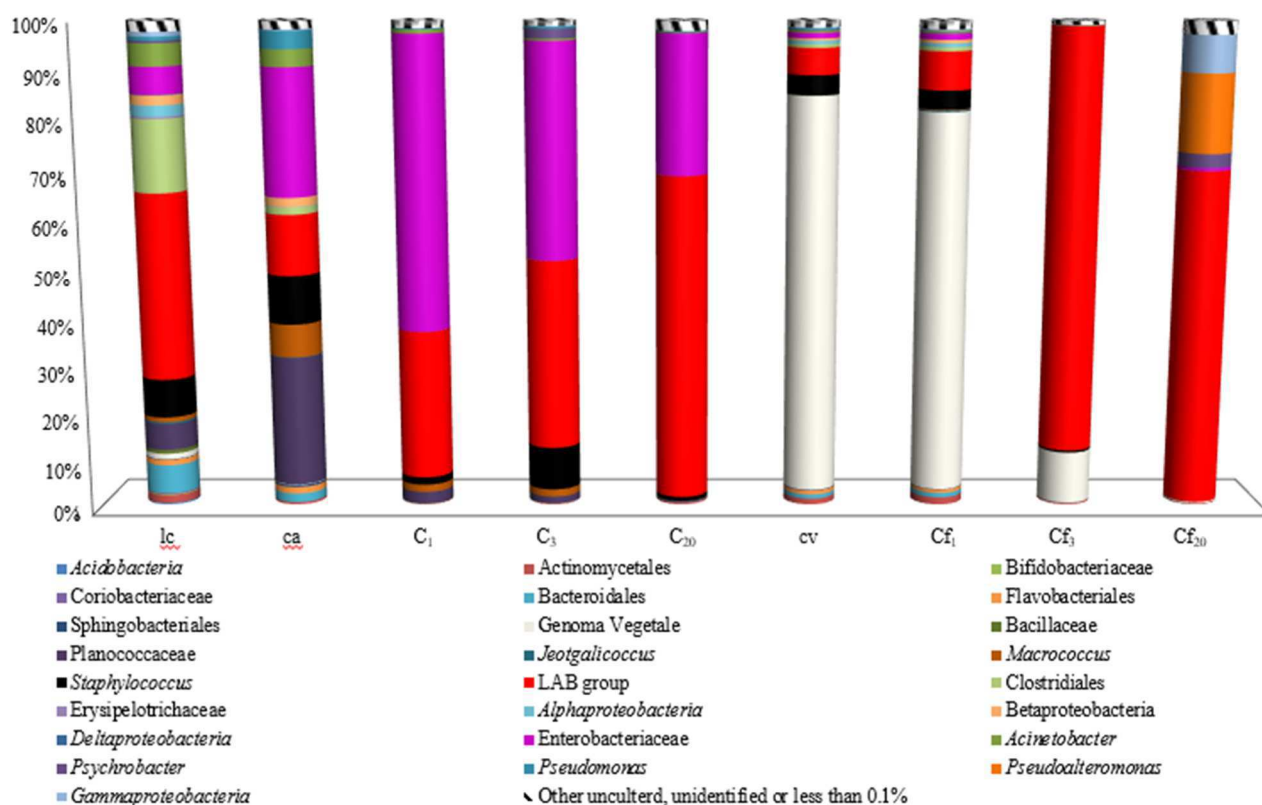


**Figura II.7.** Abbondanza relativa % dei differenti generi batterici identificati attraverso la tecnica Illumina MySeq nei campioni di latte crudo ovino (lc), cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio animale commerciale (ca), cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio vegetale (cv), formaggio Pecorino di Controllo e Caciofiore della Sibilla a 1, 3 e 20 giorni di maturazione (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>20</sub>, Cf<sub>1</sub>, Cf<sub>3</sub>, Cf<sub>20</sub>). “Other uncultured, unidentified or less than 0.1%” identifica tutti i generi batterici non identificati o la cui abbondanza relativa è risultata inferiore allo 0,1%.

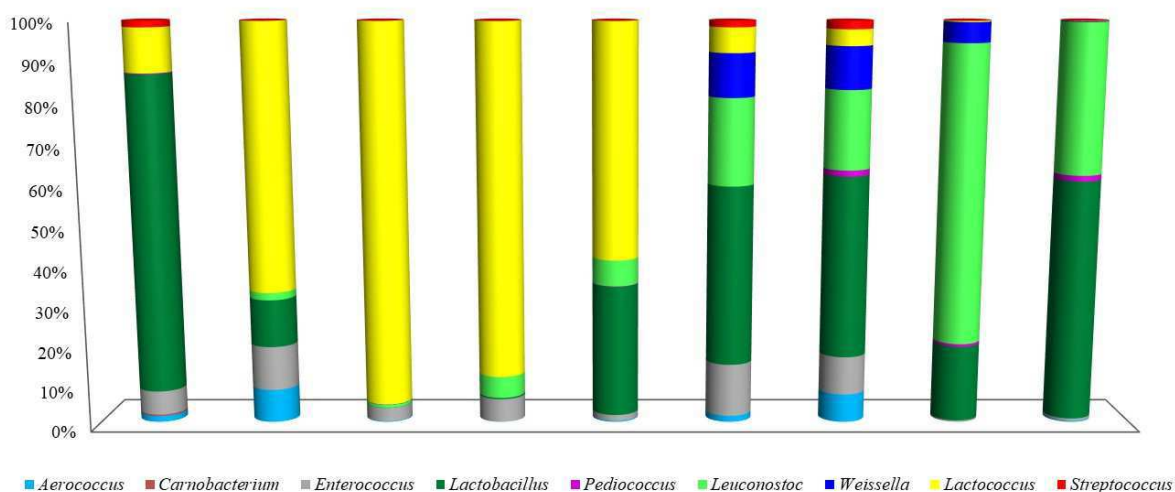


**Figura II.8** Abbondanza relativa % dei differenti generi appartenenti all’ordine Lactobacillales identificati attraverso la tecnica Illumina MySeq nei campioni di latte crudo ovino (lc), cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio animale commerciale (ca), cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio vegetale (cv), formaggio Pecorino di Controllo e Caciofiore della Sibilla a 1, 3 e 20 giorni di maturazione (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>20</sub>, Cf<sub>1</sub>, Cf<sub>3</sub>, Cf<sub>20</sub>).

## 5. Discussione e conclusione

Numerosi studi sono stati condotti al fine di valutare l'impatto di coagulanti vegetali, in particolare *C. cardunculus*, *C. scolymus* o *C. humilis*, sulla diversità e sulla dinamica del microbiota di formaggi tradizionali soprattutto italiani, spagnoli e portoghesi (Gomez *et al.*, 2001; Vioque *et al.*, 2000; Tejada & Fernández-Salguero, 2003; Aquilanti *et al.*, 2011; Aquilanti *et al.*, 2013), ma nessuno studio è stato precedentemente condotto sull'uso di coagulante vegetale ottenuto dalla pianta *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*

L'analisi microbiologica del latte crudo di pecora di razza *Sopravissana*, utilizzato nel presente lavoro sperimentale, ha evidenziato una corrispondenza con i dati riportati da altri autori su latte ovino. In particolare, la carica fungina rilevata è risultata paragonabile o leggermente inferiore a quanto presente in bibliografia (Vioque *et al.*, 2000; Roseiro *et al.*, 2003; Pangallo *et al.*, 2014; Gardini *et al.*, 2006; Tejada & Fernández-Salguero, 2003), così come la carica batterica di lattococchi, cocchi termofili, lattobacilli, cocchi coagulasi-negativi, mesofili aerobi totali, enterococchi ed Enterobacteriaceae è stata identificata come analoga a quanto riportato da Quigley *et al.* (2013) e Pangallo *et al.* (2014). La contaminazione fungina, risultata relativamente bassa può essere attribuita principalmente all'interazione competitiva per i substrati di crescita da parte dei batteri o all'escrezione di metaboliti inibenti (Viljoen, 2001).

Per l'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. è stata evidenziata un'analogia con quanto descritto da Aquilanti *et al.* (2011) e Barbosa *et al.* (1981) su estratto acquoso di *C. Cardunculus* relativamente alla carica di batteri aerobi mesofili totali e lattobacilli; mentre cariche microbiche apparentemente più basse sono state riscontrate per lattococchi e cocchi termofili rispetto a quanto descritto dagli stessi autori.

L'analisi di entrambi i formaggi in studio, *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo, dopo 1 giorno di maturazione, ha evidenziato un incremento della carica microbica eumicetica rispettivamente di 3 e 2 ordini logaritmici rispetto al latte crudo ovino. Le analisi hanno, inoltre, evidenziato per il formaggio *Caciofiore della Sibilla* una carica batterica uguale o di 1 ordine logaritmico superiore rispetto al latte crudo, fatta eccezione per le Enterobacteriaceae che hanno mostrato un decremento di 2 ordini logaritmici; mentre per il Pecorino tradizionale di controllo è stato evidenziato un incremento da 2 a 4 ordini logaritmici rispetto al latte ovino. Al termine del periodo di stagionatura, 20 giorni, il formaggio *Caciofiore della Sibilla* ha mostrato una carica eumicetica più elevata rispetto a quanto descritto da altri autori in formaggi prodotti con caglio vegetale

ottenuto dalla pianta *C. Cardunculus*, a 15 giorni di maturazione (Gomez *et al.*, 2001; Vioque *et al.*, 2000; Tejada & Fernández-Salguero, 2003). Per quanto concerne la popolazione batterica, le conte delle Enterobacteriaceae sono risultate inferiori a quanto descritto da altri autori (Gomez *et al.*, 2001; Vioque *et al.*, 2000), i batteri mesofili totali sono risultati paragonabili a quanto descritto da vari autori (Vioque *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2001; Tejada & Fernández-Salguero, 2003; Aquilanti *et al.*, 2011; Aquilanti *et al.*, 2013), mentre le conte dei batteri lattici sono risultate più alte rispetto a quanto riportato dagli stessi autori (Vioque *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2001; Aquilanti *et al.*, 2011) su formaggi prodotti con l'uso di coagulati vegetali. Analogamente, le conte di lattococchi e cocchi termofili sono risultate più elevate rispetto a quanto descritto da Aquilanti *et al.* (2011).

Attraverso le analisi PCR-DGGE e Illumina *sequencing* del DNA estratto dai campioni di latte crudo ovino, caglio vegetale, cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio vegetale, cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio animale commerciale, formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale è stato possibile descrivere l'evoluzione della popolazione microbica batterica e fungina.

Lo studio della diversità e della dinamica della popolazione eumicetica attraverso la tecnica PCR-DGGE ha permesso di identificare una vasta gamma di specie precedentemente già descritta da altri autori in campioni di latte crudo, cagliata o formaggio, quali *K. marxianus* (Macedo *et al.*, 1995; Lavoie *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013), *D. hansenii*, *S. cerevisiae* e *Rhodotorula* spp. (Capece & Romano, 2009; Cosentino *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2001). La specie *K. marxianus* è nota per la produzione di composti aromatici durante la fase di maturazione con impatto positivo sul profilo aromatico del formaggio e per la parziale de-acidificazione del mezzo che influenza la crescita di batteri acido-sensibili (Corsetti *et al.*, 2001). Azione molto importante durante la fase di maturazione dei formaggi è svolta anche dalla specie *D. hansenii*, la quale crescendo ad elevate concentrazioni di sale e bassi valori di pH (Beresford *et al.*, 2001; Büchl & Seiler, 2011; Padilla *et al.*, 2014) è in grado di sfruttare varie fonti di carbonio e azoto e produrre enzimi proteolitici e lipolitici capaci di metabolizzare le proteine e i grassi del latte (Banjara *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2015).

Analogamente, la specie *R. mucilaginosa* si caratterizza per un'elevata attività proteolitica e lipolitica (Fadda *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2015) e risulta anch'essa frequentemente descritta nel latte crudo e nei formaggi a latte crudo (Fadda *et al.*, 2010; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2001; Cocolin *et al.*, 2002; Borelli *et al.*,

2006; Quigley *et al.*, 2013; Lavoie *et al.*, 2012). Altre specie identificate quali *C. membranifaciens*, *G. candidum* e *P. inconspicua* sono state raramente descritte in prodotti caseari, mentre la specie *M. guilliermondii* risulta essere identificata per la prima volta in un formaggio prodotto con latte crudo ovino. Quest'ultima specie, con azione di controllo sullo sviluppo eumicetico in frutti in fase di post-raccolta (Pelliccia *et al.*, 2011; Corte *et al.*, 2015), è stata precedentemente identificata esclusivamente in formaggi a base di latte di capra o di mucca, nonché in burro, yogurt e più in generale nell'ambiente di caseificazione (Büchl & Seiler, 2011; Giannino *et al.*, 2011; Callon *et al.*, 2006). Attraverso l'analisi del profilo PCR-DGGE del microbiota eumicetico è stato possibile evidenziare una correlazione diretta ed univoca tra determinate specie e specifici campioni come ad esempio, il *S. cerevisiae* nel latte crudo ovino, le specie *C. parapsilopsis* e *R. mucillaginosa* nelle fasi iniziali di maturazione dei formaggi o il genere *Penicillium* sp. nelle fasi tardive della maturazione. Ulteriori specie, in particolare *C. zeylanoides* e *D. hansenii* sono state identificate durante tutta la maturazione dei formaggi. Altre specie identificate nel formaggio sono state *C. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *R. stolonifer* e *Y. lipolytica*; mentre specie quali *C. cladosporioides* e *C. wieringae* risultano solo sporadicamente presenti nei campioni in studio. Tra le specie identificate, la specie *M. guilliermondii* e *K. marxianus* sono state identificate univocamente rispettivamente nel formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale. La presenza di alcune specie nei formaggi può essere correlata a contaminazioni dovute alle materie prime usate o all'ambiente lattiero-caseario stesso; in particolare, mentre per le specie *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *K. marxianus* e *R. mucillaginosa* è stata ipotizzata una correlazione diretta con l'uso di latte crudo, per le specie *C. membranifaciens*, *C. inconspicua*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *R. stolonifer* e *Y. lipolytica* è stata ipotizzata una correlazione diretta con l'ambiente lattiero-caseario.

Lo studio della diversità e della dinamica della popolazione batterica attraverso l'approccio combinato PCR-DGGE e Illumina *sequencing* ha permesso di identificare un numero estremamente elevato di *taxa*, in particolare con la tecnica Illumina è stato possibile identificare i generi batterici maggioritari e minoritari mentre le singole specie sono state identificate con la tecnica PCR-DGGE. Discrepanze dei profili microbici sono state identificate tra l'analisi del DNA estratto direttamente da matrice e da *bulk* di colonie, sia in termini di numero di *taxa* identificati sia di abbondanza relativa, in accordo con quanto descritto da Aquilanti *et al.* (2016) su modelli di formaggio a pasta semidura.

Nel latte crudo ovino, la PCR-DGGE ha permesso di identificare la specie *L. lactis* come unico rappresentante dei batteri lattici; tale risultato è stato in parte confermato dall'analisi Illumina, mediante la quale è stato possibile identificare il genere *Lactococcus* seppur minoritario rispetto al genere maggioritario *Lactobacillus*. Questi dati risultano in accordo con quanto descritto da Aquilanti *et al.* (2007), Quigley *et al.* (2013) e Pangallo *et al.* (2014) su campioni di latte crudo ovino. In particolare, la presenza della specie *L. lactis* è stata confermata in due studi condotti su formaggi prodotti con estratto acquoso della pianta di *C. cardunculus* usato come caglio vegetale (Aquilanti *et al.*, 2011; 2013). Altri generi quali: *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus* sono stati identificati in campioni di latte crudo ovino mediante tecniche di *Next-generation sequencing* (Quigley *et al.*, 2013).

L'analisi PCR-DGGE del DNA estratto dalla pianta *C. acanthifolia* All. e dell'estratto acquoso ha permesso di identificare varie specie di batteri lattici, alterativi e batteri ambientali. Pochi sono gli studi sul microbiota dei cardì e di estratti acquosi prodotti a partire da queste specie vegetali; nel 1968 Mundt e Hammer hanno identificato, per la prima volta, su superfici vegetali le specie *Lact. plantarum*, *Lactobacillus fermenti* e *Lact. brevis*, come specie predominanti, mentre le specie *Lact. casei*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus buchneri* sono risultate meno frequenti. Recentemente, Widnyana e Javandira (2016) hanno dimostrato che le specie *Bacillus* spp. e *Pseudomonas* spp. sono in grado di determinare un'attività stimolante nella crescita dei tessuti vegetali e un'attività inibitoria nei confronti di agenti patogeni su piante di pomodoro.

Lactobacilli appartenenti ai gruppi microbici *Lact. alimentarius/paralimentarius* e *Lact. plantarum/paraplantarum/pentosus*, rilevati attraverso l'analisi PCR-DGGE del DNA estratto dai campioni di giovani foglie e steli della pianta *C. acanthifolia* All. e nel caglio vegetale, sono stati identificati anche nella cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte ovino con caglio vegetale, suggerendo così il ruolo del coagulante vegetale sulle prime fasi di produzione del formaggio *Caciofiore della Sibilla*. Al contrario, la presenza nella medesima cagliata della specie *P. acidilactici* è stata correlata verosimilmente ad una contaminazione ambientale, in quanto la sua presenza non è stata rilevata in nessun altro campione in studio. Un profilo microbico diverso è emerso dall'analisi della cagliata ottenuta dalla coagulazione di latte con caglio animale commerciale; il sequenziamento Illumina ha mostrato tra i generi microbici di batteri lattici, che sono risultati minoritari, la dominanza

del genere *Lactococcus*, derivato verosimilmente dal latte utilizzato per la caseificazione. Attraverso l'analisi PCR-DGGE, è stata confermata la presenza della specie *L. lactis*, quale unica specie pro-tecnologica, insieme a varie specie batteriche alterative o patogene. Inoltre, la presenza stabile della specie *L. lactis* confermata da entrambe le tecniche, nel formaggio *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale è stata correlata alla presenza di questa specie nel latte crudo ovino usato per la caseificazione. La presenza di questa specie nel latte e nei prodotti lattiero-caseari è stata evidenziata da vari autori (Cavanagh *et al.*, 2015; Šaková *et al.*, 2015; Sádecká *et al.*, 2016) e recentemente, è stata dimostrata la sua possibile permanenza fino al termine della maturazione del formaggio sia nella forma vitale sia nella forma vitale ma non coltivabile (VBNC) (Ruggirello *et al.*, 2016).

Attraverso le analisi Illumina *sequencing* e PCR-DGGE è stato possibile identificare la dominanza durante tutto il processo di maturazione, nel formaggio *Caciofiore della Sibilla* dei generi *Leuconostoc* e *Lactobacillus*, in aggiunta al genere *Lactococcus*. La dominazione del genere *Leuconostoc* durante la maturazione del formaggio *Caciofiore della Sibilla* può essere spiegata dal valore di pH più alto della cagliata ottenuta dalla coagulazione con caglio vegetale, rispetto alla cagliata ottenuta dalla coagulazione del latte con caglio animale. Infatti, come descritto da Hemme e Foucaud-Scheunemann (2004), la crescita delle specie appartenenti al genere *Leuconostoc* è influenzata notevolmente dall'acidificazione del mezzo di crescita. Il genere *Leuconostoc* è stato inoltre identificato esclusivamente con la tecnica Illumina *sequencing*, come taxa minoritario nel formaggio Pecorino tradizionale, mentre non è stato identificato mediante la tecnica PCR-DGGE. Inoltre la presenza del genere *Leuconostoc* nel formaggio *Caciofiore della Sibilla*, non supportata dalla sua identificazione dei campioni di latte crudo ovino, caglio vegetale e rispettiva cagliata, fa supporre una contaminazione dall'ambiente di lavorazione. Tuttavia, membri del genere *Leuconostoc* sono stati precedentemente individuati in un formaggio Caciotta prodotta con l'estratto acquoso dei fiori secchi della pianta *C. cardunculus* (Aquilanti *et al.*, 2011), nonché in altri formaggi prodotti con coagulanti vegetali, come la Serra da Estrela PDO e il formaggio La Serena PDO (Macedo *et al.*, 2004). *Lact. delbrueckii*, *Lact. brevis* ed *E. faecium* sono stati identificati esclusivamente nel formaggio *Caciofiore della Sibilla* durante il periodo di maturazione ed è ipotizzabile che la loro presenza sia derivata dal caglio vegetale, dove però i bassi livelli non ne hanno permesso l'identificazione. Tale ipotesi è avvalorata da una ricerca di Joung *et al.* (2016) nella quale è stata identificata

una sottospecie di *Lact. delbrueckii* la cui crescita è positivamente influenzata dall'aggiunta di estratti vegetali al latte; contestualmente la specie *Lact. brevis* è stata recentemente identificata in matrici a base vegetale (Ruiz Rodriguez *et al.*, 2016).

Gli enterococchi, naturalmente presenti nel tratto gastro-intestinale dell'uomo, possono entrare nell'ambiente lattiero-caseario attraverso contaminazioni crociate, svolgendo nel formaggio un ruolo cruciale durante la maturazione del formaggio, grazie alla spiccata capacità di adattamento all'ambiente formaggio (Giraffa, 2003) e di produrre batteriocine (Íspirli *et al.*, 2017).

Nel presente lavoro, attraverso entrambe le tecniche PCR-DGGE e Illumina *sequencing* è stato possibile evidenziare elevati livelli di Enterobacteriaceae nel formaggio Pecorino tradizionale rispetto a quanto identificato nel formaggio *Caciofiore della Sibilla*; questo dato tuttavia non è stato supportato dalle conte vitali in piastra, tramite le quali per i due formaggi sono state rilevate cariche vitali pressoché comparabili su terreno selettivo VRBGA.

Concludendo è possibile affermare che solo mediante un approccio analitico combinato è stato possibile identificare le differenze e le somiglianze del microbiota dei formaggi *Caciofiore della Sibilla* e Pecorino tradizionale di controllo. L'integrazione dei dati ottenuti dalle conte vitali in piastra e dall'analisi PCR-DGGE ha permesso di ottenere una descrizione della popolazione eumicetica delle matrici e dei formaggi prodotti, così come tali approcci correlati al sequenziamento con la tecnica Illumina ha permesso una descrizione ancor più dettagliata della popolazione batterica in esame. In particolare, i risultati ottenuti hanno permesso di confermare l'importante ruolo dei batteri lattici nella produzione e maturazione del formaggio, confermando l'associazione dei generi *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc* con il formaggio e più in generale con l'ambiente lattiero-caseario.

Lo studio ha permesso, inoltre, di dimostrare l'influenza dell'estratto acquoso di *C. acanthifolia* All. usato come coagulante vegetale sulla dinamica e la diversità della popolazione batterica iniziale del formaggio *Caciofiore della Sibilla*.

## 6. Bibliografia

- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmasso, A., Civera, T., Cocolin, L. 2010. Microbiota of the Planalto de Bologna: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26: 2211-2221.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215: 403-410.
- American Public Health Association, 1978. Standard Methods for the Examination of Dairy Products. 14th ed. APHA Inc, Washington DC .
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5464-5473.
- Aquilanti, L., Babini, V., Santarelli, S., Osimani, A., Petruzzelli, A., Clementi, F. 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in Applied Microbiology* 52:651-659.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Babini, V., Osimani, A., Clementi, F. 2013. Quality evaluation and discrimination of semi-hard and hard cheeses from the Marche region (Central Italy) using chemometric tools. *International Dairy Journal* 29:42-52.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A., Clementi, F. 2007. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 120:136-145.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Babini, V., Osimani, A., Garofalo, C., Polverigiani, S., Clementi, F. 2016. PCR-DGGE for the profiling of cheese bacterial communities: strengths and weaknesses of a poorly explored combined approach. *Dairy Science & Technology* 96:747-761.
- Baker, G.C., Smith, J.J., Cowan, D.A. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* 55:541-555.
- Banjara, N., Suhr, M.J., Hallen-Adam, H.E. 2015. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Current Microbiology* 70:792-800.
- Barbosa, M., Corradini, C., Battistoni, B. 1981. Cheesemaking experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Sci. Tecn. Latt. Cas.* 32, 203-221.
- Beresford, T.P., Fittsimons, N.A., Brennan, N.L., Cogan, T.M. 2001. Recent advance in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11:259-74.
- Borelli, B.M., Ferreira, E.G., Lacerda, I.C.A., Franco, G.R., Rosa, C.A. 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22:1115-1119.
- Büchl, N.R., Seiler, H. 2011. Yeasts and molds-yeasts in milk and dairy products. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2nd edn, Roginski H, Fuquay JW, Fox PF (eds). Elsevier, New York; 744-753.
- Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., Montel, M.C. 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Systematic and Applied Microbiology* 29: 172-180.
- Capece, A., Romano, P. 2009. "Pecorino di Filiano" cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 132: 180-184.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh,

- P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336.
- Cardoso, V.M., Borelli, B.M., Lara, C.A., Soares, M.A., Pataro, C., Bodevan, E.C., Rosa, C.A. 2015. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International* 69: 331-340.
- Carreira, A., Paloma, L., Loureiro, V. 1998. Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology* 41: 223-230.
- Cassini, H. 1819. Suite du sixième mémoire sur la famille des synanthérée. *The Journal of Physical Chemistry* 88: 189-204.
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G.F., McAuliffe, O. 2015. From field to fermentation: The origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiology* 47:45-61.
- Chao, A., Bunge, J. 2002. Estimating the number of species in a stochastic abundance model. *Biometrics* 58: 531-539.
- Chapman, G.H. 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology* 50:201-203.
- Charlet, M., Duboz, G., Faurie, F., Le Quéré, J.-L., Berthier, F. 2009. Multiple interactions between *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* strongly affect their growth kinetics during the making of hard cooked cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 131:10-19.
- Claesson, M.J., Wang, Q., O'Sullivan, O., Greene-Diniz, R., Cole, J.R., Ross, R.P., O'Toole, P.W. 2010. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Research* 38:200.
- Cocolin L, Aggio D, Manzano M, Cantoni, C., Comi, G. 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* 12: 407-11.
- Cocolin, L., Bisson, L.F., Mills, D.A. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189: 81-87.
- Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 67:5113-5121.
- Cogan, T.M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P.S., Fernandez, I., Gomez, M.J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Medina, M., Rea, M.C., Rodriguez, E. 1997. Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. *Journal of Dairy Research* 64:409-421.
- Corbo, M.R., Lanciotti, R., Albenzio, M., Sinigaglia, M. 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *International Journal of Food Microbiology* 69: 147-152.
- Corsetti, A., Rossi, J., Gobbetti, M. 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface ripened cheeses. *International Journal of Food Microbiology* 69: 1-10
- Corte, L., Di Cagno, R., Groenewald, M., Roscini, L., Colabella, C., Gobbetti, M., Cardinali, G. 2015. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. *Food Microbiology* 48: 206-15.
- Cosentino, S., Fadda, M.E., Deplano, M., Mulargia, A.F., Palmas, F. 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *International Journal of Food Microbiology* 69: 53-58.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Applied Bacteriology* 23: 130.

- Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26:2460-2461.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. 2001. The potential of a polyphasic PCR–DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 610-617.
- Fadda, M.E., Cosentino, S., Deplano, M., Palmas, F. 2001. Yeast populations in Sardinian Feta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 69: 153-156.
- Fadda ME, Viale S, Deplano M, Pisano, M.B., Cosentino, S. 2010. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology* 136: 376-80.
- Fleet, G.H. 1990. Yeasts in dairy products. *Journal of Applied Bacteriology* 68:199-211.
- Fox, P.F. 1999. Cheese Chemistry, Physics and Microbiology, vol. 2. Aspen: Gaithersburg, MD.
- Fox, P., McSweeney, P., Cogan, T., Guinee, T. 2004. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology 3rd Edition
- Galán, E., Cabezas, L., Fernández-salguero, J. 2012. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *International Dairy Journal* 25, 92-96.
- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Boutoia, K., Rodríguez, J., Roa, I., López, M.B. 2012. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Science & Technology* 92:691-707.
- Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiology* 23: 641-648.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementi, F. 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology* 49: 123-133.
- Garofalo, C., Zannini, E., Aquilanti, L., Silvestrini, G., Fierro, O., Picariello, G., Clementi, F. 2012. Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 7719-7728
- Garofalo, C., Silvestri, G., Aquilanti, L., Clementi, F. 2008. PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeast dynamics during the production processes of three varieties of panettone. *Journal of Applied* 105:243-254.
- Giannino, M.L., Buffoni, J.N., Massone, E., Feligini, M. 2011. Internal transcribed spacer as a target to assess yeast biodiversity in Italian Taleggio PDO cheese. *Journal of Food Science* 76: 511-514.
- Gómez, R., Sánchez, E., Vioque, M., Ferreiras, J., Fernandez-Salguero, J. 2001. Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara L.* *Milchwissenschaft* 56: 16-19.
- Heimgartner, U., Pietrzak, M., Geertsen, R., Brodelius, P., Figueiredo, A.C., Pais, M.S. 1990. Purification and partial characterization of milk clotting proteinases from flowers of *Cynara cardunculus L.* *Phytochemistry* 29: 1405-1410
- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *International Dairy Journal* 14:467-494.
- Hynes, W.L., Ferretti, J.J., Gilmore, M.S., Segarra, R.A. 1992. PCR amplification of streptococcal DNA using crude cell lysates. *FEMS Microbiology Letters* 73:139-142.

- İspirli, H., Demirbaş, F., Dertli, E. 2017. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT- Food Science and Technology* 75:358-365.
- Jacques, N., Casaregola, S. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 126: 321-326.
- Jakobsen, M., Narvhus, J. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *International Dairy Journal* 6:755-768.
- Joung, J.Y., Lee, J.Y., Ha, Y.S., Shin, Y.K., Kim, Y., Kim, S.H., Oh, N.S. 2016. Enhanced Microbial, Functional and Sensory Properties of Herbal Yogurt Fermented with Korean Traditional Plant Extracts. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources* 36:90-99.
- Lavoie, K., Touchette, M., St-Gelais, D., Labrie, S. 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Science & Technology* 92: 455-68.
- Llorente, B.E., David, W., Avilés, F.X., Caffini, N.O., Vairo-Cavalli, S. 2014. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: Characterization of aspartic proteases. *Food Chemistry* 159: 55-63.
- Macedo, A.C., Malcata, F.X., Hogg, T.A. 1995 Microbiological profile of Serra ewes' cheese during ripening. *Journal of Applied Microbiology* 79: 1-11.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G., Malcata, F.X. 2004. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiology* 21:233-240.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker Jr., C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedje, J.M. 2001. The RDP-II (ribosomal database project). *Nucleic Acids Research* 29:173-174.
- Makimura, K., Tamura, Y., Mochizuki, T., Hasegawa, A., Tajiri, Y., Hanazawa, R., Uchida, K., Saito, H., Yamaguchi, H. 1999. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 920-924.
- McSweeney, P. L. H. 2004. Biochemistry of cheese ripening. *International Journal of Dairy Technology* 57: 127-144.
- Monfredini, L., Settanni, L., Poznanski, E., Cavazza, A., Franciosi, E., 2012. The spatial distribution of bacteria in Grana-cheese during ripening. *Systematic and Applied Microbiology* 35:54-63.
- Mundt, J.O., Hammer, J.L. 1968. Lactobacilli on plants. *Applied Microbiology* 16:1326-1330.
- Ordiales, E., Martín, A., Benito, M.J., Fernández, M., Casquete, R., Cordoba, M. 2014. Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of "Torta del Casar" cheese. *International Journal of Dairy Technology* 67: 402-9.
- Ordiales, E., Benito, M.J., Martín, A., Casquete, R., Serradilla, M.J., de Guíá Córdoba, G. 2013. Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese "Torta del Casar" made without the addition of a starter. *Food Control* 33:448-454.
- Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanović, V., Clementi, F. 2015. Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *International Journal of Food Microbiology* 194:62-70.
- Osimani, A., Zannini, E., Aquilanti, L., Mannazzu, I., Comitini, F., Clementi, F. 2009. Lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of the Marche Region. *Italian Journal of Food Science* 21:269-286.
- Padilla, B., Manzanares, P., Belloch, C. 2014. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiology* 38: 160-166.

- Panelli, S., Brambati, E., Bonacin, C., Feligini, M. 2013. Diversity of fungal flora in raw milk from the Italian Alps in relation to pasture altitude. *Springerplus* 2: 405.
- Pangallo, D., Šaková N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L., Kuchta, T. 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology* 170:38-43.
- Pelliccia, C., Antonielli, L., Corte, L., Bagnetti, A., Fatichenti, F., Cardinali, G. 2011. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. *Annals of Microbiology* 61: 965-972
- Pereira-Dias, S., Potes, M.E., Marinho, A., Malfeito-Ferreira, M., Loureiro, V. 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal of Food Microbiology* 60: 55-63.
- Pimentel, C., Van Der Straeten, D., Pires, E., Faro, C., Rodrigues-Pousada, C. 2007. Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. *FEBS Journal* 274:2523-2539
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter P.D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews* 37:664-698.
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M., Wilbey, R.A. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants-the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *International Journal of Dairy Technology* 56: 76-85.
- Ruggirello, M., Cocolin, L., Dolci, P. 2016. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiology* 59:112-118.
- Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P.S., Fontana, C., Saavedra, L., Vignolo, G., Hebert, E.M. 2016. Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *Journal of Applied Microbiology* 1289-1301.
- Sádecká, J., Šaková, N., Pangallo, D., Koreňová, J., Kolek, E., Puškárová A., Bučková, M., Valík, L., Kuchta, T. 2016. Microbial diversity and volatile odour-active compounds of barreled ewes' cheese as an intermediate product that determines the quality of winter bryndza cheese. *LWT- Food Science and Technology* 70:237-244.
- Šaková, N., Sádecká, J., Lejková, J., Puškárová A., Koreňová, J., Kolek, E., Valík, L., Kuchta, T., Pangallo D. 2015. Characterization of May bryndza cheese from various regions in Slovakia based on microbiological, molecular and principal volatile odorants examination. *Journal of Food and Nutrition Research* 54:239-251.
- Sambrook, J. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanjuán, E., Millán, R., Saavedra, P., Carmona, M.A., Gómez, R., Fernández-Salguero, J. 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the physico- chemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chemistry* 78: 281-289.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base pairs G + C-rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 297-303.
- Slanetz, L.W., Bartley, C.H. 1957. Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* 74:591-596.
- Sousa, M.J., Malcata, F.X. 1997. Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45:74-81.

- Tejada, L., Gómez, R., Fernández-Salguero, J. 2007. Sensory characteristics of ewe milk cheese made with three types of coagulant: calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *Journal of Food Quality* 30: 91-103.
- Tejada, L., Fernández-Salguero, J. 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Italian Journal of Food Science* 15:25-131.
- Viljoen, B.C. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology* 69: 37-44.
- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., Fernández-Salguero, J. 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:451-456.
- Widnyana, I.K., Javandira, C. 2016. Activities *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* sp. to Stimulate Germination and Seedling Growth of Tomato Plants. *Agriculture and agricultural science procedia* 9:419-423.
- Wyder, M.T., Bachmann, H.P., Puhani, Z. 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in foil-wrapped Raclette cheese. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 32: 333-343.

### **Capitolo III – Tradizione: *salame tipo Fabriano***

## 1. Introduzione

### 1.1. Il Salame e le sue origini

La produzione di salami e più in generale di salumi ha radici antiche e in parte incerte. Non è possibile definire una data e un luogo univoco di nascita di questi prodotti derivati dalla macellazione del maiale, tuttavia con molta probabilità l'origine dei salumi risale al periodo tra il 1400 e il 500 a.C.

Testimonianze grafiche mostrano la produzione e il consumo di prodotti ascrivibili al salame o alla salsiccia già nell'antico Egitto nella tomba di Ramsete III (1166 a.C.); così come nell'Odissea si parla di un cibo costituito da un budello ripieno di grasso e sangue e nelle commedie di Aristofane (400 a.C.) si parla spesso di "lucanica".

Prima testimonianza scritta di un metodo di conservazione delle cosce suine, sottoposte a salatura e asciugatura, è presente nel trattato di agricoltura "De Agri cultura" dell'autore latino Marco Porcio Catone detto il Censore (160 a.C.) (Aquilanti *et al.*, 2016). La produzione e il consumo dei salumi divenne sempre più diffusa in epoca romana e successivamente longobarda, ma solo nel 1200-1300 d.C. l'arte salumiera inizia a specializzarsi, affinando sempre più le tecniche di lavorazione e le prassi di corretta conservazione. Solo nel 1581, però, la parola salame compare ufficialmente in un manuale di cucina, indicando un insaccato di carne suina fermentato.

I salami sono prodotti fermentati ottenuti principalmente da carne di maiale tritata aggiunta di sale, spezie, in alcuni casi erbe, zucchero, vino o altri ingredienti e starter commerciali; altre carni possono essere utilizzate per la produzione dei salami tra cui ad esempio manzo o vitello (Talon *et al.*, 2004). La carne tritata o tagliata in piccoli pezzi viene inserita in budelli artificiali o naturali e sottoposta al successivo periodo di stagionatura. Durante tale periodo tre sono le fasi che si susseguono: la stufatura, l'asciugatura e la stagionatura in senso stretto. La stufatura è la fase iniziale di maturazione del salame, dura generalmente 14 giorni e prevede l'inizio della fermentazione lattica, generalmente viene condotta a temperature comprese tra 18 e 26 °C con un'umidità relativa (UR) del 84-90%. In questa prima fase il pH del salame, generalmente, si abbassa e l'attività dell'acqua ( $a_w$ ) risulta compresa tra 0,95 e 0,93. L'asciugatura, condotta ad una temperatura tra 16 e 22 °C con UR del 80-90%, ha una durata media di circa 10 giorni. In questa fase si conclude la fermentazione e il pH raggiunge valori compresi tra 5,3 e 4,9. L'ultima fase, la più lunga, è la stagionatura vera e propria, questa può durare da

4 a 8 settimane in relazione al tipo di salame prodotto e viene condotta ad una temperatura di 10-15 °C con un UR del 65-80% (Galli Volonterio, 2005).

I salami possono essere classificati usando vari criteri, come ad esempio l'attività finale dell'acqua e/o il pH, le condizioni di processo applicate come la durata della maturazione o l'affumicatura (Lucke, 2000). Sulla base di questi criteri sono state identificate due principali categorie di carni fermentate, i prodotti tipici del nord Europa e prodotti del sud Europa (Talon *et al.*, 2007). Tra i prodotti tipici del nord Europa ad esempio i salami ungheresi e tedeschi si caratterizzano per una fermentazione molto veloce e un valore di pH inferiore a 5, generalmente questi salami subiscono un processo di affumicatura; al contrario, tra i prodotti del sud Europa i salami prodotti nell'area Mediterranea (Italia, Spagna, Grecia) sono caratterizzati da una fermentazione lunga senza processi di affumicatura, questi salami possono essere secchi (maturazione superiore a 4 settimane) o semi-secchi (maturazione inferiore a 4 settimane) e si caratterizzano per un microbiota superficiale che include muffe, lieviti e cocchi Gram-positivi (Lucke, 2000).

### *1.2. Microflora del salame*

Durante la produzione dei salami, la fermentazione rappresenta la fase chiave del processo e la sua velocità può variare notevolmente soprattutto in funzione della temperatura. Il pH finale del prodotto è generalmente prossimo a 5, seppur tale parametro possa variare tra valori compresi tra 5,3 e 6,3 (García-Varona *et al.*, 2000; Rantsiou *et al.*, 2005a; Aymerich *et al.*, 2006; Lebert *et al.*, 2007).

La carne, oltre all'elevato contenuto di proteine, è una fonte importante di acidi grassi, elementi essenziali come rame, ferro, iodio, manganese, selenio, zinco, la maggior parte delle vitamine B e una serie di altri micronutrienti (Higgs, 2000; Henderson *et al.*, 2003a; Williamson, *et al.*, 2005; Rooke *et al.*, 2010) che la rendono un ottimo substrato di crescita per molti microrganismi. In particolare, l'ecosistema microbico che si sviluppa nei prodotti carnei è molto vario e fattori quali la qualità delle materie prime e la tecnica di produzione adottata, modificano profondamente la flora microbica e di conseguenza le caratteristiche organolettiche e sensoriali del prodotto finale (Comi *et al.*, 1992).

### 1.2.1. Batteri

Nell'ambito della microflora del salame, due sono i gruppi batterici che predominano durante il processo fermentativo: i batteri lattici e i cocchi coagulasi-negativi (CCN o cocchi catalasi-positivi) che comprendono micrococchi e stafilococchi coagulasi-negativi.

I batteri lattici, organismi ubiquitari negli ambienti di macellazione e lavorazione delle carni, sono responsabili del processo fermentativo inducendo l'acidificazione della matrice, fondamentale sia a livello tecnologico sia a livello di sicurezza del prodotto finale (Hammes *et al.*, 1990). L'abbassamento del pH, correlato alla produzione di acidi organici e batteriocine, svolge un'importante azione inibente nei confronti dei microrganismi patogeni o alterativi che possono contaminare la carne stessa. L'acidificazione della matrice definisce la *texture* del prodotto e influenza notevolmente la determinazione e la stabilizzazione del colore del prodotto (Holck *et al.*, 2017); infine, la produzione di composti volatili contribuisce alla definizione dell'aroma del prodotto stesso. Tra i batteri lattici, le specie più frequentemente isolate nei salami prodotti nei paesi mediterranei sono *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum* (Aquilanti *et al.*, 2016) seguite dalle specie *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus acidilactici* e *Pediococcus pentosaceus* e i generi *Weissella* e *Leuconostoc* (Aquilanti *et al.*, 2016).

I cocchi coagulasi-negativi sono principalmente responsabili dello sviluppo e della stabilizzazione del colore; in particolare grazie all'elevata attività degli enzimi nitrato riduttasi, che converte il nitrato in nitrito, e catalasi, che limita l'ossidazione dei lipidi, si assiste ad una stabilizzazione del colore rosso vivo dei salami (Hammes, 2012) e alla limitazione dell'insorgenza di fenomeni di irrancidimento del prodotto (Hugas & Monfort, 1997; Leroy *et al.*, 2006). I cocchi coagulasi-negativi inoltre, grazie alla loro azione proteolitica e lipolitica, sono in grado di degradare lipidi e proteine, e di convertire successivamente gli aminoacidi e gli acidi grassi liberi in potenti composti aromatici essenziali per la determinazione del gusto del salame stesso (Talon *et al.*, 2004; Iacumin *et al.*, 2006; Rantsiou & Cocolin, 2006; Talon & Leroy, 2006; Urso *et al.*, 2006). Tra i cocchi coagulasi-negativi le specie *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus simulans* risultano le colture microbiche più diffuse e frequentemente isolate soprattutto nei salami italiani, greci e francesi (Aquilanti *et al.*, 2016). Altre specie possono essere identificate sulle matrici dei salami quali ad esempio *Staphylococcus saprophyticus*,

*Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus equorum*, *Staphylococcus carnosus* e *Micrococcus caseolyticus* (Aquilanti *et al.*, 2016).

### 1.2.2. Muffe e lieviti

La crescita superficiale di muffa grigio-biancastra è una caratteristica tipica e desiderata in molti salami prodotti nei paesi europei, in particolare nell'area del Mediterraneo, ma anche in paesi come Ungheria e Belgio (Holck *et al.*, 2017). Nel processo produttivo tradizionale, l'inoculo delle spore sul salame maturo avviene in modo casuale, in relazione alla flora presente nell'aria della cella di maturazione, ogni salumificio pertanto avrà una flora microbica residente specifica che influenza la qualità del prodotto finito (Holck *et al.*, 2017). Lo sviluppo della muffa sulla superficie del budello si verifica generalmente a livello delle zone magre del salame e più raramente in corrispondenza del lardello, seppur la crescita del micelio determina successivamente la copertura totale della superficie stessa. La muffa, grazie alla sua azione lipolitica, proteolitica e ossidativa nei confronti dell'acido lattico, contribuisce notevolmente al gusto e all'aroma del salame aumentando i parametri di qualità generale del prodotto (Berni, 2014). Inoltre, la presenza della muffa protegge il salame dal fenomeno dell'irrancidimento consumando l'ossigeno e rallentando così l'ossidazione dei lipidi, e contestualmente protegge il prodotto da un'eccessiva disidratazione (Berni, 2014). La riduzione di umidità relativa del salame durante il periodo di maturazione, favorisce lo sviluppo del genere *Penicillium* e occasionalmente del genere *Aspergillus*. Le specie più frequentemente isolate risultano essere *Penicillium nalgiovense*, *Penicillium chrysogenum* e *Penicillium nordicum* (Holck *et al.*, 2017). Altri generi fungini riscontrabili con minor frequenza sono inoltre *Citromyces* e *Cladosporium*.

I lieviti, in particolar modo la specie *Debaryomyces hansenii*, grazie alla produzione di proteasi e lipasi specifiche influenzano la formazione di composti aromatici e dunque, assieme alle muffe contribuiscono alle caratteristiche aromatiche ed organolettiche del salame maturo (Gardini *et al.*, 2001; Santos *et al.*, 2001; Durá *et al.*, 2004; Flores *et al.*, 2004; Cocolin *et al.*, 2006). Oltre alla specie *D. hansenii* generi microbici identificati durante la produzione e maturazione dei salami sono *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporum* and *Cryptococcus* (Comi & Cantoni, 1980; Grazia *et al.*, 1989; Encinas *et al.*, 2000).

### 1.2.3. *Microrganismi patogeni*

I salami, seppur considerati prodotti sicuri, possono essere per loro natura un ottimo substrato per la crescita di microrganismi patogeni derivanti da contaminazioni crociate tra materie prime, operatore e attrezzature. Le specie patogene identificabili possono essere molteplici seppur la loro presenza risulti piuttosto limitata grazie all'applicazione di corrette prassi igieniche e delle norme igienico-sanitarie previste per legge.

Tra le specie identificabili possono essere annoverate: i) *Escherichia coli* specie in grado di contaminare la carne cruda ma raramente capace di sopravvivere in condizioni di bassi livelli di pH e  $a_w$  e dunque nei prodotti finiti; ii) *Salmonella typhimurium* specie responsabile di svariate epidemie alimentari legate al consumo di salumi prodotti con carni contaminate; iii) *Staphylococcus aureus* specie capace di crescere in ambiente con elevata concentrazione di sale e pH acidi, identificata come principale responsabile di intossicazioni alimentari, in relazione alla capacità di produrre tossine. La presenza di questa specie nei salami è frequente, ma spesso non in grado di produrre quantità sufficientemente elevate di tossine in grado di indurre malattia; iv) *Listeria monocytogenes* raramente presente come agente contaminante dei salami, può essere riscontrata a causa di contaminazioni crociate soprattutto nell'ambiente e con le attrezzature di produzione; v) *Clostridium botulinum* potenzialmente in grado di contaminare la carne cruda, viene inibito totalmente grazie all'aggiunta di nitrati e quindi la sua presenza è quasi totalmente assente nei salami a fine maturazione; vi) *Toxoplasma gondii*, parassita intracellulare legato al consumo di carne cruda, la cui caratteristica è l'elevata resistenza nei confronti di nitrati e nitriti, specie, pH basso e basse temperature di conservazione, i rischi correlati alla presenza di questo patogeno diminuiscono notevolmente in funzione di lunghi periodi di stagionatura (Holck *et al.*, 2017).

## 1.3. *Starter commerciali e conservanti*

### 1.3.1. *Starter commerciale*

Tradizionalmente la produzione dei salami si basa sullo sviluppo di una fermentazione spontanea ad opera dei microrganismi endogeni presenti sulla matrice alimentare utilizzata.

Al fine di produrre salumi standardizzati e con caratteristiche organolettiche costanti, negli anni '40 negli Stati Uniti è stato introdotto per la prima volta l'uso di starter commerciali. Tuttavia, queste prime tipologie di starter

non erano rappresentate da microrganismi isolati dalla carne e normalmente coinvolti nel processo fermentativo, ma bensì erano costituite da specie identificate esclusivamente sulla base di caratteristiche tecnologiche quali ad esempio la sopravvivenza all'essiccazione o al congelamento e la velocità di produzione di acido. Questi primi starter, costituiti principalmente dal genere *Pediococcus* erano molto utili per la produzione di “salami estivi” tipici degli Stati Uniti, mentre non erano adatti alla produzione di salami con tempi di maturazione più lunghi come quelli europei (Hammes *et al.*, 1990). Per questa ragione, negli anni '70 - '80 furono introdotti degli starter di seconda generazione costituiti prevalentemente da colture di batteri lattici quali *Lact. sakei*, *Lact. curvatus* e in misura inferiore *Lact. plantarum* in mix con cocchi coagulasi-negativi quali *Staphylococcus carnosus*, *S. xylosus* e *S. saprophyticus* (Leroy *et al.*, 2006; Blaiotta *et al.*, 2004). Oltre alle colture starter batteriche sono state messe appunto anche colture eumicetiche rappresentate da *D. hansenii* in combinazione con spore fungine delle specie *P. chrysogenum* e *P. nalgiovensis*, utilizzabili per il trattamento in superficie dei salami (Selgas & Garcia, 2015).

Tutte le colture starter per convenzione sono definite “funzionali” in relazione alla specifica attività fermentativa che permette la conversione della materia prima in prodotto finale, tuttavia tale definizione è stata progressiva estesa anche ad altre caratteristiche quali ad esempio il miglioramento della sicurezza alimentare, vantaggi di natura tecnologica e proprietà benefiche per la salute umana.

In particolare, negli ultimi anni l'attenzione è stata focalizzata sulla ricerca di colture starter per la produzione di salami con caratteristiche probiotiche, questa ricerca è tutt'ora in corso in relazione alle innumerevoli difficoltà riscontrate. Infatti, numerose sono le caratteristiche che devono essere soddisfatte da una coltura microbica per l'applicazione come starter commerciale nella produzione dei salami quali ad esempio la capacità di sopravvivere in ambiente con bassa  $a_w$ , presenza di sale e nitrato, elevata capacità di sopravvivenza e riproduzione, elevata capacità di competizione nei confronti delle specie microbiche normalmente presenti nella carne utilizzata ed infine capacità di definire gusto e qualità del prodotto accettabili per i consumatori (de Vuyst *et al.*, 2008; Rouhi *et al.*, 2013).

### 1.3.2. Sale

Il sale (NaCl) è un importante ingrediente nella produzione dei salami in quanto contribuisce alla definizione del gusto, della *texture* e della sicurezza microbiologica, contribuendo così in larga parte all'accettabilità del prodotto finale (Holck *et al.*, 2017). Il sale facilita la solubilizzazione delle proteine miofibrillari e aumenta le proprietà leganti delle proteine definendo in tal modo la *texture* e inducendo l'aumento di viscosità della carne (Terrell, 1983).

L'aggiunta di NaCl è importante per la sicurezza microbiologica del prodotto in quanto abbassando l'attività dell'acqua fino a valori pari a 0,96-0,97 impedisce lo sviluppo di microrganismi patogeni o alterativi.

L'uso eccessivo di NaCl nelle preparazioni alimentari è una concausa, però, dell'insorgenza di molte patologie croniche legate all'aumento della pressione sanguigna; in particolare lo ione Na<sup>+</sup> risulta essere la causa di questo impatto negativo sulla salute umana e per questo la ricerca si è focalizzata sulla possibilità di sostituire il NaCl con KCl o CaCl<sub>2</sub>. Attualmente questi tentativi si sono rivelati in parte fallimentari in quanto, seppur il processo fermentativo e il livello di sicurezza alimentare si mantenga costanti, nei salami prodotti con sostituzione parziale di NaCl, l'accettabilità del prodotto risulta notevolmente ridotta (Dos Santos *et al.*, 2015; De Almeida *et al.*, 2016).

### 1.3.3. Nitrati e nitriti

Tradizionalmente la produzione di salami prevede l'aggiunta di conservanti quali nitrati (nitrato di sodio, E251 e nitrato di potassio, E252) e nitrito (nitrito di sodio, E250 e nitrito di potassio, E249) aggiunti secondo la vigente normativa europea (Reg. CE No 1129/2011). Attualmente, nei paesi dell'Unione Europea la dose massima di impiego consentita per la produzione dei prodotti carnei è rispettivamente di 150 mg kg<sup>-1</sup> di nitrato e di nitrito (Reg. CE No 1129/2011). L'aggiunta di nitrati e nitriti ha molteplici funzioni quali ad esempio controllare e inibire la crescita di batteri alterativi o patogeni come *C. botulinum* e *Staphylococcus aureus* (Sebra- nek & Bacus, 2007; Paik & Lee, 2014), coadiuvare la stabilizzazione del colore, controllare i processi di ossidazione e contribuire alla definizione del sapore (Hospital *et al.*, 2015). Il nitrato aggiunto alla carne tritata

può essere ridotto a nitrito dai cocchi coagulasi-negativi e progressivamente ridotto a ossido nitrico, quest'ultimo legandosi alla mioglobina stabilizza la molecola e determina così il colore rosso della carne (Holck *et al.*, 2017).

Sebbene l'uso dei nitrati e dei nitriti, come additivi alimentari nei salami sia consentito per legge, agli inizi degli anni '70 molti studi sono stati pubblicati circa il legame tra nitriti e N-nitrosamine cancerogene e circa la possibilità di identificare sostanze alternative all'uso di questi conservanti (Pegg & Shahidi, 2000). Diverse alternative sono state proposte, come ad esempio l'uso di estratto vegetale di sedano, l'uso di antimicrobici naturali come il lattato, le batteriocine o l'aggiunta di colture di batteri lattici ad azione bioprotettiva, oltre ad un controllo molto rigoroso del processo produttivo; tuttavia nessuna di queste alternative è stata dichiarata in grado di sostituire i nitrati/nitriti nelle loro molteplici funzioni.

Nel 2011, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato che l'assunzione giornaliera con la dieta è generalmente compresa tra 40 e 172 mg per i nitrati e 0,3 e 2,6 mg per i nitriti. In particolare, mentre per i nitrati l'assunzione è per lo più legata al consumo di frutta e verdura e solo in minima parte al consumo di carne, per i nitriti l'assunzione giornaliera è legata per l'80% alla conversione naturale del nitrato in nitrito ad opera della saliva umana, mentre solo il 20% è legato al consumo diretto di alimenti contenenti nitriti (WHO, 2011). Recenti studi epidemiologici hanno evidenziato una possibile correlazione tra assunzione di nitriti con la dieta giornaliera e l'insorgenza di tumori gastrici e una correlazione tra l'assunzione di nitrati e nitriti della carne processata e lo sviluppo di tumori al colon (EFSA ANS Panel, 2017). Queste evidenze devono comunque essere considerate in relazione alle reali quantità di nitrato e nitrito assunto giornalmente mediante il consumo di carne e in particolare di salumi.

## 2. Scopo del lavoro

La produzione di salami, basata su tradizioni e usanze popolari, è diffusa in molti paesi europei, ma l'Italia rappresenta sicuramente uno dei paesi con maggiore produzione e diversificazione di prodotti carnei fermentati. Antiche ricette regionali o locali sono diffuse in tutta la nazione e innumerevoli sono i prodotti che hanno ottenuto il riconoscimento di denominazione di origine protetta (DOP) o di indicazione geografica protetta (IGP). Tra i salami italiani a marchio DOP è possibile annoverare: Salame di Varzi, Salame Brianza, Salame Piacentino, Salamini Italiani alla Cacciatora; mentre tra i salami a marchio IGP possono essere citati: Salame Cremona, Salame Sant'Angelo, Salame Felino e il Salame Piemonte. Tanti altri salami fermentati vengono prodotti nelle regioni italiane, tra questi nell'elenco dei prodotti agro-alimentari tradizionali delle Marche (Diciassettesima revisione, 2017) spuntano il “salame di Fratulla”, “Salame lardellato”, “Salame di soprassato o soppressato” e il “Salame di Fabriano”.

In particolare, il salame di Fabriano (o semplicemente salame Fabriano) è un prodotto tipico della tradizione marchigiana, prodotto esclusivamente nella zona geograficamente definita dai comuni di Fabriano, Arcevia, Cerreto D'esi, Genga, Serra San Quirico, Sassoferrato, Matelica, Esanatoglia, Serra S'Abbondio, Frontone, Pergola, Pioraco e Fiuminata, secondo i requisiti stabiliti dal disciplinare di produzione, redatto dal Consorzio per la Tutela di questo salume (<http://www.salamedifabriano.it/docs/consorzio/ilconsorzio.asp>) e approvato dal Consiglio Comunale di Fabriano. Le origini del salame Fabriano si perdono nella notte dei tempi; numerose sono, infatti, le testimonianze sulla sua produzione, ma due sono le date importanti nella storia di questo salume lardellato. La prima risale al 1877, anno in cui Oreste Marcoaldi, autore del libro “Le Usanze e i pregiudizi del Popolo Fabrianese”, in un dizionarietto definisce il salame come una “specialità di Fabriano, così come di Bologna è la mortadella e di Modena è lo zampone”. Seconda data importante nella storia di questo salume è il 22 aprile 1881, data in cui Giuseppe Garibaldi scrisse una lettera per ringraziare l'amico Benigno Bigonzetti dei preziosi salami fabrianesi ricevuti in dono. Il salume prodotto secondo la tradizionale ricetta prevede la macellazione delle parti più pregiate e di prima qualità del suino, quali spalla (solo il fiocco), coscia (il prosciutto) e fondello, di razze esclusivamente autoctone dell'entroterra marchigiano. Il grasso aggiunto in ragione dell'8-12 % viene prelevato esclusivamente dalla fascia adiposa dorsale, la più pregiata, e tagliato a cubetti di circa 0,5-1 cm di diametro. All'impasto vengono infine aggiunti sale, pepe nero (macinato ed in grani) e vino

bianco e dunque insaccato nel budello gentile. I salumi insaccati vengono dunque chiusi all'estremità con uno spago ed appesi a coppie per la prima fase di asciugatura; la maturazione dura generalmente dai 40 ai 60 giorni ed è tradizionalmente condotta in cantine e solai areati. La produzione del salame Fabriano è quasi esclusivamente invernale, generalmente effettuata nel periodo ricompreso tra fine settembre/inizio ottobre e marzo/giugno.

Obiettivo della presente Ricerca è stato quello di caratterizzare dal punto di vista chimico-fisico e microbiologico una produzione sperimentale di salame tipo Fabriano ottenuta presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione di Perugia, seguendo il disciplinare per la scelta delle carni, del tipo di lardo e di budello. In particolar, per la caratterizzazione chimico-fisica sono stati valutati pH e umidità relativa dei salami in esame, mentre per la caratterizzazione microbiologica è stata condotta l'enumerazione di Enterobacteriaceae, stafilococchi coagulasi-positivi e -negativi, batteri lattici, *L. monocytogenes*, *C. botulinum* e *Salmonella* spp., e la determinazione del profilo del microbiota batterico via *Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* RT-PCR-DGGE e *Illumina sequencing*.

I salami sperimentali prodotti con concentrazioni variabili di nitrati e nitriti, in assenza o aggiunta di starter commerciale di batteri lattici sono stati analizzati con approccio polifasico al fine di valutare l'influenza dei conservanti sulla diversità e le dinamiche microbiche delle popolazioni residenti e/o aggiunte. Nello specifico, per ciascuna tipologia di fermentazione considerata (naturale o guidata) sono stati analizzati salami prodotti con 0 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/0 mg kg<sup>-1</sup> nitrito, 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito e 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Processo produttivo del salame tipo Fabriano

Per l'allestimento della prova sperimentale, sei diversi *batches* produttivi di salami di tipo Fabriano sono stati allestiti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione di Perugia.

Tutti i salami sono stati prodotti seguendo la ricetta tradizionale, usando l'80% di spalla di maiale, il 10% di prosciutto di maiale e il 10% di lardello di schiena in cubetti ( $\sim 1 \text{ cm}^3$ ). L'impasto, macinato attraverso l'uso di apposite trafilare, è stato ridotto ad una grana di  $\sim 2 \text{ mm}$  ed aggiunto di  $28 \text{ g kg}^{-1}$  di NaCl,  $3 \text{ g kg}^{-1}$  di pepe nere (macinato ed in grani) ed aglio triturato in piccole quantità.

L'impasto così ottenuto a seguito dell'aggiunta dei cubetti di lardo, è stato in primo luogo suddiviso in due diversi lotti, il primo lotto (SS) è stato preparato senza l'aggiunta di starter commerciale, mentre il secondo lotto (CS) è stato aggiunto di una specifica coltura starter commerciale (Startec TCSD1/300, Tec-Al srl, Traversetolo, Italia) in ragione di  $75 \text{ g } 100 \text{ kg}^{-1}$ .

Per ciascun lotto, l'impasto è stato suddiviso ulteriormente in 3 *batches* nei quali sono state aggiunte specifiche concentrazioni di nitrati e nitriti, pari rispettivamente a  $0 \text{ mg kg}^{-1}$  nitrato/ $0 \text{ mg kg}^{-1}$  nitrito (0/0),  $75 \text{ mg kg}^{-1}$  nitrato/ $60 \text{ mg kg}^{-1}$  nitrito (75/60) e  $150 \text{ mg kg}^{-1}$  nitrato/ $125 \text{ mg kg}^{-1}$  nitrito (150/125).

L'aggiunta di nitrati e nitriti è stata condotta nei rapporti di seguito riportati al fine di ottenere le concentrazioni desiderate:

- ✓  $7,5 \text{ g } 100 \text{ kg}^{-1}$  Saltec Whitec-16\_Niko Sa (Tec-Al srl, Traversetolo, Italy) /  $12,5 \text{ g } 100 \text{ kg}^{-1}$  Nitritec 50/50 Sa (Tec-Al srl, Traversetolo, Italy) per la concentrazione 75/60;
- ✓  $15 \text{ g } 100 \text{ kg}^{-1}$  Saltec Whitec-16\_Niko Sa (Tec-Al srl) /  $25 \text{ g } 100 \text{ kg}^{-1}$  Nitritec 50/5 (Tec-Al srl) per la concentrazione 150/125.

Per ciascun *batch*, sono stati prodotti 12 salami sottoposti da prima a fermentazione per 8 ore a  $25^\circ\text{C}$  e successivamente sottoposti ad asciugatura rispettando le condizioni di seguito riportate:

- ✓ 24h a  $21^\circ\text{C}$  con 55% UR;
- ✓ 24h a  $19^\circ\text{C}$  con 60% UR;
- ✓ 24h a  $18^\circ\text{C}$  con 65% UR;

- ✓ 24h a 16 °C con 70% UR;
- ✓ 24h a 15 °C con 74% UR;
- ✓ 24h a 14 °C con 74% UR.

I salami sono infine, stati sottoposti a stagionatura a 13 °C per 37 giorni al 74% UR.

Per i 6 *batches* analizzati, il campionamento è stato eseguito a 0, 7, 21 e 42 giorni di stagionatura (T<sub>0</sub>, T<sub>7</sub>, T<sub>21</sub>, T<sub>42</sub>) ed i campioni raccolti in triplicato.

### 3.2. Determinazione di umidità e pH

Tutti i campioni di salami in studio sono stati sottoposti a valutazione del pH mediante pH-metro con elettrodo solido HI2031 (modello 300, Hanna Instruments, Padova, Italia) e a determinazione dell'umidità mediante tecnica gravimetrica in accordo a quanto previsto dal metodo AOAC *Official Method* 950.46.

Tutte le misurazioni sono state condotte in triplicato e i valori espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

### 3.3. Conte microbiche

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra, 10 g di salame sono stati asetticamente diluiti in 90 mL di acqua peptonata sterile (0,1 % peptone, p v<sup>-1</sup>) ed omogenati con un omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 Circulator (VWR) per 2 min a 260 rpm.

L'enumerazione di *C. botulinum* e dei cocchi coagulasi-negativi (CCN) è stata eseguita rispettivamente su terreno *Egg Yolk Agar* (EYA) (Biokar Diagnostics) incubato per 48 ore a 37 °C in anaerobiosi e *Mannitol Salt Agar* (MSA) incubato per 24-48 h a 37 °C. L'enumerazione di Enterobacteriaceae, batteri lattici, cocchi coagulasi-positivi (CC+) è stata condotta rispettivamente sulla base delle norme ISO 21528-1: 2004, ISO 15214:1998, UNI EN ISO 6888-2:2004 (Haouet et al. 2017). Mentre la presenza di *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. è stata valutata rispettivamente con il protocollo AFNOR BIO 12/11-03/04 e AFNOR BIO 12/16-09/05.

Tutte le analisi sono state eseguite in duplicato e i risultati sono stati espressi come media log UFC  $\pm$  deviazione standard.

### 3.4. Estrazione del RNA microbico totale

Per l'estrazione dell'RNA microbico, 10 g di tutti i salami in studio sono stati asetticamente diluiti in 90 mL di acqua peptonata sterile (0,1 % peptone, p v<sup>-1</sup>) ed omogenati con un omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 Circulator (VWR) per 2 min a 260 rpm. 2 mL di ogni omogenato sono stati centrifugati per 5 min a 260 rpm ed i *pellets* ottenuti sono stati coperti con la soluzione RNeasy® (Ambion, Foster City, California, USA) e conservati a -80 °C fino all'estrazione, al fine di preservare l'integrità degli acidi nucleici.

L'RNA totale è stato estratto dai *pellets* utilizzando il kit commerciale E.Z.N.A. Kit RNA batterico (Omega Bio-tek, Norcross, Georgia, USA) secondo le istruzioni del produttore. 8 µL di RNA totale estratto sono stati incubati a 37 °C per 30 minuti con 1 µL di soluzione RNase-free DNase (DNase I Amplification Grade, Sigma Aldrich) per la digestione del DNA residuo. Dopo il trattamento con la DNasi, i campioni sono stati amplificati via PCR e successivamente sottoposti a corsa elettroforetica al fine di evidenziare l'eventuale presenza di DNA residuo sulla base della medesima procedura descritta nel paragrafo 3.7.1 del presente capitolo.

### 3.5. Quantizzazione del RNA estratto

L'RNA totale estratto è stato sottoposto a quantizzazione e valutazione del grado di purezza con spettrofotometro Nanodrop ND 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) ad una lunghezza d'onda di 260 nm. A seguito della quantizzazione, tutti i campioni sono stati normalizzati ad una concentrazione finale di 50 ng µL<sup>-1</sup>.

### 3.6. Sintesi del cDNA

L'RNA totale estratto è stato usato come molecola stampo per la sintesi di molecole di cDNA mediante uso del kit di sintesi *SensiFAST cDNA Synthesis* (Bioline, Londra, Regno Unito) sulla base delle istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

### 3.7. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (RT-PCR-DGGE)

#### 3.7.1. Amplificazione via PCR

La regione variabile V3 del gene 16S rRNA è stata amplificata mediante l'uso dei *primers* 338f e 518r (Alessandria *et al.*, 2010; Ampe *et al.*, 1999) come descritto nel capitolo II, paragrafo 3.10.2 della presente Tesi di Dottorato.

Analogamente, la regione variabile V1 del gene 16S rRNA è stata amplificata mediante l'uso dei *primers* P1 (5'-GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3') e P2 (5'-TTC CCC ACG CGT TAC TCA CC-3') (Klijn *et al.*, 1991). Per l'analisi PCR-DGGE, il *primer forward* P1 è stato aggiunto all'estremità 5' della CG-clamp come descritto da Sheffield e collaboratori (1989). 2  $\mu\text{L}$  di DNA, con una concentrazione di  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ , sono stati amplificati nel termociclatore *Mycycler Thermal cycler* (Biorad, Hercules, Canada) secondo il protocollo mostrato in figura III.1, in un volume finale di 25  $\mu\text{L}$  secondo la miscela di reazione descritta in Tabella III.1.

**Tabella III.1.** Composizione mix di reazione per amplificazione regione V1 del gene 16S rRNA via PCR

|                  | $C_i$                  | $C_f$                         | $V_i$               |
|------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Buffer           | 10 x                   | 1 x                           | 2,50 $\mu\text{L}$  |
| dNTPs            | 10 mM                  | 0,2 mM                        | 0,50 $\mu\text{L}$  |
| Primer Forward   | 10 $\mu\text{M}$       | 0,2 $\mu\text{M}$             | 0,50 $\mu\text{L}$  |
| Primer Reverse   | 10 $\mu\text{M}$       | 0,2 $\mu\text{M}$             | 0,50 $\mu\text{L}$  |
| Taq-polimerase*  | 5 U $\mu\text{L}^{-1}$ | 0,625 U 25 $\mu\text{L}^{-1}$ | 0,125 $\mu\text{L}$ |
| H <sub>2</sub> O | Fino a volume          |                               |                     |

\*Taq DNA Polymerase (SibEnzyme Ltd. Novosibirsk, Russia).

$C_i$ : concentrazione iniziale;  $C_f$ : concentrazione finale;  $V_i$ : volume iniziale.

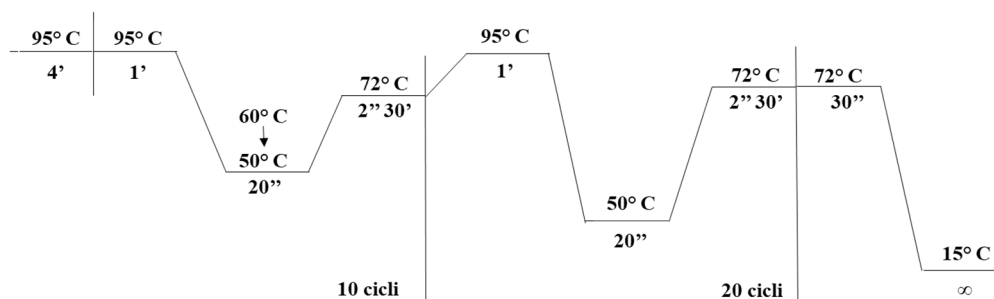


**Figura III.1.** Condizioni di amplificazione della regione V1 del gene 16 rRNA

### 3.7.2. Elettroforesi su gel di agarosio ed analisi DGGE

Gli ampliconi ottenuti a seguito della reazione di amplificazione sono stati sottoposti ad analisi elettroforetica e successiva analisi DGGE rispettando le medesime condizioni descritte nel capitolo II paragrafo 3.10.4 della presente Tesi. Analogamente a quanto descritto in precedenza, il DNA eluito dalle bande DGGE visualizzate ed excise dal gel, è stato amplificato e inviato all'azienda Genewiz (Inghilterra) per le successive operazioni di purificazione e sequenziamento. Le sequenze FASTA sono state successivamente analizzate mediante il database GenBank sfruttando il software BLAST (*Basical Local Aligment Search Tool*) come descritto da Altschul e collaboratori (1990). Una percentuale di identità di sequenza uguale o superiore al 97% è stata definita come soglia di omologia per l'identificazione della popolazione batterica analizzata.

## 3.8. Analisi Illumina MySeq

### 3.8.1. Amplificazione e analisi del cDNA batterico

Il cDNA batterico ottenuto come sopra descritto è stato analizzato mediante la tecnica di *Next Generation Sequencing Illumina MySeq* (Illumina, USA) per lo studio della diversità e delle dinamiche microbiche. Per tale analisi la regione V3-V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata come descritto nel capitolo II, paragrafo 3.11.1 della presente Tesi. Gli ampliconi ottenuti attraverso l'amplificazione selettiva sono stati trattati con il kit *Agencourt AMPure* (Beckman Coulter, Brea) e sottoposti a quantizzazione con il kit *Quant-iT PicoGreen dsDNA* (Invitrogen). I campioni sono stati analizzati tramite *Bioanalyzer 2100* (Agilent) utilizzando il kit *High Sensitivity DNA* (Agilent) e gli ampliconi combinati in rapporti equimolecolari, sottoposti ad analisi con la tecnica Illumina MySeq.

### 3.8.2. Analisi dei dati e identificazione delle sequenze tramite QIIME

Le sequenze ottenute attraverso l'analisi Illumina sono state analizzate con la versione 1.9 del software *Quantitative Insights Into Microbial Ecology* (QIIME) (Caporaso *et al.*, 2010) come descritto nel capitolo II, paragrafo 3.11.2. Tutti i dati generati dal sequenziamento sono stati depositati nel database NCBI *Sequence Read Archive* (SRA).

### 3.9. Analisi statistica

Per ciascun lotto di salami tipo Fabriano prodotto i valori medi di conte vitali in piastra, pH e umidità relativa raccolti durante i tempi di campionamento analizzati ( $T_0$ ,  $T_7$ ,  $T_{21}$ ,  $T_{42}$ ) sono stati analizzati mediante analisi della varianza multivariata (MANOVA). Inoltre, ad ogni tempo di campionamento, i valori medi di conte vitali in piastra, pH e umidità relativa sono stati confrontati direttamente mediante il t test di Student ( $\alpha = 0,05$ ). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il *software* JMP v. 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## 4. Risultati

### 4.1. Determinazione di umidità e pH

I valori di pH ed umidità rilevati nei salami tipo Fabriano prodotti con o senza aggiunta di starter commerciale e con concentrazione variabile di nitrati e nitriti pari a 0/0 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/nitrato, 75/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/nitrito, 150/125mg kg<sup>-1</sup> nitrato/nitrito sono mostrati in Tabella III.2.

Dall'analisi dei dati si evidenzia un significativo effetto dello starter commerciale e dei nitrati/nitriti rispetto ai valori di pH identificati per i salami in studio. I salami prodotti con l'aggiunta di starter commerciale, infatti, hanno mostrato generalmente valori di pH più alti rispetto ai salami prodotti senza l'aggiunta di starter, seppur con delle eccezioni. Infatti, i salami tipo Fabriano SS<sub>0/0</sub> e CS<sub>0/0</sub> non hanno mostrato differenze significative, mentre per i salami SS<sub>75/60</sub> e CS<sub>75/60</sub> a T<sub>0</sub> e T<sub>7</sub> e i salami SS<sub>150/125</sub> e CS<sub>150/125</sub> da T<sub>0</sub> a T<sub>21</sub> sono state evidenziate differenze significative.

Analogamente a quanto espresso per il pH, anche l'umidità risulta strettamente influenzata dalla presenza o meno di starter commerciale e dalla concentrazione di nitrati e nitriti. In particolare, l'effetto della concentrazione dei nitrati/nitriti risulta particolarmente costante nel tempo, senza subire influenze da parte della presenza o meno di starter commerciali. Inoltre, i salami prodotti con la concentrazione 150/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrati/nitriti hanno mostrato dei valori di umidità costantemente più alti rispetto agli altri salami in studio.

L'aggiunta di starter commerciale ha mostrato un effetto esclusivamente al tempo T<sub>0</sub>, inducendo un maggiore tasso di umidità; tale differenza scompare successivamente durante la maturazione dei salami.

**Tabella III.2.** Determinazione valori di pH ed umidità per salami tipo Fabriano

|                 | pH                        |                           |      | Umidità                   |                           |      |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|------|---------------------------|---------------------------|------|
|                 | SS <sub>0/0</sub>         | CS <sub>0/0</sub>         |      | SS <sub>0/0</sub>         | CS <sub>0/0</sub>         |      |
| T <sub>0</sub>  | 5,86 ± 0,02 <sup>b</sup>  | 5,83 ± 0,03 <sup>a</sup>  | n,s, | 49,31 ± 1,27 <sup>a</sup> | 56,80 ± 0,53 <sup>a</sup> | *    |
| T <sub>7</sub>  | 5,61 ± 0,03 <sup>c</sup>  | 5,68 ± 0,08 <sup>b</sup>  | n,s, | 38,43 ± 4,69 <sup>b</sup> | 38,43 ± 4,69 <sup>b</sup> | n,s, |
| T <sub>21</sub> | 5,84 ± 0,03 <sup>b</sup>  | 5,91 ± 0,06 <sup>a</sup>  | n,s, | 29,77 ± 2,36 <sup>c</sup> | 31,98 ± 1,88 <sup>b</sup> | n,s, |
| T <sub>42</sub> | 5,95 ± 0,03 <sup>a</sup>  | 5,92 ± 0,05 <sup>a</sup>  | n,s, | 20,66 ± 1,93 <sup>d</sup> | 19,43 ± 1,22 <sup>c</sup> | n,s, |
|                 | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>       |      | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>       |      |
|                 | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>       |      | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>       |      |
| T <sub>0</sub>  | 5,90 ± 0,01 <sup>a</sup>  | 5,94 ± 0,00 <sup>a</sup>  | *    | 48,74 ± 5,00 <sup>a</sup> | 56,78 ± 1,02 <sup>a</sup> | n,s, |
| T <sub>7</sub>  | 5,74 ± 0,03 <sup>a</sup>  | 5,65 ± 0,03 <sup>b</sup>  | *    | 41,69 ± 2,57 <sup>a</sup> | 40,11 ± 4,95 <sup>b</sup> | n,s, |
| T <sub>21</sub> | 5,87 ± 0,16 <sup>a</sup>  | 6,06 ± 0,08 <sup>a</sup>  | n,s, | 30,80 ± 3,07 <sup>b</sup> | 31,56 ± 0,31 <sup>c</sup> | n,s, |
| T <sub>42</sub> | 5,86 ± 0,09 <sup>a</sup>  | 5,92 ± 0,09 <sup>a</sup>  | n,s, | 20,26 ± 2,60 <sup>c</sup> | 21,12 ± 1,71 <sup>d</sup> | n,s, |
|                 | SS <sub>150/125</sub>     | CS <sub>150/125</sub>     |      | SS <sub>150/125</sub>     | CS <sub>150/125</sub>     |      |
|                 | SS <sub>150/125</sub>     | CS <sub>150/125</sub>     |      | SS <sub>150/125</sub>     | CS <sub>150/125</sub>     |      |
| T <sub>0</sub>  | 5,86 ± 0,02 <sup>a</sup>  | 5,94 ± 0,02 <sup>a</sup>  | *    | 52,65 ± 0,30 <sup>a</sup> | 60,33 ± 0,35 <sup>a</sup> | *    |
| T <sub>7</sub>  | 5,58 ± 0,06 <sup>b</sup>  | 5,77 ± 0,04 <sup>c</sup>  | *    | 43,35 ± 3,02 <sup>b</sup> | 43,98 ± 1,07 <sup>b</sup> | n,s, |
| T <sub>21</sub> | 5,68 ± 0,08 <sup>ab</sup> | 5,91 ± 0,05 <sup>ab</sup> | *    | 32,95 ± 1,51 <sup>c</sup> | 30,47 ± 2,34 <sup>c</sup> | n,s, |
| T <sub>42</sub> | 5,76 ± 0,11 <sup>ab</sup> | 5,79 ± 0,08 <sup>bc</sup> | n,s, | 26,49 ± 2,64 <sup>d</sup> | 23,31 ± 0,82 <sup>d</sup> | n,s, |

SS<sub>0/0</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e privi di nitrati/nitriti; CS<sub>0/0</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciale ma privi di nitrati/nitriti; SS<sub>75/60</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e con l'aggiunta di 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; CS<sub>75/60</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciale e 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; SS<sub>150/125</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e con l'aggiunta di 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; CS<sub>150/125</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciale e 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito.

T<sub>0</sub>, salami campionati al momento della produzione; T<sub>7</sub>, salami campionati dopo 7 giorni di maturazione; T<sub>21</sub>, salami campionati dopo 21 giorni di maturazione; T<sub>42</sub>, salami campionati dopo 42 giorni di maturazione.

\*Differenze statistiche evidenziate tra i *batches* di salami prodotti con la medesima concentrazione di nitrati/nitriti con aggiunta o meno di starter commerciale sulla base del t test di Student. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative nel tempo secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Tutte le misurazioni sono state condotte in triplicato e i valori espressi come media ± deviazione standard.

#### 4.2. Conte vitali

I risultati dell'enumerazione di Enterobacteriaceae, batteri lattici e stafilococchi coagulasi-negativi sono mostrati in Tabella III.3.

Dai dati emerge come la carica batterica delle Enterobacteriaceae sia compresa tra  $6,06 \pm 0,67 \log \text{UFC g}^{-1}$  a T<sub>7</sub> e  $3,84 \pm 0,06 \log \text{UFC g}^{-1}$  a T<sub>42</sub> per i salami SS<sub>0/0</sub> e  $5,46 \pm 0,49 \log \text{UFC g}^{-1}$  e  $3,06 \pm 1,07 \log \text{UFC g}^{-1}$  rispettivamente a T<sub>7</sub> e T<sub>42</sub> per i salami CS<sub>0/0</sub>. Per i salami tipo Fabriano SS<sub>75/60</sub> la carica risulta compresa tra  $5,71 \pm 0,28 \log \text{UFC g}^{-1}$  e  $2,79 \pm 2,25 \log \text{UFC g}^{-1}$  a T<sub>7</sub> e T<sub>42</sub>, mentre per i salami CS<sub>75/60</sub> risulta compresa tra  $5,30 \pm 0,37 \log \text{UFC g}^{-1}$  e  $0,00 \log \text{UFC g}^{-1}$ . Infine, la carica risulta compresa tra  $4,90 \pm 0,60 \log \text{UFC g}^{-1}$  e  $0,69 \pm 1,20 \log \text{UFC g}^{-1}$  per i salami SS<sub>150/125</sub> e tra  $5,21 \pm 0,15 \log \text{UFC g}^{-1}$  e  $0,00 \log \text{UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e T<sub>42</sub> per i salami CS<sub>150/125</sub>. Dall'analisi dei dati emerge come la carica di Enterobacteriaceae risulti sempre più alta nei

salami prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale a tutti i tempi di campionamento e per tutte le concentrazioni di nitrati/nitriti testate. Per quanto concerne i batteri lattici i salami tipo Fabriano SS<sub>0/0</sub> hanno mostrato una carica compresa tra  $4,61 \pm 0,08 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e  $8,16 \pm 0,16 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>7</sub>, mentre i salami CS<sub>0/0</sub> hanno mostrato una carica compresa tra  $5,62 \pm 0,11 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e  $8,51 \pm 0,02 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>42</sub>. Per i salami SS<sub>75/60</sub> i batteri lattici inizialmente presenti con valori di  $4,55 \pm 0,09 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> si assiste ad un incremento della popolazione microbica fino a raggiungere valori attorno  $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$ , analogamente si evidenzia una carica microbica paragonabile anche per i salami CS<sub>75/60</sub> partendo però da un valore iniziale di  $5,65 \pm 0,23 \log \text{ UFC g}^{-1}$  (T<sub>0</sub>). Per i salami SS<sub>150/125</sub> si evidenziano valori di batteri lattici compresi tra  $3,77 \pm 0,48 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e  $8,21 \pm 0,24 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>21</sub>, mentre per i salami CS<sub>150/125</sub> i batteri lattici sono compresi tra  $5,67 \pm 0,19 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e  $8,18 \pm 0,13 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>7</sub>. I salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter mostrano complessivamente una carica di batteri lattici significativamente più elevata al T<sub>0</sub> con un progressiva riduzione dell'impatto durante la maturazione, fatta eccezione per i salami SS<sub>0/0</sub> per i quali si evidenzia un effetto meno evidente. Le conte vitali dei cocchi coagulasi-negativi si sono attestate su valori compresi tra  $4,78 \pm 0,20 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e  $5,83 \pm 0,39 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>42</sub> per i salami SS<sub>0/0</sub>, e valori compresi tra  $5,47 \pm 0,25 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e  $4,83 \pm 0,15 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>7</sub> per i salami CS<sub>0/0</sub>. Per i salami tipo Fabriano SS<sub>75/60</sub> i cocchi coagulasi-negativi sono stati rilevati con valori compresi tra  $4,76 \pm 0,11 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub> e  $5,23 \pm 0,45 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>21</sub>; analogamente per i salami CS<sub>75/60</sub> le conte dei cocchi coagulasi-negativi si sono attestate su valori compresi tra  $5,36 \pm 0,73 \log \text{ UFC g}^{-1}$  (T<sub>21</sub>) e  $5,93 \pm 0,02 \log \text{ UFC g}^{-1}$  (T<sub>42</sub>). Infine per i campioni di salame SS<sub>150/125</sub> i cocchi coagulasi negativi sono risultati compresi tra  $5,05 \pm 0,20 \log \text{ UFC g}^{-1}$  (T<sub>0</sub>) e  $6,40 \pm 0,29 \log \text{ UFC g}^{-1}$  (T<sub>42</sub>), mentre per i salami CS<sub>150/125</sub> le conte si sono attestate su valori compresi tra  $5,02 \pm 0,33 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>21</sub> e  $5,56 \pm 0,21 \log \text{ UFC g}^{-1}$  a T<sub>0</sub>. Dall'analisi dei dati si evince che l'assenza di aggiunta di starter commerciale è correlata all'aumento di cocchi coagulasi-negativi al tempo T<sub>0</sub>, mentre la presenza di nitrati/nitriti determina un effetto sulle conte a tempo T<sub>42</sub>. Dalle analisi microbiologiche per la ricerca di *L. monocytogenes*, *C. botulinum* e *Salmonella* spp, i cui dati non sono mostrati, si evidenzia l'assenza, in 25 g di campione, di queste specie patogene, mentre la ricerca di cocchi coagulasi positivi ha rilevato valori  $<1 \log \text{ UFC g}^{-1}$  in tutti i campioni sottoposti ad analisi.

**Tabella III.3.** Conte vitali dei campioni di salami di tipo Fabriano analizzati

|                 | Enterobacteriaceae        |                           |      | Batteri lattici          |                           |         | Cocchi coagulasi-negativi |                          |         |
|-----------------|---------------------------|---------------------------|------|--------------------------|---------------------------|---------|---------------------------|--------------------------|---------|
|                 | SS <sub>0/0</sub>         | CS <sub>0/0</sub>         |      | SS <sub>0/0</sub>        | CS <sub>0/0</sub>         |         | SS <sub>0/0</sub>         | CS <sub>0/0</sub>        |         |
| T <sub>0</sub>  | 5,07 ± 0,53 <sub>ab</sub> | 4,87 ± 0,62 <sub>ab</sub> | n.s. | 4,61 ± 0,08 <sub>b</sub> | 5,62 ± 0,11 <sub>c</sub>  | 0,0002* | 4,78 ± 0,20 <sub>b</sub>  | 5,47 ± 0,25 <sub>a</sub> | 0,0204* |
| T <sub>7</sub>  | 6,06 ± 0,67 <sub>a</sub>  | 5,46 ± 0,49 <sub>a</sub>  | n.s. | 8,16 ± 0,16 <sub>a</sub> | 8,18 ± 0,03 <sub>b</sub>  | n.s.    | 4,98 ± 0,16 <sub>ab</sub> | 4,83 ± 0,15 <sub>a</sub> | n.s.    |
| T <sub>21</sub> | 5,22 ± 0,67 <sub>ab</sub> | 4,97 ± 0,52 <sub>a</sub>  | n.s. | 8,04 ± 0,54 <sub>a</sub> | 8,13 ± 0,04 <sub>b</sub>  | n.s.    | 5,10 ± 0,46 <sub>ab</sub> | 5,10 ± 0,53 <sub>a</sub> | n.s.    |
| T <sub>42</sub> | 3,84 ± 0,06 <sub>b</sub>  | 3,06 ± 1,07 <sub>b</sub>  | n.s. | 7,72 ± 0,15 <sub>a</sub> | 8,51 ± 0,02 <sub>a</sub>  | 0,0009  | 5,83 ± 0,39 <sub>a</sub>  | 4,91 ± 0,09 <sub>a</sub> | 0,0169* |
|                 | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>       |      | SS <sub>75/60</sub>      | CS <sub>75/60</sub>       |         | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>      |         |
| T <sub>0</sub>  | 5,14 ± 0,35 <sub>a</sub>  | 4,70 ± 0,71 <sub>ab</sub> | n.s. | 4,55 ± 0,09 <sub>b</sub> | 5,65 ± 0,23 <sub>b</sub>  | 0,0015  | 4,76 ± 0,11 <sub>a</sub>  | 5,66 ± 0,10 <sub>a</sub> | 0,005*  |
| T <sub>7</sub>  | 5,71 ± 0,28 <sub>a</sub>  | 5,30 ± 0,37 <sub>a</sub>  | n.s. | 7,84 ± 0,18 <sub>a</sub> | 7,36 ± 0,63 <sub>a</sub>  | n.s.    | 4,90 ± 0,14 <sub>a</sub>  | 5,45 ± 0,72 <sub>a</sub> | n.s.    |
| T <sub>21</sub> | 3,63 ± 0,32 <sub>a</sub>  | 3,72 ± 0,74 <sub>b</sub>  | n.s. | 7,77 ± 0,20 <sub>a</sub> | 7,47 ± 0,44 <sub>a</sub>  | n.s.    | 5,23 ± 0,45 <sub>a</sub>  | 5,36 ± 0,73 <sub>a</sub> | n.s.    |
| T <sub>42</sub> | 2,79 ± 2,25 <sub>a</sub>  | 0,00 ± 0,00 <sub>c</sub>  | n.s. | 7,45 ± 0,15 <sub>a</sub> | 7,54 ± 0,14 <sub>a</sub>  | n.s.    | 5,11 ± 0,07 <sub>a</sub>  | 5,93 ± 0,02 <sub>a</sub> | <,0001* |
|                 | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>       |      | SS <sub>75/60</sub>      | CS <sub>75/60</sub>       |         | SS <sub>75/60</sub>       | CS <sub>75/60</sub>      |         |
| T <sub>0</sub>  | 4,90 ± 0,60 <sub>a</sub>  | 5,21 ± 0,15 <sub>a</sub>  | n.s. | 3,77 ± 0,48 <sub>b</sub> | 5,67 ± 0,19 <sub>c</sub>  | 0,0032* | 5,05 ± 0,20 <sub>b</sub>  | 5,56 ± 0,21 <sub>a</sub> | 0,0362* |
| T <sub>7</sub>  | 4,31 ± 0,15 <sub>a</sub>  | 4,12 ± 1,04 <sub>a</sub>  | n.s. | 8,00 ± 0,47 <sub>a</sub> | 8,18 ± 0,13 <sub>a</sub>  | n.s.    | 5,16 ± 0,42 <sub>b</sub>  | 5,20 ± 0,61 <sub>a</sub> | n.s.    |
| T <sub>21</sub> | 4,03 ± 1,07 <sub>a</sub>  | 4,08 ± 1,51 <sub>a</sub>  | n.s. | 8,21 ± 0,24 <sub>a</sub> | 7,62 ± 0,13 <sub>b</sub>  | n.s.    | 5,40 ± 0,17 <sub>b</sub>  | 5,02 ± 0,33 <sub>a</sub> | n.s.    |
| T <sub>42</sub> | 0,69 ± 1,20 <sub>b</sub>  | 0,00 ± 0,00 <sub>b</sub>  | n.s. | 7,85 ± 0,14 <sub>a</sub> | 7,83 ± 0,04 <sub>ab</sub> | n.s.    | 6,40 ± 0,29 <sub>a</sub>  | 5,53 ± 0,04 <sub>a</sub> | 0,0065* |

SS<sub>0/0</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e privi di nitrati/nitriti; CS<sub>0/0</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciale ma privi di nitrati/nitriti; SS<sub>75/60</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e con l'aggiunta di 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; CS<sub>75/60</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciale e 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; SS<sub>150/125</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e con l'aggiunta di 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; CS<sub>150/125</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciale e 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito.

T<sub>0</sub>, salami campionati al momento della produzione; T<sub>7</sub>, salami campionati dopo 7 giorni di maturazione; T<sub>21</sub>, salami campionati dopo 21 giorni di maturazione; T<sub>42</sub>, salami campionati dopo 42 giorni di maturazione.

\*Differenze statistiche evidenziate tra i *batches* di salami prodotti con la medesima concentrazione di nitrati/nitriti con aggiunta o meno di starter commerciali sulla base del t test di Student. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative nel tempo secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Valori espressi come media log UFC ± deviazione standard.

#### 4.3. Analisi RT-PCR-DGGE

Il profilo DGGE ottenuto dall'analisi del cDNA sintetizzato a partire dall'RNA estratto dalla matrice dei salami tipo Fabriano sottoposti ad analisi ed amplificato con la coppia di *primers* 338f<sub>GC</sub>-518r è mostrato in Figura III.2, mentre il profilo ottenuto dall'amplificazione con la coppia di *primers* P1-P2 è mostrato in Figura III.3. L'ecologia microbica complessiva dei campioni di salami sottoposti ad analisi è mostrata in Tabella III.4, mentre i risultati degli allineamenti condotti sulla piattaforma BLAST delle sequenze di cDNA ottenute dal sequenziamento delle bande selezionate ed excise dal gel DGGE sono mostrati in Tabella III.5.

Dall'analisi DGGE emerge un elevato grado di omologia, durante la fasi di produzione e maturazione tra i salami prodotti senza e con l'aggiunta di starter commerciale, per tutte le concentrazioni di nitrati/nitriti saggiate nella presente sperimentazione.

Tutti i salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di nitrati e nitriti (SS<sub>0/0</sub> e CS<sub>0/0</sub>) sono caratterizzati dalla presenza della specie *Brochothrix thermosphacta* al T<sub>0</sub>, *Enterococcus faecium* al T<sub>7</sub> e delle specie *Pseudomonas koreensis* e *Staphylococcus equorum* al T<sub>42</sub>. Altre specie identificate sporadicamente durante la produzione e maturazione di questi salami sono inoltre *Lactococcus lactis*, *Lactococcus* sp. *Pseudomonas* sp. e *Serratia liquefaciens*. Dall'analisi sono emerse specie batteriche presenti esclusivamente nei salami prodotti con l'aggiunta di concentrazioni intermedie (75/60 mg kg<sup>-1</sup>) o alte (150/125 mg kg<sup>-1</sup>) di nitrati e nitriti quali ad esempio *Alpha proteobacterium*, *Lactobacillus graminis/curvatus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fragi*. In particolare, le ultime due specie sono state rilevate esclusivamente al T<sub>0</sub> e dunque durante la fase di produzione, mentre membri del gruppo *Lact. graminis/curvatus* sono stati rilevati in tutti i campioni durante la stagionatura, a partire da T<sub>7</sub> fino al T<sub>42</sub>.

Nei salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito è stata inoltre rilevata la presenza di *A. proteobacterium* e *Lact. rhamnosus* in tutti i tempi di campionamento per i salami SS<sub>75/60</sub> e solo al tempo T<sub>0</sub> per i salami CS<sub>75/60</sub>. Le stesse specie sono state identificate nei salami SS<sub>150/125</sub> e CS<sub>150/125</sub> esclusivamente al T<sub>0</sub>.

Unica specie ritrovata nella maggior parte dei tempi di campionamento, in tutti i salami tipo Fabriano in studio è *Lactobacillus sakei*, presente dunque in assenza e in presenza dello starter, con aggiunta o meno di nitrati e

nitriti. Unici tempi di campionamento in cui *Lact. sakei* non è risultato presente è stato il T<sub>0</sub> per i salami SS<sub>0/0</sub>, CS<sub>0/0</sub>, SS<sub>150/125</sub> e CS<sub>150/125</sub>.

Dall'analisi DGGE degli starter microbici utilizzati per l'allestimento della prova sperimentale, di cui non si mostra profilo DGGE, emerge la presenza esclusiva di due specie *S. saprophyticus*/*S. xylosus* e *P. pentosaceus*; quest'ultima specie in particolare è stata identificata in tutti i salami prodotti con lo starter commerciale al tempo T<sub>0</sub> e solo per il salame SS<sub>0/0</sub> *P. pentosaceus* è stato identificato anche al tempo T<sub>21</sub>.





**Tabella III.4.** Specie batteriche identificate durante la produzione e la stagionatura di salami tipo Fabriano.

|                                               | SS <sub>0/0</sub> |                |                 |                 | CS <sub>0/0</sub> |                |                 |                 | SS <sub>75/60</sub> |                |                 |                 | CS <sub>75/60</sub> |                |                 |                 | SS <sub>150/125</sub> |                |                 |                 | CS <sub>150/125</sub> |                |                 |                 |
|-----------------------------------------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------------|----------------|-----------------|-----------------|
|                                               | T <sub>0</sub>    | T <sub>7</sub> | T <sub>21</sub> | T <sub>42</sub> | T <sub>0</sub>    | T <sub>7</sub> | T <sub>21</sub> | T <sub>42</sub> | T <sub>0</sub>      | T <sub>7</sub> | T <sub>21</sub> | T <sub>42</sub> | T <sub>0</sub>      | T <sub>7</sub> | T <sub>21</sub> | T <sub>42</sub> | T <sub>0</sub>        | T <sub>7</sub> | T <sub>21</sub> | T <sub>42</sub> | T <sub>0</sub>        | T <sub>7</sub> | T <sub>21</sub> | T <sub>42</sub> |
| <i>Alpha proteobacterium</i>                  |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 | •                   | •              | •               | •               | •                   |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 |
| <i>Brochothrix thermosphacta</i>              | •                 |                |                 |                 | •                 |                |                 |                 | •                   |                | •               | •               | •                   |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 |
| <i>Enterococcus faecium</i>                   |                   | •              |                 |                 |                   | •              |                 |                 |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |
| <i>Lactobacillus graminis/ curvatus group</i> |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 |                     | •              | •               | •               |                     | •              | •               | •               |                       | •              | •               | •               |                       | •              | •               | •               |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 | •                   | •              | •               | •               | •                   | •              |                 |                 | •                     |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 |
| <i>Lactobacillus sakei</i>                    |                   | •              | •               | •               |                   | •              | •               | •               | •                   | •              | •               | •               | •                   | •              | •               | •               |                       | •              | •               | •               |                       | •              | •               | •               |
| <i>Lactococcus lactis</i>                     |                   | •              |                 | •               |                   |                |                 | •               |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |
| <i>Lactococcus sp</i>                         |                   | •              |                 | •               |                   |                |                 | •               |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |
| <i>Pediococcus pentosaceus</i>                |                   |                |                 |                 | •                 |                |                 | •               |                     |                |                 |                 | •                   |                |                 |                 |                       |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 |
| <i>Pseudomonas fluorescens</i>                |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 | •                   |                |                 |                 | •                   |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 |
| <i>Pseudomonas fragi</i>                      |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 | •                   |                |                 |                 | •                   |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 |
| <i>Pseudomonas koreensis</i>                  |                   |                |                 | •               |                   |                |                 | •               |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |
| <i>Pseudomonas sp</i>                         | •                 | •              | •               |                 | •                 | •              |                 |                 | •                   |                |                 |                 | •                   |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 | •                     |                |                 |                 |
| <i>Serratia liquefaciens</i>                  |                   | •              |                 | •               | •                 |                | •               |                 |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |
| <i>Staphylococcus arlettae/</i>               |                   |                |                 |                 |                   |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i>           |                   |                |                 |                 |                   |                |                 | •               |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |
| <i>Staphylococcus equorum</i>                 |                   |                |                 | •               |                   |                |                 | •               |                     |                |                 |                 |                     |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |                       |                |                 |                 |

SS<sub>0/0</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciali e privi di nitrati/nitriti; CS<sub>0/0</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciali ma privi di nitrati/nitriti; SS<sub>75/60</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciali e con l'aggiunta di 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; CS<sub>75/60</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciali e 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; SS<sub>150/125</sub>: salami tipo Fabriano prodotti senza l'aggiunta di starter commerciali e con l'aggiunta di 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito; CS<sub>150/125</sub>: salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciali e 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito.

T<sub>0</sub>, salami campionati al momento della produzione; T<sub>7</sub>, salami campionati dopo 7 giorni di maturazione; T<sub>21</sub>, salami campionati dopo 21 giorni di maturazione; T<sub>42</sub>, salami campionati dopo 42 giorni di maturazione.

**Tabella III.5.** Risultati del sequenziamento delle bande excise dai gel DGGE.

| Banda                                                          | Closest relative                                    | % Ident. <sup>a</sup> | Acc. nu. <sup>b</sup> |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| <b>1, 4, 61</b>                                                | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 99%                   | EU482921              |
| <b>2, 56</b>                                                   | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 99%                   | EU482915              |
| <b>3</b>                                                       | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 98%                   | GU944501              |
| <b>5</b>                                                       | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 98%                   | KM187301              |
|                                                                | <i>Pseudomonas syringae</i>                         |                       | EF681126              |
|                                                                | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                      |                       | AJ971392              |
| <b>8</b>                                                       | <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>               | 96%                   | KT369914              |
|                                                                | <i>Pseudomonas fragi</i>                            |                       | KT767885              |
| <b>9, 43, 58, 59, 66, 67, 74,75,</b>                           | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 99%                   | EU482914              |
| <b>10</b>                                                      | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 98%                   | LN833325              |
|                                                                | <i>Pseudomonas fragi</i>                            |                       | KT767896              |
| <b>11</b>                                                      | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 98%                   | GU944501              |
| <b>6, 15, 33</b>                                               | <i>Enterococcus faecium</i>                         | 86%                   | KM921923              |
| <b>16, 34</b>                                                  | <i>Pseudomonas fragi</i>                            |                       | AB685638              |
| <b>17, 26, 36</b>                                              | <i>Lactococcus</i> sp.                              | 96%                   | KM100596              |
| <b>13, 18, 37</b>                                              | <i>Serratia liquefaciens</i>                        | 99%                   | FJ811865              |
| <b>19, 38</b>                                                  | <i>Serratia</i> sp.                                 | 100%                  | GU939690              |
| <b>14, 20, 21, 22, 31, 32,</b>                                 | <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>      | 100%                  | KT626399              |
| <b>7, 23, 35</b>                                               | <i>Pediococcus pentosaceus</i>                      | 99%                   | KF188679              |
| <b>24, 25, 39, 40</b>                                          | <i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>equorum</i> | 99%                   | GQ169122              |
| <b>27, 28, 42, 54, 57, 62, 63, 65</b>                          | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 100%                  | HF546529              |
| <b>12, 29, 30, 47, 48, 55, 60, 77, 78, 85, 86, 88, 93, 94,</b> | Failed                                              |                       |                       |
| <b>96, 101, 109, 110, 111, 112, 114, 115, 116, 117</b>         |                                                     |                       |                       |
| <b>41</b>                                                      | <i>Staphylococcus arlettae</i>                      | 99%                   | KF233798              |
|                                                                | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>                 | 99%                   | EU169536              |
| <b>44</b>                                                      | <i>Leuconostoc mesenteroides</i>                    | 75%                   | JN792512              |
| <b>45</b>                                                      | <i>Lactobacillus curvatus</i>                       | 99%                   | KT763326              |
| <b>46, 72</b>                                                  | <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>      | 100%                  | KT626399              |
| <b>49</b>                                                      | <i>Alpha proteobacterium</i>                        | 98%                   | AY429692              |
| <b>50</b>                                                      | <i>Lactobacillus rhamnosus</i>                      | 98%                   | KT215644              |
| <b>51</b>                                                      | <i>Holospira acuminata</i>                          | 98%                   | KC164379              |
|                                                                | <i>Holospira curviuscula</i>                        |                       | KC164378              |
| <b>52</b>                                                      | <i>Lactobacillus sakei</i>                          | 86%                   | AF401673              |
| <b>53</b>                                                      | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 99%                   | KM187296              |
| <b>64</b>                                                      | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 97%                   | KP216501              |
| <b>68</b>                                                      | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 84%                   | KT933231              |
| <b>69, 79</b>                                                  | <i>Lactobacillus curvatus</i>                       | 98%                   | KT601496              |
|                                                                | <i>Lactobacillus graminis</i>                       | 98%                   | LC097076              |
| <b>70, 80</b>                                                  | <i>Lactobacillus curvatus</i>                       | 98%                   | KT601496              |
|                                                                | <i>Lactobacillus graminis</i>                       | 98%                   | LC097076              |
| <b>71, 81</b>                                                  | <i>Holospira acuminata</i>                          | 98%                   | KC164379              |
| <b>73</b>                                                      | <i>Pseudomonas fluorescens</i>                      | 98%                   | AJ971392              |
| <b>76</b>                                                      | <i>Pseudomonas</i> sp.                              | 98%                   | KT923307              |
|                                                                | <i>Pseudomonas fragi</i>                            | 98%                   | KT767867              |
| <b>82, 92, 102, 103, 104, 107, 119</b>                         | <i>Brochothrix thermosphacta</i>                    | 98%                   | AF318169              |
| <b>83, 89, 98</b>                                              | <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>      | 100%                  | KT887236              |

|                   |                                         |      |                       |
|-------------------|-----------------------------------------|------|-----------------------|
| <b>84, 90, 99</b> | <i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> | 100% | AB681295 <sup>T</sup> |
| <b>87, 95</b>     | <i>Lactobacillus sakei subsp. sakei</i> | 98%  | LC064899              |
| <b>91, 97</b>     | <i>Pediococcus pentosaceus</i>          | 99%  | LC071837              |
| <b>100</b>        | <i>Pseudomonas koreensis</i>            | 100% | CP014947              |
| <b>105, 118</b>   | <i>Pediococcus pentosaceus</i>          | 99%  | KU527556              |
| <b>106</b>        | <i>Lactobacillus sakei</i>              | 98%  | KT601495              |
| <b>108, 113</b>   | <i>Pediococcus damnosus</i>             | 100% | CP012294              |
| <b>S1, S3</b>     | <i>Staphylococcus saprophyticus</i>     | 98%  | KX242274              |
|                   | <i>Staphylococcus xylosus</i>           | 98%  | KX570902              |
| <b>S2, S4</b>     | <i>Pediococcus pentosaceus</i>          | 98%  | KX017196              |
| <b>S5, S6</b>     | <i>Pediococcus pentosaceus</i>          | 96%  | KF554131              |

<sup>a</sup> Percentuale di identità tra la sequenza ottenuta dal sequenziamento e la sequenza nucleotidica relativa alla specie identificata dall'allineamento nel database GenBank. <sup>b</sup> *Accession number* relativo ad ogni specie identificata attraverso il BLAST.

#### 4.4. Sequenziamento con Sistema Illumina MySeq

Il cDNA sintetizzato a partire dalle molecole di RNA estratte dai salami tipo Fabriano in studio, è stato sottoposto ad amplificazione della regione V3-V4 del gene 16S rRNA e successivo sequenziamento. A seguito delle operazioni di *splitting* e *trimming* dei dati grezzi, sono state ottenute 2.987.840 *reads* utili per le successive analisi. Dopo l'allineamento, le OTUs costituite esclusivamente da una o due reads (*singletons* e *doubles*) sono state escluse automaticamente dal *software* QIIME, mentre le altre OTUs sono state raggruppate utilizzando come parametro una distanza del 3%. Mediante l'indice Chao1 è stato calcolato il valore medio stimato di OTUs attese per ogni campione di salame tipo Fabriano analizzato, pari a  $896 \pm 144$  OTUs, che confrontate con il numero medio di OTUs realmente identificate, pari a  $669 \pm 121$  ha permesso di definire una copertura del 75% delle OTUs stimate della popolazione batterica in esame. L'abbondanza relativa, espressa come %, dei differenti gruppi batterici identificati è mostrata in Figura III.4. Tramite analisi Illumina è stato possibile identificare che il 70% delle OTUs totale è rappresentato dai generi *Lactobacillus* e *Pseudomonas*, mentre il restante 30% è rappresentato da generi minoritari *Brochothrix*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* e *Psychrobacter*. Mediante una valutazione complessiva dei campioni di salami in studio è stato possibile identificare l'assenza di differenze significative tra i campioni di salami prodotti con e senza aggiunta di starter commerciali a T<sub>0</sub>, indipendentemente dalla concentrazione di nitrati e nitriti saggiata. Unica eccezione è rappresentata dai generi *Pediococcus* e *Staphylococcus*, i quali seppur presenti in bassa percentuale, risultano più abbondanti nei campioni di salumi prodotti con l'uso di starter commerciale (abbondanza delle OTUs del genere *Pediococcus* e *Staphylococcus* rispettivamente pari a 6,4% e 1,1%) rispetto ai campioni prodotti senza aggiunta di starter commerciali (abbondanza delle OTUs inferiore allo 0,1%). Tutti i salami campionati al termine della fase di produzione (T<sub>0</sub>) sono stati caratterizzati dalla presenza di 4 generi batterici *Pseudomonas*, che rappresenta il 60% delle OTUs totali, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Brochotrix* e l'ordine Enterobacteriaceae. Questi generi e ordini sono stati rilevati anche nei salami campionati a T<sub>7</sub>, T<sub>21</sub> e T<sub>42</sub> con un'abbondanza relativa decisamente più bassa, e in particolare l'ordine *Acinetobacter* mostra un'abbondanza inferiore al 2%. Al contrario, la famiglia Leuconostocaceae, il genere *Staphylococcus* e la specie *Lact. sakei* sono stati identificati come dominanti durante tutto il processo di stagionatura dei salami, rappresentando circa il 65% delle OTUs totali ottenute. Unica differenza statisticamente significativa identificata tra i salami prodotti senza aggiunta di starter e

con aggiunta di starter commercial è la presenza, in quest'ultimi campioni, della specie *P. pentosaceus* con un'abbondanza relativa pari a 6,7% delle OTUs totali.

Attraverso la valutazione complessiva dei salami prodotti con concentrazioni variabili di nitrati e nitriti, indipendentemente dalla presenza o meno di starter commerciale è stata identificata un'elevata diversità microbica nei campioni prodotti senza aggiunta di nitrati/nitriti, in particolare, l'indice Chao1 è stato calcolato pari a 875 per i salami prodotti con aggiunta di nitrati/nitriti (considerando congiuntamente le concentrazioni 75/60 mg kg<sup>-1</sup> e 150/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrati/nitriti) e 982 per i salami prodotti senza aggiunta di nitrati/nitriti. Questa elevata diversità microbica è rappresentata dall'ordine Enterobacteriaceae, dalla famiglia Carnobacteriaceae e dal genere *Lactococcus*. Mentre, questi *taxa* microbici sono identificabili solo in tracce nei salami prodotti con 150/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrati/nitriti con un'abbondanza relativa <1% sul totale delle OTUs. Dall'analisi dei dati è emerso un significativo impatto dei nitrati/nitriti, indipendentemente dalla concentrazione, sulle *performance* dello starter commerciale durante la stagionatura dei salami. In particolare, i campioni prodotti senza aggiunta di nitrati/nitriti sono stati caratterizzati da maggiore abbondanza del genere *Staphylococcus* a T<sub>21</sub> e della specie *P. pentosaceus* a T<sub>42</sub>. Al contrario, non è stato identificato nessun impatto dei nitrati/nitriti sullo sviluppo del genere *Lactobacillus*; in particolare, infatti, l'abbondanza della specie *Lact. sakei* si è attestata su valori elevati pari al 75% delle OTUs totale nei salami prodotti con aggiunta di nitrati/nitriti e al 51% delle OTUs totali nei salami prodotti senza aggiunta di nitrati/nitriti.

Al fine di confrontare i dati ottenuti con il sistema Illumina e quelli ottenuti dall'analisi RT-PCR-DGGE è stata condotta un'analisi BLASTn al fine di confrontare i generi *Brochotrix*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus* e *Pseudomonas* presenti nelle *reads* con quelli presenti nel database *Microbial Genomes* NCBI. In accordo con quanto identificato attraverso analisi RT-PCR-DGGE, tutte le OTUs appartenenti al genere *Brochotrix* sono state identificate come appartenenti alla specie *B. thermosphacta*, le OTUs appartenenti al genere *Lactobacillus* sono state classificate principalmente come *Lact. sakei* e in misura minore come specie *Lact. crustorum*, *Lact. coryniformis*, *Lact. brevis*, *Lact. rhamnosus*, *Lact. plantarum* e *Lactobacillus paucivorans*. Inoltre, le OTUs del genere *Staphylococcus* sono state identificate come *S. equorum* and *xylosus*, le OTUs del genere *Pediococcus* sono state classificate come *P. pentosaceus* infine, le OTUs del genere *Pseudomonas* sono state identificate con le specie *P. fluorescens*, *P. lundensis* e *P. fragi*.

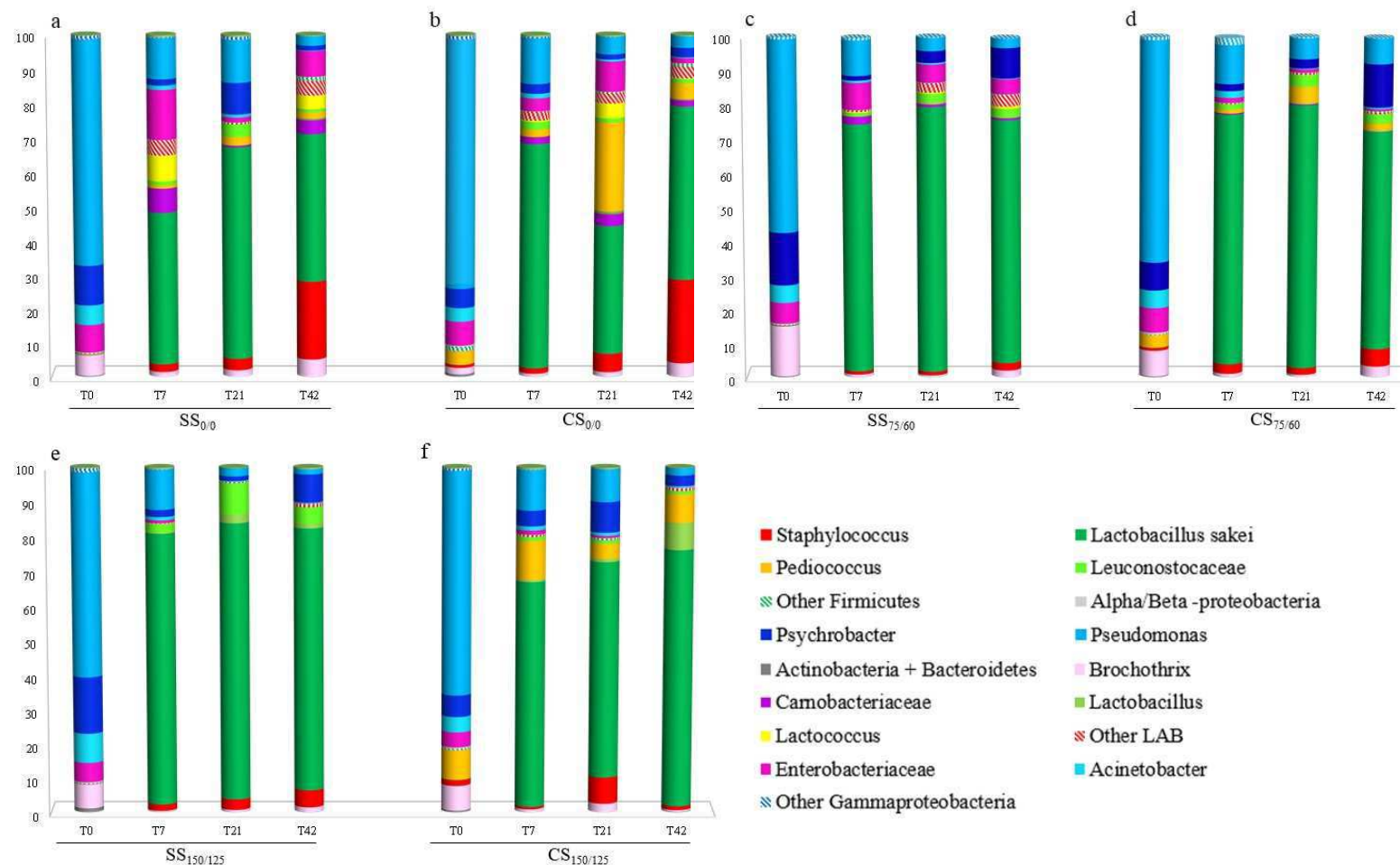


**Figura III.4.** Abbondanza relativa % dei differenti generi batterici identificati attraverso la tecnica Illumina MySeq nei campioni di salame tipo Fabriano SS<sub>0/0</sub> prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e privi di nitrati/nitriti (a); salami tipo Fabriano CS<sub>0/0</sub> prodotti con l'aggiunta di starter commerciale ma privi di nitrati/nitriti (b); salami tipo Fabriano SS<sub>75/60</sub> prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e con l'aggiunta di 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito (c); salami tipo Fabriano CS<sub>75/60</sub> prodotti con l'aggiunta di starter commerciale e 75 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/60 mg kg<sup>-1</sup> nitrito (d); salami tipo Fabriano SS<sub>150/125</sub> prodotti senza l'aggiunta di starter commerciale e con l'aggiunta di 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito (e); salami tipo Fabriano CS<sub>150/125</sub> prodotti con l'aggiunta di starter commerciale e 150 mg kg<sup>-1</sup> nitrato/125 mg kg<sup>-1</sup> nitrito (f). "Other uncultured, unidentified or less than 0.1%" identifica tutti i generi batterici non identificati o la cui abbondanza relativa è risultata inferiore allo 0,1%.

## 5. Discussione e conclusione

La fermentazione è una delle tecniche più antiche e diffuse di estensione della *shelf life* delle materie prime e questo è particolarmente vero per i prodotti a base di carne. I salami sono prodotti fermentati tradizionali altamente peculiari, che comprendono una vasta gamma di prodotti carnei che differiscono l'uno dall'altro in relazione a fattori determinanti quali materie prime, starter commerciali e condizioni di asciugatura e maturazione (Toldrá, 2006). In particolare, le condizioni iniziali di asciugatura dei salami sono in grado di influenzare bruscamente l'ecologia e le dinamiche microbiche sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo (Bover-Cid *et al.*, 2009; Gardini *et al.*, 2008). La microflora che si sviluppa durante le fasi di asciugatura e maturazione dei salami è in grado di definire caratteristiche organolettiche e sensoriali finali altamente distintive che differiscono notevolmente da un prodotto all'altro.

Durante la macellazione delle carni e la produzione di salami, i tagli di carne e più nello specifico la carne macinata sottoposta ad aggiunta di sale, spezie e grasso, prima di essere introdotta nel budello può essere contaminata da generi microbici patogeni appartenenti alla famiglia Enterobacteriaceae, quali *Salmonella*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella* e *Yersinia* (Petruzzelli *et al.*, 2016). Inoltre, a causa di contaminazioni ambientali crociate, legate in larga misura ad utilizzo di apparecchiature poco pulite in ambienti di lavoro non salubri, la carne può subire delle contaminazioni da parte di microrganismi quali ad esempio *Pseudomonas* (Iacumin *et al.*, 2017). Nel presente studio, per quanto concerne gli aspetti di sicurezza microbiologica, l'assenza di specie patogene quali *C. botulinum*, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* è stata considerata un aspetto chiave legato all'elevata qualità delle materie prime utilizzate e alle buone condizioni igieniche mantenute durante la macellazione e la preparazione della carne per la produzione dei salami tipo Fabriano.

La carica microbica relativa a batteri lattici e cocchi coagulasi-negativi è risultata paragonabile a quanto identificato da Hospital *et al.* (2015) in campioni di *chorizo*, tipico insaccato spagnolo prodotto con carne di suino, o talvolta bovino, tritata in modo grossolano e aggiunta di sale e paprika dolce o salata, trattati con concentrazioni variabili di nitrati e nitriti. In particolare, nello studio di Hospital e colleghi (2015) sono state saggiate quattro differenti concentrazioni di nitrati/nitriti pari a 150 mg kg<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>/ 150 mg kg<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, 112,5 mg kg<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>/ 112,5 mg kg<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>, 75 mg kg<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>/ 75 mg kg<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub> e 0 mg kg<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>/ 0 mg kg<sup>-1</sup> NaNO<sub>2</sub>. Dal

confronto dei dati relativi alle Enterobacteriaceae si osserva un impatto evidente della concentrazione di nitrati/nitriti sulla carica durante i 27 giorni di stagionatura del prodotto, dati questi non in linea con quanto identificato nel presente lavoro di tesi e con quanto riportato da altri autori in bibliografia (Jay *et al.*, 2005; Fonseca *et al.*, 2013). A dispetto di quanto esplicitato per i nitrati/nitriti, la carica microbica delle Enterobacteriaceae risulta notevolmente influenzata dall'uso di colture starter durante la produzione di salami, l'aggiunta di batteri lattici infatti determina l'inibizione della crescita microbica di questa famiglia batterica (Cenci Goga *et al.*, 2012). In particolare, la specie *P. pentosaceus* ha mostrato una forte azione inibente, quando aggiunto come starter commerciale nella produzione di salami, in relazione alla produzione di pediocina, una proteina in grado di modificare la permeabilità della membrana cellulare batterica determinando così la lisi cellulare (Porto *et al.*, 2017).

Al contrario di quanto descritto per le Enterobacteriaceae, nessun effetto inibitorio dei nitrati/nitriti è stato osservato nei confronti dei batteri lattici nel presente studio, come riportato da Hammes (2012) e Paik *et al.* (2014). In particolare, le conte microbiche registrate durante il processo di maturazione dei salami tipo Fabriano prodotti con aggiunta o meno di starter commerciale sono in linea con quanto descritto da Hospital *et al.* (2015).

Per quanto riguarda la carica microbica dei cocchi coagulasi negativi, i dati ottenuti nel presente studio risultano in linea con quanto descritto da Hospital e collaboratori in due diversi studi (2012 e 2015); in particolare, la crescita di questi batteri risulta favorita dall'aggiunta di nitrati/nitriti in presenza di bassa tensione di ossigeno, condizione che si verifica nel cuore del prodotto (Neubauer & Götz 1996), mentre risulta inibita in presenza di elevate concentrazioni di nitrati/nitriti a causa di un eccessivo aumento del quantitativo di nitrito intracellulare (Götz *et al.*, 2006). Le elevate conte microbiche dei cocchi coagulasi-negativi nei salami tipo Fabriano prodotti con l'aggiunta di starter commerciale risulta in accordo con quanto esposto da Sánchez Maiñar e collaboratori (2017) circa la buona capacità di adattamento di questo gruppo microbico nella carne fermentata.

La diversità e la dinamica microbica è stata valutata in questo lavoro attraverso un approccio PCR-DGGE e Illumina *sequencing* al fine di ottenere una descrizione il più possibile esaustiva della comunità microbica; inoltre, l'analisi condotta sul RNA estratto ha permesso di identificare le specie metabolicamente attive seppur

risultati scientificamente conclamato che vi possano essere dei fattori limitanti definiti dalla presenza di un numero elevato di ribosomi in cellule dormienti o dall'identificazione di cellule morte non lisate (Blazewicz *et al.*, 2013; Garofalo *et al.*, 2017). Mediante analisi RT-PCR-DGGE è stato possibile evidenziare l'effetto della massima concentrazione di nitrati/nitriti ( $150 \text{ mg kg}^{-1}/125 \text{ mg kg}^{-1}$ ) sulla presenza di alcuni generi e specie quali *Pseudomonas* spp., *S. liquefaciens* e *Staphylococcus* spp. che sembrano diminuire durante la stagionatura dei salami. Questi dati sono stati in parte corretti mediante analisi Illumina *sequencing* che ha permesso di evidenziare la presenza del genere *Pseudomonas* durante l'intero processo di stagionatura.

Il genere *Pseudomonas*, che comprende più di 100 specie psicotolleranti, in grado quindi di crescere a temperature comprese tra  $2^{\circ}\text{C}$  e  $35^{\circ}\text{C}$ , è spesso correlato al deterioramento di cibi freschi durante la refrigerazione (Liao, 2006; Franzetti & Scarpellini, 2007; Ercolini *et al.*, 2006), in particolare due sono le specie dominanti negli ambienti di lavorazione, aree di sezionamento e macellazione delle carni, la specie *P. fluorescens* e *P. fragi*, che grazie al catabolismo degli aminoacidi determinano lo sviluppo di odori sgradevoli. Inoltre, *P. fragi* rappresenta in assoluto la specie dominante identificata nelle carni fresche alterate (Drosinos & Board, 1995; Franzetti & Scarpellini, 2007). Un'azione inibente nei confronti del genere *Pseudomonas* potrebbe essere svolta dai batteri lattici metabolicamente attivi durante la maturazione del salame; in particolare le specie *Lact. curvatus* e *Lact. sakei* sono state caratterizzate per la loro capacità di produrre piccoli peptidi e aminoacidi attraverso l'idrolisi di proteine sarcoplasmatiche e miofibrillari (Fadda *et al.*, 1999). Inoltre, un recente studio ha dimostrato come specie del genere *Pseudomonas* risultino sensibili nei confronti di varie batteriocine prodotte da specie diverse di batteri lattici (Woraprayote *et al.* 2017).

Altro genere batterico generalmente riscontrabile negli ambienti di lavorazione delle carni e in particolar modo sulle superficie di lavoro, è la *Serratia*. La sua azione deteriorante si esplica per lo più attraverso la produzione di ammine biogene come putrescina e cadaverina ottenute dalla decarbossilazione di aminoacidi quali ornitina o arginina e lisina (Ercolini *et al.*, 2006; Gram *et al.*, 2002; De Filippis *et al.*, 2013).

*Taxa* microbico identificato da entrambe le tecniche, caratterizzato dalla presenza di specie patogene e prototecnologiche, è il genere *Staphylococcus*, la cui presenza è stata rilevata soprattutto nei salami tipo Fabriano a 42 giorni di stagionatura prodotti senza aggiunta di nitrati/nitriti. In particolare, i risultati ottenuti con la tecnica Illumina *sequencing* sono risultati in linea con quanto ottenuto dall'enumerazione in piastra, mentre la tecnica

RT-PCR-DGGE ha mostrato delle limitazioni correlate a fenomeni di efficienza di estrazione e amplificazione degli acidi nucleici variabile (Ercolini, 2004). Specie frequentemente riscontrate nei salami prodotti in Italia e in altri paesi dell'area del Mediterraneo sono *S. xylosum*, *S. pasteurii*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii* and *Staphylococcus epidermidis* (Aquilanti *et al.*, 2016).

La specie patogena *S. aureus* è stata correlata a fenomeni di contaminazione di salami fermentati in relazione alla sua presenza a livello delle carni crude utilizzate come matrice, all'elevata tolleranza nei confronti del sale e alla presenza di nitriti. Aspetto importante riguarda la capacità di questa specie di produrre enterotossine termostabili che dunque permangono nel prodotto anche a seguito della morte del patogeno stesso. *S. aureus* si caratterizza altresì per una bassa acidotolleranza, dunque, il raggiungimento di un pH acido, con valori inferiori a 5,3, permette di limitare la possibilità di produrre tossine. Per questo motivo l'uso di starter commerciali nella produzione del salame risulta essere un fattore di prevenzione nei confronti dell'insorgenza di rischi legati alla proliferazione di questa specie patogena e alla produzione di enterotossine (Hui *et al.*, 2004).

Aspetto interessante, rilevato con entrambe le tecniche, riguarda la presenza della specie *Lact. sakei* in tutti i salami prodotti indipendentemente dalla presenza o meno di starter commerciale e di nitrati/nitriti; questa specie isolata normalmente da vari habitat quali ad esempio carne, pesce o vegetali fermentati, mostra un notevole grado di adattamento all'ambiente di lavorazione e produzione di prodotti carnei.

La specie *Lact. sakei* è stata identificata in molti salami italiani quali: Salame Milano, Soppressa, Salame Mantovano, Salame Cremonese, Salame Bergamasco, Ciauscolo, Salame Napoli, Soppressata del Vallo di Diano, Salame di Senise, Salsiccia sarda, Salame Brianza, Salame Varzi e Salame Piacentino (Di Cagno *et al.*, 2008; Aquilanti *et al.*, 2016), nonché in salami francesi e greci quali *Chorizo*, *Fuet*, *Androlla*, *Alheria de Mirandela* (Aquilanti *et al.*, 2016). *Lact. sakei*, a differenza di molte specie di batteri lattici, mostra un'ottima tolleranza verso parametri quali bassa temperatura ed elevato livello di ossigeno, oltre a mostrare una notevole attività metabolica (Chaillou *et al.*, 2005). Quest'ultima caratteristica, rende questa specie importante nel definire le caratteristiche organolettiche finali del salame (Greppi *et al.*, 2015). La specie *Lact. sakei*, inoltre, è stata caratterizzata per la buona competitività rispetto alle altre specie di batteri lattici, per l'elevata velocità di crescita, per la capacità di raggiungere densità cellulari piuttosto rilevanti e per la capacità di produrre acidi

organici e batteriocine con attività inibitoria nei confronti di microrganismi alterativi o patogeni (Wang *et al.*, 2013).

La presenza del genere microbico *Pediococcus* spp. nei salami tipo Fabriano è stata attribuita quasi esclusivamente all'uso di starter commerciale durante la produzione; infatti, le analisi RT-PCR-DGGE e Illumina *sequencing* hanno evidenziato la presenza esclusiva di questo genere e in particolare della specie *P. pentosaceus* solo nei salami prodotti con aggiunta di starter, mentre non sono state rilevate tracce negli altri salami a fermentazione spontanea. Questi dati sono in linea con quanto riportato da altri autori riguardo l'identificazione del genere *Pediococcus* e più in particolare delle specie *P. pentosaceus* e *P. acidilactici* in salami fermentati (Antara *et al.*, 2002; Fontana *et al.*, 2005; Greco *et al.*, 2005; Di Cagno *et al.*, 2008; Aquilanti *et al.*, 2016). La capacità di produrre batteriocine in grado di inibire la crescita di *Listeria* spp. (Albano *et al.*, 2007), l'elevata attività di riduzione del nitrito con conseguente riduzione dei livelli residui (Hammes, 2012; Kim & Hur, 2018) e la capacità di inibire i microrganismi alterativi (Porto *et al.*, 2017) rendono la specie *P. pentosaceus* una delle più frequentemente utilizzate come starter commerciale nell'industria alimentare.

Infine, attraverso entrambe le tecniche RT-PCR-DGGE e Illumina *sequencing* è stato possibile identificare la presenza della specie *B. thermosphacta*, questa specie identificata anche in salami Varzi e Piacentino (Di Cagno *et al.*, 2008), è una specie alterativa spesso identificata nei prodotti carnei (Ercolini *et al.*, 2006; Pin *et al.*, 2002) a causa della sua presenza a livello delle superficie di lavoro dei macelli o della pelle animale causando così contaminazioni crociate delle materie prime. Il controllo della presenza di questa specie può essere condotto mediante effetto combinato della concentrazione di nitrati/nitriti e presenza di batteriocine prodotte dai generi microbici *Lactobacillus*, *Enterococcus* e *Pediococcus*, noti per la loro azione inibente nei confronti dei microrganismi alterativi della carne (Aymerich *et al.*, 2008; Baños *et al.*, 2012).

## 6. Bibliografia

- Albano, H., Todorov, S.D., van Reenen, C.A., Hogg, T., Dicks, L.M.T., Teixeira, P. 2007. Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology* 116:239-247.
- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmasso, A., Civera, T., Coccolin, L. 2010. Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 26:2211-2221.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5464-5473.
- Antara, N.S., Sujaya, I.N., Yokota, A., Asano, K., Aryanta, W.R., Tomita, F. 2002. Identification and succession of lactic acid bacteria during fermentation of urutan, a Balinese indigenous fermented sausage. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:255–262.
- AOAC Method 950.46. 2000. Official Methods of Analysis (17th Ed.). Association of Official Analytical Chemistry.
- Aquilanti, L., Garofalo, C., Osimani, A., Clementi, F. 2016. Ecology of lactic acid bacteria and coagulase negative cocci in fermented dry sausages manufactured in Italy and other Mediterranean countries: an overview. *International Food Research Journal* 23:429-445.
- Aymerich, M.T., Martìn, B., Garriga, M., Hugas, M. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 69:4583-4594.
- Aymerich, T., Picouet, P.A., Monfort, J.M. 2008. Decontamination technologies for meat products. *Meat Science* 78:114-129.
- Baños, A., Ananou, S., Martínez-Bueno, M., Gálvez, A., M. Maqueda, M., Valdivia, E. 2012. Prevention of spoilage by enterocin AS-48 combined with chemical preservatives, under vacuum, or modified atmosphere in a cooked ham model. *Food Control* 24:15-22.
- Berni, E. 2014 “Molds” in Handbook of Fermented Meat and Poultry, F. Toldrá, Ed., Wiley Blackwell, West Sussex, UK, 2nd edition. 147-153.
- Blaiootta, G., Pennacchia, C., Villani, F., Ricciardi, A., Tofalo, R., Parente, E. 2004. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. *Journal of Applied Microbiology* 97:271-284.
- Bover-Cid, S., Torriani, S., Gatto, V., Tofalo, R., Suzzi, G., Belletti, N., Gardini, F. 2009. Relationships between microbial population dynamics and putrescine and cadaverine accumulation during dry fermented sausage ripening. *Journal of Applied Microbiology* 106:1397-1407.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods* 7:335-336.
- Cenci-Goga, B.T., Rossitto, P.V., Sechi, P., Parmegiani, S., Cambiotti, V., Cullor, J.S. 2012. Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of swine and venison (Dama dama) nitrite-free dry-cured sausages. *Meat Science* 90:599-606.

- Chaillou, S., Champomier-Vergés, M-C, Cornet, M., Crutz-Le Coq, A-M., Dudez, A-M., Véronique Martin, Beaufils, S., Darbon-Rongère, E., Bossy, R., Loux, V., Zagorec M. 2005. The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K. *Nature Biotechnology* 23: 1527-1533.
- Cocolin, L., Urso, R., Rantsiou, K., Cantoni, C., Comi, G. 2006. Dynamics and characterization of yeasts during natural fermentation of Italian sausages. *FEMS Yeast Research* 6:692-701.
- Comi, G., Cantoni, C. 1980. I lieviti in insaccati crudi stagionati. *Industrie Alimentari* 19:857-860.
- Comi, G., Citterio, B., Manzano, M., Cantoni, C., Debertoldi, M. 1992. Evaluation and characterization of micrococcal strains in Italian dry fermented sausages. *Fleischwirtschaft* 72:1679-1683.
- Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. Official Journal of the European Union, Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1129&from=EN>
- De Almeida, M.A., Villanueva, N.D.M., Pinto, J.S.D.S., Saldãna, E., Contreras-Castillo, C. J. 2016. Sensory and physicochemical characteristics of low sodium salami. *Scientia Agricola* 73:347-355.
- De Filippis, F., Pennacchia, C., Di Pasqua, R., Fiore, A., Fogliano, V., Villani, F., Ercolini, D. 2013. Decarboxylase gene expression and cadaverine and putrescine production by *Serratia proteamaculans* in vitro and in beef. *International Journal of Food Microbiology* 165:332-338.
- De Vuyst, L., Falony, G., Leroy, F. 2008. Probiotics in fermented sausages. *Meat Science* 1:75-78.
- Di Cagno, R., Chaves Lòpez, C., Tofalo, R., Gallo, G., De Angelis, M., Paparella, A., Hammes, W.P., Gobbetti, M. 2008. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. *Meat Science* 79:224-235.
- Dos Santos, B.A., Campagnol, P.C.B., da Cruz, A.G., Morgano, M.A., Wagner, R., Pollonio, M.A.R. 2015. Is there a potential consumer market for low-sodium fermented sausages?. *Journal of Food Science* 80:1093-1099.
- Drosinos, E.H., Board, R.G. 1995. Microbial and physicochemical attributes of minced lamb: sources of contamination with pseudomonads. *Food Microbiology* 12:189-197.
- Durá, M.A., Flores, M., Toldrà, F. 2004. Effect of *Debaryomyces* spp. on the proteolysis of dry-fermented sausages. *Meat Science* 68:319-328.
- EFSA ANS Panel (EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food), Mortensen A, Aguilar F, Crebelli R, Di Domenico A, Dusemund B, Frutos MJ, Galtier P, Gott D, Gundert-Remy U, Lambre C, Leblanc J-C, Lindtner O, Moldeus P, Mosesso P, Oskarsson A, Parent-Massin D, Stankovic I, Waalkens-Berendsen I, Woutersen RA, Wright M, van den Brandt P, Fortes C, Merino L, Toldrà F, Arcella D, Christodoulidou A, Cortinas Abrahantes J, Barrucci F, Garcia A, Pizzo F, Battacchi D and Younes M, 2017. Scientific Opinion on the re-evaluation of potassium nitrite (E 249) and sodium nitrite (E 250) as food additives. *EFSA Journal* 15 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4786>
- Encinas, J.P., Lopez-Diaz, T.M., Garcia-Lopez, M.L., Otero, A., Moreno, B. 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Science* 54:203-208.
- Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56:297-314.
- Ercolini, D., Federica R., Torrieri, E., Masi, P., Villani, F. 2006. Changes in the spoilage-related microbiota of beef during refrigerated storage under different packaging conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 4663-4671.
- Flores, M., Durá, M.A., Marco, A., Toldrà, F. 2004. Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Science* 68:439-446.

- Fonseca, S., Cachaldora, A., Gomez, M., Franco, I., Carballo, J. 2013. Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiology* 33:77-84.
- Fontana, C., Vignolo, G., Cocconcilli, P.S. 2005. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. *Journal of Microbiological Methods* 63:254-263.
- Galli Volonterio, A. 2005. Microbiologia degli alimenti. Casa editrice Ambrosiana. 303-304.
- García-Varona, M., Santos, E. M., Jaime, I., Rovira, J. 2000. Characterisation of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo. *International Journal of Food Microbiology* 54:189-195.
- Gardini, F., Bover-Cid, S., Tofalo, R., Belletti, N., Gatto, V., Suzzi, G., Torriani, S. 2008. Modeling the aminogenic potential of *Enterococcus faecalis* EF37 in dry fermented sausages through chemical and molecular approaches. *Applied and Environmental Microbiology* 74:2740-2750.
- Gardini, F., Suzzi, G., Lombardi, A., Galgano, F., Crudele, M. A., Andrighetto, C., Schirone, M., Tofalo, R. 2001. A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy. *FEMS Yeast Research* 2:161-167.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J.B., Christensen, A.B., Givskov, M. 2002. Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 78:79-97.
- Grazia, L., Suzzi, G., Romano, P., Giudici, P. 1989. The yeasts of meat products. *Yeast* 5:495-499.
- Greco, M., Mazzette, R., De Santis, E.P.L., Corona, A., Cosseddu, A.M. 2005. Evolution and identification of lactic acid bacteria isolated during the ripening of Sardinian sausages. *Meat Science* 69:733-739.
- Greppi, A., Ferrocino, I., La Storia, A., Rantsiou, K., Ercolini, D., Cocolin, L. 2015. Monitoring of the microbiota of fermented sausages by culture independent rRNA-based approaches. *International Journal of Food Microbiology* 212:67-75.
- Götz, F., Bannerman, T., Schleifer, K.H. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In M. Dworkin (Ed.), *The Prokaryotes* 5-75. New York: Springer Science.
- Hammes, W.P. 2012. Metabolism of nitrate in fermented meats: The characteristic feature of a specific group of fermented foods. *Food Microbiology* 29:151-156.
- Hammes, W.P., Bantleon, A., Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. *FEMS Microbiology Letters* 87:165-173.
- Henderson, L., Irving, K., Gregory, J. 2003. The national diet and nutrition survey: Adults aged 19–64 years. Vol. 3: Vitamin and Mineral Intake and Urinary Analytes. London: HMSO.
- Higgs, J.D. 2000. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Food Science and Technology* 11:85-95.
- Holck, A., Axelsson, L., Mcleod, A., Rode, T.M., Heir, E. 2017. Health and Safety Considerations of Fermented Sausages. *Journal of Food Quality* 1-25.
- Hospital, X.F., Carballo, J., Fernández, M., Arnau, J., Gratacós, M., Hierro, E. 2015. Technological implications of reducing nitrate and nitrite levels in dry-fermented sausages: Typical microbiota, residual nitrate and nitrite and volatile profile. *Food Control* 57:275-81.
- Hospital, X.F., Hierro, E., Fernandez, M. 2012. Survival of *Listeria innocua* in dry fermented sausages and changes in the typical microbiota and volatile profile as affected by the concentration of nitrate and nitrite. *International Journal of Food Microbiology* 153:395-401.
- Hugas, M., Monfort, J.M. 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry* 59:547-554.
- Hui, Y.H., Meunier-Goddik, L., Josephsen, J., Nip, W.K., Stanfield, P.S. 2004. Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology. *CRC Press* 385-414

- Iacumin, L., Comi, G., Cantoni, C. and Cocolin, L. 2006. Ecology and dynamics of coagulase-negative cocci isolated from naturally fermented Italian sausages. *Systematic and Applied Microbiology* 29:480-486.
- Iacumin, L., Manzano, M., Stella, S., Comi, G. 2017. Fate of the microbial population and the physico-chemical parameters of “Sanganel” a typical blood sausages of the Friuli, a north-east region of Italy. *Food Microbiology* 63:84-91.
- ISO 15214:1998. 1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs -Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C.
- ISO 21528-1:2004. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 1: Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A. 2005. Modern food microbiology (7th ed.). New York: Springer Science.
- Kim, H.S., Hur, S.J. 2018. Effect of six different starter cultures on the concentration of residual nitrite in fermented sausages during in vitro human digestion. *Food Chemistry* 239:556-560.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H., de Vos, W.M., 1991. Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3390-3393.
- Lebert, I., Leroy, S., Giammarinaro, P., Lebert, A., Chacornac, J. P., Bover-Cid, S., Vidal-Carou, M.C., Talon, R. 2007. Diversity of microorganisms in environments and dry fermented sausages of small traditional French processing units. *Meat Science* 76:112-122.
- Leroy, F., Verluyten, J., de Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 106:270-285.
- Lucke, F.K. 2000. Fermented Meats. In: Microbiological safety and quality of food, Lund, B., Baird-Parker, A. C., Gould, G.W. (Eds.). 420-444.
- Lundberg, J.O., Carlström, M., Larsen, F.J., Weizberg, E. 2011. Roles of dietary inorganic nitrate in cardiovascular health and disease. *Cardiovascular Research* 89:525-552.
- Neubauer, H., Götz, F. 1996. Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*. *Journal of Bacteriology* 178:2005-2009.
- Paik, H.D., Lee, J.Y. 2014. Investigation of reduction and tolerance capability of lactic acid bacteria isolated from kimchi against nitrate and nitrite in fermented sausage condition. *Meat Science* 97:609-614.
- Pegg, R.B., Shahidi, F. 2000. Nitrite curing of meat. Trumbull: Food & Nutrition Press
- Petrizzelli, A., Osimani, A., Pasquini, M., Clementi, F., Vetrano, V., Paolini, F., Fogliani, M., Micci, E., Paoiloni, A., Tonucci, F. 2016. Trends in the microbial contamination of bovine, ovine and swine carcasses in three small-scale abattoirs in Central Italy: a four-year monitoring. *Meat Science* 111:53-59.
- Pin, C., Garcia de Fernando, G., Ordóñez, J.A. 2002. Effect of modified atmosphere composition on the metabolism of glucose by *Brochothrix thermosphacta*. *Applied and Environmental Microbiology* 68:4441-4447.
- Porto, M.C.W., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O.S., Vitolo, M., Oliveira, R.P.S. 2017. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnology Advances* 35: 361-374.
- Rantsiou, K., Cocolin, L. 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *International Journal of Food Microbiology* 108:255-267.
- Rantsiou, K., Drosinos, E.H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichard, J., Tóth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G., Cocolin, L. 2005. Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated

- from naturally fermented sausages produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology* 22:19-28.
- Rooke, J.A., Flockhart, J.F., Sparks, N.H. 2010. The potential for increasing the concentrations of micro-nutrients relevant to human nutrition in meat, milk and eggs. *The Journal of Agricultural Science* 148:603-614.
- Rouhi, M., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A.M. 2013. Probiotic Fermented Sausage: Viability of Probiotic Microorganisms and Sensory Characteristics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 53: 331-348.
- Sánchez Mainar, M., Stavropoulou, D.A., Leroy, F. 2017. Exploring the metabolic heterogeneity of coagulase-negative staphylococci to improve the quality and safety of fermented meats: a review. *International Journal of Food Microbiology* 247:24-37.
- Santos N.N., Santos-Mendon, R.C., Y., Bolumar, T., Aristoy, M.C., Toldrá, F. 2001. Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 68:199-206.
- Sebranek, J.G., Bacus, J.N. 2007. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat Science* 77:136-147.
- Selgas, M., Garcia, M. 2015. Yeasts in Handbook of Fermented Meat and Poultry, F. Toldrá, Ed., Wiley Blackwell, West Sussex, UK, 2nd edition. 139-146.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S., Myers, R.M. 1989. Attachment of a 40-base pair G+C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of singlebase changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86:232-236.
- Talon, R., Leroy, S. 2006. Latest developments in meat bacterial starters. Chapter 16. In L. M. L. Nollet & F. Toldrá (Eds.), *Advanced technologies for meat processing*. New York: CRC Press/ Taylor and Francis Group. 401-418.
- Talon, R., Leroy, S., Lebert, I. 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. *Meat Science* 77:55-62.
- Talon, R., Leroy-Setrin, S., Fadda, S. 2004. Dry fermented sausages. Chapter 23. In Y. H. Hui, L. Meunier-Goddik, A. S. Hansen, J. Josephsen, W.-K. Nip, & P. S. Stanfield, et al. (Eds.), *Handbook of food and beverage fermentation technology* New York: Marcel Dekker Inc. 397-416.
- Terrell, R.N. 1983. Reducing the sodium content of processed meats. *Food Technology* 37:66-71.
- Toldrá, F. 2006. Chapter 181. Meat Fermentation. *Handbook of Food Science, Technology, and Engineering*, Volume Four Ed by Y. H. Hui CRC Press.
- UNI EN ISO 6888-2:2004. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* And Other Species) - Technique Using Rabbit Plasma Fibrinogen Agar Medium.
- Urso, R., Comi, G. and Coccolin, L. 2006. Ecology of lactic acid bacteria in Italian fermented sausages: isolation, identification and molecular characterization. *Systematic and Applied Microbiology* 29:671-680.
- Wang, X.H., Ren, H.Y., Liu, D.Y., Zhu, W.Y., Wang, W. 2013. Effects of inoculating *Lactobacillus sakei* starter cultures on the microbiological quality and nitrite depletion of Chinese fermented sausages. *Food Control* 32:591-596.
- WHO, Nitrate and nitrite in drinking water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, WorldHealth Organisation, Geneva, Switzerland, 2011.
- Williamson, C.S., Foster, R.K., Stanner, S.A., Buttriss, J.L. 2005. Red meat in the diet. British Nutrition Foundation. *Nutrition Bulletin* 30:323-355.

## **Capitolo IV – Innovazione: *pani di frumento tenero ottenuti con impasti acidi di tipo II***

## 1. Introduzione

### 1.1. *La panificazione: cenni storici*

La panificazione è un'arte antica conosciuta dall'uomo fin dall'antichità. Le prime testimonianze storiche risalgono all'epoca preistorica con la scoperta di una forma rudimentale di panificazione da parte dell'*homo erectus*, mescolando insieme acqua e cereali macinati grossolanamente. Solamente nel 3500 a.C. gli Egizi scoprirono, in modo del tutto casuale, una tecnica di panificazione a partire da impasti a fermentazione spontanea, ottenendo in tal modo un pane del tutto analogo a quello attuale. Dagli Egizi l'arte della panificazione fu trasmessa agli Ebrei, per i quali il pane assunse ben presto un'importanza religiosa, ai greci e successivamente ai romani, per i quali il pane entrò nell'uso quotidiano solamente verso la fine della repubblica romana attorno al 27 a.C. Nell'Impero Romano, il pane era l'alimento base della dieta della maggior parte della popolazione e per questo il suo consumo fu in parte assicurato alla popolazione tramite uno specifico editto che regolamentava e agevolava l'acquisto di frumento. Fu proprio grazie ai Romani che la panificazione divenne una professione vera e propria portando all'apertura dei primi forni pubblici. Fu poi, nell'epoca rinascimentale, che questa arte subì la prima grande evoluzione con l'introduzione del lievito di birra, il quale riducendo notevolmente i tempi di lievitazione e permettendo la produzione di un pane più soffice e leggero, prese in parte il posto del lievito naturale. La panificazione divenne, infine, una pratica industriale nel XVIII – XIX secolo grazie all'introduzione di strumentazioni per la lavorazione meccanica degli impasti e del pane.

### 1.2. *Il pane e altri prodotti a lievitazione naturale*

Il pane, ottenuto dalla fermentazione di un preparato di farina e acqua, è uno dei prodotti fermentati più antichi al mondo e parte integrante dell'alimentazione per molti popoli. Nei paesi dell'Europa del sud e negli Stati Uniti il pane più diffuso è sicuramente quello di farina di frumento, mentre nel resto d'Europa è più diffuso il consumo di pane di farina di segale (Brandt, 2007).

In Europa, circa il 30-50% di pane è prodotto mediante aggiunta di impasto acido e solo in Italia esistono più di 200 diverse tipologie di pane tradizionale (Insor, 2000; Minervini *et al.*, 2012). Molti sono i prodotti da forno, tra cui varie tipologie di pane, inseriti nell'Elenco nazione dei prodotti agroalimentari tradizionali regionali (S.O. n. 176 del 29 luglio 2017), in particolare, tra le varie tipologie di pane tradizionale, alcune sono state insignite del marchio di Indicazione Geografica Protetta (IGP) come Pane casareccio di Genzano (Reg. CE n.

2325 del 24.11.97) e Pane di Matera (Reg. CE n. 160 del 21.02.08), mentre altre sono state dichiarate prodotti con Denominazione di Origine Protetta (DOP) quali il Pane di Altamura (Reg. CE n. 1291 del 18.07.03), il Pane Toscano (Reg. CE n. 303 del 01.03.16) e la Pagnotta del Dittaino (Reg. CE n. 516 del 17.06.09).

Oltre alla produzione di pane a lievitazione naturale, in Italia, esiste una fortissima tradizione legata alla produzione di prodotti da forno come dolci delle ricorrenze e delle festività quali Panettone, Pandoro e Colomba, dolci per la colazione come brioches e cornetti, o prodotti salati come cracker, grissini, pizza ecc. preparati con l'uso di impasto acido.

### 1.3. *Impasto acido*

L'impasto acido, conosciuto anche come lievito naturale o madre acida o dall'inglese *sourdough* è un complesso ecosistema formato da un impasto di acqua e farina, principalmente frumento o segale, caratterizzato dalla presenza di batteri lattici e lieviti responsabili dei processi di acidificazione e lievitazione (De Vuyst & Neysens, 2005; Gobbetti, 1998; Vogel *et al.*, 1999).

L'uso di impasto acido è ampiamente diffuso e comune nella preparazione di molti prodotti da forno e generalmente è utilizzato in alternativa o in combinazione con il lievito industriale; l'uso dell'impasto acido è preferibile rispetto al solo lievito industriale in quanto determina un miglioramento del profilo organolettico del prodotto (Hansen & Schieberle, 2005), prolunga la *shelf life* (Chavan & Chavan, 2011), migliora la sofficità dell'impasto (Arendt *et al.*, 2007) e determina un aumento del valore nutrizionale del prodotto finale (Gobbetti *et al.*, 2014; Poutanen *et al.*, 2009).

Nell'ultimo decennio, l'uso di lievito naturale si è notevolmente affermato e consolidato in relazione al complesso e generalmente apprezzato profilo sensoriale del pane a lievitazione naturale e soprattutto in relazione al particolare valore nutrizionale che l'impasto acido è in grado di apportare al prodotto finale.

In particolare, una recente *review* di Pétel e collaboratori (2017) ha evidenziato la presenza potenziale di 196 composti volatili, identificati negli impasti acidi e nel pane a lievitazione naturale, responsabili del *bouquet* aromatico specifico e caratteristico del prodotto.

D'altro canto, il miglioramento del valore nutrizionale del pane risulta essere un'ulteriore *input* all'utilizzo di lievito naturale. La fermentazione infatti, può ridurre la risposta glicemica dei prodotti da forno, migliorare le

proprietà e la biodisponibilità delle fibre alimentari e delle sostanze fitochimiche, oltre a poter aumentare l'assorbimento di minerali. Inoltre, i batteri lattici possono liberare peptidi, derivati amminoacidici e esopolisaccaridi con potenziali effetti benefici sulla salute del consumatore (Gobbetti *et al.*, 2014).

L'elevato grado di diversificazione degli impasti acidi e le peculiari caratteristiche microbiologiche legate a fattori endogeni, come la composizione chimica della farina, e fattori esogeni, come parametri di processo e ambiente di lavorazione, rendono queste matrici degli ecosistemi microbici molto complessi e diversificati con proprietà intrinseche che si riflettono sulle caratteristiche organolettiche dei prodotti finiti.

### *1.3.1. Caratteristiche degli impasti acidi*

Le proprietà peculiari di un impasto acido sono definite sulla base di parametri tecnologici come *Dough Yield*, potenziale redox, pH, acidità totale titolabile, temperatura, percentuale di inoculo, e di parametri non controllabili come le caratteristiche della farina. Questi parametri, e soprattutto l'interazione di essi, definiscono le caratteristiche microbiologiche dell'impasto acido influenzando notevolmente la diversità e la dinamica microbica.

#### ❖ *Dough Yield (DY)*

Il parametro tecnologico *Dough Yield* indica la consistenza o resa dell'impasto acido, questo parametro definito dalla formula  $DY = [(peso\ della\ farina + peso\ dell'acqua) * 100 / peso\ della\ farina]$  è strettamente correlato alla capacità della farina di assorbire l'acqua, determinando così impasti con consistenza diversa.

In particolare quindi, la quantità di acqua assorbita dalla farina è direttamente proporzionale al valore di DY definito per l'impasto. Il parametro DY è uno dei più importanti in grado di condizionare in modo molto marcato il progredire e l'esito finale del processo fermentativo, influenzando notevolmente la microflora dell'impasto (Minervini *et al.*, 2014; De Vuyst *et al.*, 2014).

In relazione ai valori di DY gli impasti possono essere suddivisi in impasti compatti, caratterizzati da valori compresi tra 150 e 160, impasti semi-liquidi con valori di DY di 200 e impasti liquidi con valori di DY maggiori di 200.

DY e temperatura influenzano notevolmente le caratteristiche sensoriali dell'impasto acido, in relazione alla tipologia e alla quantità di acidi organici prodotti; in particolare, in impasti acidi con bassi valori di DY e

temperature di fermentazione pari a 25-30°C si osserva una maggiore concentrazione di acido acetico, mentre in impasti acidi con valori di DY più elevati e temperature di fermentazione di 35-37 °C si osserva una maggiore concentrazione di acido lattico (Decok & Cappelle, 2005).

#### ❖ *pH*

Il pH dell'impasto acido è un parametro importante che varia in relazione alle condizioni di processo e alla popolazione microbica, generalmente definito in un intervallo compreso tra 3,5 e 4,3 (De Vuyst & Neysens, 2005). Spesso, bassi valori di pH iniziale favoriscono la proliferazione dei lieviti rispetto ai batteri lattici; ad esempio in condizioni di bassa acidità (pH 5,6-5,8) la specie *Lactobacillus sanfranciscensis* mostra maggiore capacità proliferativa rispetto alla specie *Candida humilis*, mentre al contrario in condizioni di pH acido (4,1) alcune specie di batteri lattici risultano totalmente inibite (Brandt *et al.*, 2004).

#### ❖ *Acidità totale titolabile (Total Titratable Acidity- TTA)*

L'acidità totale titolabile di un impasto acido definisce la concentrazione di acidi organici prodotti durante il processo fermentativo, espressa come mL di NaOH 0,1 N necessari per titolare 10 g di impasto acido. In particolare, per la produzione di pane di segale è generalmente richiesto un impasto acido con un valore elevato di acidità totale titolabile mentre per la produzione di pane di frumento è generalmente richiesto un impasto con valore di acidità inferiore (Brandt, 2007).

#### ❖ *Temperatura*

La temperatura di fermentazione influenza in modo molto importante l'ecologia microbica degli impasti acidi risultando inoltre inversamente correlata alla durata della fermentazione.

In generale, mentre i lieviti hanno un *optimum* di temperatura attorno a 25-27 °C, i batteri lattici hanno il loro *optimum* nel range compreso tra 30 e 40°C (Brummer & Lorenz, 1991; Gänzle *et al.*, 1998; Spicher & Stephan, 1999) pertanto, variazioni della temperatura favoriscono lo sviluppo di un gruppo microbico piuttosto che l'altro definendo profili microbici diversi.

#### ❖ *Percentuale di inoculo*

La percentuale di impasto acido utilizzato come inoculo durante il processo di *back-slopping* giornaliero è generalmente compresa tra il 10 e il 40% del peso totale dell'impasto; variazione della quantità di inoculo eseguito può determinare una variazione significativa del profilo microbico dell'impasto acido soprattutto in termini di batteri lattici (Brandt *et al.*, 2004). Ad esempio, con inoculi inferiori al 2% del impasto totale si favorisce la crescita della specie *Lact. sanfranciscensis* rispetto alla specie *C. humilis*, mentre al contrario inoculi prossimi al 50% determinano un'inibizione dei batteri lattici a favore dei lieviti (Brandt *et al.*, 2004).

#### ❖ *Farina*

La farina, utilizzata per la propagazione dell'impasto acido, è un elemento importante nella definizione del profilo microbico del prodotto, questo substrato rappresenta un veicolo di contaminazione in relazione al continuo apporto di nutrienti e microrganismi. La composizione nutrizionale della farina, altamente eterogenea, permette lo sviluppo di molte specie e generi microbici, determinando potenzialmente la variazione del profilo microbiologico dell'impasto acido stesso (De Vuyst *et al.*, 2009).

### *1.3.2. Classificazione degli impasti acidi*

Sulla base della tecnologia di produzione e delle caratteristiche microbiologiche, gli impasti acidi sono classificati in tre diverse tipologie: impasti acidi di tipo I, impasti acidi di tipo II e impasti acidi di tipo III (Böcker *et al.*, 1995; De Vuyst & Neysens, 2005).

#### ❖ *Impasti acidi di tipo I*

Gli impasti acidi di tipo I o impasti acidi tradizionali sono matrici solide o semi-solide caratterizzate dalla necessità di operare continui rinfreschi quotidiani per il mantenimento della vitalità cellulare e dunque dell'attività metabolica e la capacità lievitante. L'impasto acido di tipo I, comunemente utilizzato sia a livello artigianale sia industriale, è prodotto per successivi rinfreschi ad una temperatura di 20-30 °C e si caratterizza per un pH di ~4. Gli impasti acidi di tipo I possono essere ulteriormente classificati in impasti acidi di tipo Ia, Ib e Ic (Stolz, 1999).

Gli impasti acidi di tipo Ia derivano dalla fermentazione naturale dell'impasto acido, questi impasti prevedono una flora microbica particolarmente adattata alla matrice stessa; sono impasti acidi altamente stabili con elevata capacità acidificante e dunque mostrano un'evidente resistenza alle contaminazioni microbiche. L'esempio più importante è il lievito naturale San Francisco caratterizzato dalla specie *Lact. sanfranciscensis* (Kline & Sugihara, 1971). Gli impasti acidi di tipo Ib, a base di farina di grano o segale o una miscela delle due tipologie di farine, sono prodotti attraverso un processo a tre rinfreschi nelle 24 h (*back-slopping*) che permette di ottenere un impasto acido maturo pronto per essere utilizzato. In questi impasti, la stabilità della microflora è mantenuta dai rinfreschi stessi garantendo in questo modo il mantenimento della capacità acidificante e lievitante. Generalmente dominati dalla presenza della specie eterofermentante obbligata *Lact. sanfranciscensis*, in relazione alle condizioni di fermentazione, gli impasti acidi di tipo Ib possono caratterizzarsi per la presenza di altre specie eterofermentanti obbligate e facoltative, di specie omofermentanti obbligate e lieviti (Hammes & Gänzle, 1998; Vogel *et al.*, 1999). Infine, gli impasti acidi di tipo Ic sono impasti prodotti a temperature piuttosto elevate, superiori a 35 °C che si caratterizzano per la presenza delle specie etero- ed omo-fermentanti obbligate e lieviti (Hamad *et al.*, 1992; Hamad *et al.*, 1997).

#### ❖ Impasti acidi di tipo II

Gli impasti di tipo II sono ottenuti da un'unica fase di fermentazione prolungata (da 1 a 4 giorni), alla quale segue lo stoccaggio in ambiente refrigerato per diversi giorni. Sono impasti liquidi o semi-liquidi con un pH <3,5 dopo 24 h di fermentazione a temperature pari o superiori a 30 °C, il loro impiego in campo industriale è soprattutto volto all'acidificazione dell'impasto e all'apporto di composti organici importanti per la definizione del sapore e dell'odore dei prodotti a lievitazione naturale. La prolungata fase di fermentazione, determina una moderata attività metabolica dei batteri lattici normalmente presenti in relazione al perdurare della fase stazionaria di crescita microbica. Gli impasti acidi di tipo II caratterizzati dalla presenza di specie di batteri lattici diverse in relazione ai parametri di fermentazione sfruttati, sono per loro natura poveri di lieviti endogeni e pertanto la lievitazione è favorita dall'uso di lievito commerciale aggiunto al termine della fermentazione (De Vuyst & Neysens, 2005; De Vuyst *et al.*, 2016).

### ❖ Impasti acidi di tipo III

Gli impasti acidi di tipo III sono impasti acidi normalmente essiccati ottenuti a partire da impasti acidi liquidi di tipo II (DY 200), che possono a volte essere forniti anche come impasti acidi liquidi, in relazione alla tecnologia di produzione utilizzata essiccazione (*spray-drying* e *drum-drying*) o stabilizzazione dell'impasto acido liquido tramite pastorizzazione o *cooling* (Decock & Cappelle, 2005). Gli impasti acidi di tipo III sono utilizzati quasi esclusivamente a livello industriale in quanto permettono di ottenere un'elevata standardizzazione del processo produttivo e del prodotto finale. L'acidità dell'impasto di tipo III è direttamente proporzionale al valore di *dough yield* dell'impasto di tipo II di partenza (Spicher & Stefan, 1993).

#### 1.3.3. Dinamica microbica dell'impasto acido

La diversità e la dinamica microbica che si sviluppa in un impasto acido è strettamente legata a parametri tecnologico, come *dough yield* dell'impasto, percentuale di impasto acido usata come inoculo, sale, pH, tensione d'ossigeno, potenziale redox, temperatura di lievitazione, numero di rinfreschi, caratteristiche chimico-fisiche della farina (Hammes *et al.* 1996; Gänzle & Vogel 2003; Gobbetti, *et al.* 2005; Gänzle *et al.* 2007; De Vuyst *et al.* 2009; Minervini *et al.* 2014; De Vuyst *et al.*, 2014; De Vuyst *et al.*, 2016) e a parametri estrinseci come ad esempio eventuali contaminazioni definite dalla farina, dagli ambienti di lavorazione o dalla strumentazione (Minervini *et al.* 2014). In particolare, la stabilità dell'impasto acido è definita soprattutto dal livello di adattabilità delle specie microbiche rispetto gli stress ossidativi, le interazioni microbiche e le variazioni nel contenuto di carboidrati e nutrienti.

Nella fase iniziale di produzione di un impasto acido, la flora microbica è rappresentata dalla popolazione batterica tipica della farina utilizzata e dunque costituita da batteri lattici, batteri Gram-positivi e Gram-negativi Enterobatteriaceae, lieviti e muffe (Onno & Roussel, 1994; Stolz, 1999; Rocha & Malcata, 2012; Minervini *et al.*, 2014). Questa elevata diversità microbica viene persa molto velocemente, dopo circa un giorno di propagazione dell'impasto acido, fatta eccezione per le Enterobatteriaceae (Gobbetti *et al.*, 2016). Con l'aumento progressivo del numero di rinfreschi e dunque dei processi di fermentazione, il pH decresce creando un ambiente idoneo alla proliferazione di batteri lattici e lieviti, fino a raggiungere concentrazioni di  $10^5$ - $10^8$  UFC g<sup>-1</sup> per i lieviti e  $10^6$ - $10^9$  UFC g<sup>-1</sup> rispettivamente, mentre le Enterobatteriaceae vengono totalmente inibite (Lattanzi *et al.*, 2013; Minervini *et al.*, 2012).

Negli impasti acidi l'evoluzione della popolazione di batteri lattici si sviluppa attraverso un processo a tre fasi nelle quali si verifica da prima la dominanza delle specie appartenenti ai generi *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Leuconostoc*, seguita poi dalla dominanza delle specie appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Weissella* ed infine di specie batteriche eterofermentanti obbligate quali *Lact. sanfranciscensis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* (Van der Meulen *et al.*, 2007; Weckx *et al.*, 2010a, 2010b), e solo raramente specie del genere *Leuconostoc* (Rocha & Malcata, 1999; Corsetti *et al.*, 2001; Zotta *et al.*, 2008; Minervini *et al.*, 2012a, 2012b). Sebbene molti possono essere i generi e le specie microbiche presenti negli impasti acidi, le specie di batteri lattici più frequentemente isolate sono state *Lact. sanfranciscensis*, *Lact. plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paralimentarius*, *Lactobacillus alimentarius*, *Lact. fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rossiae*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus delbrueckii*. Mentre specie di lievito più frequentemente isolate negli impasti acidi sono *Saccharomyces cerevisiae*, *Kazachstania exigua*, *C. humilis* e *Pichia kudriavzevii* (Minervini *et al.*, 2017; Van Kerrebroeck *et al.*, 2017). Le interazioni che si stabiliscono tra i batteri lattici e i lieviti sono generalmente legate al metabolismo dei carboidrati o dell'azoto e alla produzione di sostanze stimolanti o inibenti (De Vuyst *et al.*, 2009). Fenomeni di competizione per il substrato, soprattutto, per il maltosio e glucosio possono generarsi inducendo lo sviluppo di una specie rispetto ad un'altra. L'esempio più diffuso di commensalismo negli impasti acidi è quello tra la specie *Lact. sanfranciscensis* e *C. humilis* e/o *K. exigua* (De Vuyst *et al.*, 2009). Nello specifico infatti, la capacità della specie *C. humilis* e/o *K. exigua* di idrolizzare specifici oligosaccaridi della farina in fruttosio, rappresenta un vantaggio evolutivo per la specie *Lact. sanfranciscensis*, la quale è in grado di sfruttare il fruttosio come accettore di elettroni generando così energia (Gobbetti *et al.*, 1995; Stolz *et al.*, 1995). In questo equilibrio, dunque, non solo la specie *Lact. sanfranciscensis* trae beneficio dalla presenza di una delle due specie eumicetiche, ma bensì non si crea competizione per i carboidrati tra le specie, permettendo così il pieno sviluppo sia dei batteri lattici sia dei lieviti (Gobbetti & Corsetti, 1996). Fenomeni di competizione possono inoltre verificarsi tra batteri lattici eterofermentanti obbligati e lievito *S. cerevisiae*, questo lievito infatti capace di metabolizzare il maltosio potrebbe competere con i batteri per la fonte carboniosa generando fenomeni di riduzione del metabolismo batterico. Generalmente però, durante i tradizionali processi di lievitazione naturale non si manifesta mai l'esaurimento dei substrati fermentescibili e dunque tale competizione si manifesta con il raggiungimento di un equilibrio microbico specifico. La regolazione dell'ecosistema degli

impasti acidi è legato in larga parte al metabolismo dei batteri lattici i quali sintetizzando acido acetico, determinano l'acidificazione della matrice e dunque inducono la selezione forzata dei lieviti acido-tolleranti (Suihko & Makinen, 1984). Gli equilibri e le interazioni che si stabiliscono a livello dell'impasto acido dunque ne definiscono le qualità e le peculiarità tipiche di ogni singolo impasto acido.

## 2. Scopo del lavoro

La panificazione è una delle tecniche di fermentazione più antiche conosciute dall'uomo, parte integrante della coltura e della tradizione culinaria di molti paesi del mondo con un significato etico e religioso importante. In particolare, l'impiego di lievito naturale è ampiamente diffuso a livello sia artigianale sia industriale per la produzione di pani tipici (DOP, specialità regionali), dolci delle ricorrenze, cracker, grissini, ecc. Negli ultimi anni, l'uso di lievito naturale è stato rivalutato, dando nuovo vigore e forza alla ricerca in questo campo. Il pane a lievitazione naturale è ampiamente apprezzato e ricercato in relazione a peculiari caratteristiche che lo differenziano notevolmente dal pane a lievitazione industriale, ottenuto con lievito compresso. In particolare, il pane prodotto con impasto acido si caratterizza per l'incremento della *shelf life* del prodotto, in relazione alla produzione di batteriocine e sostanze antifungine (Manini *et al.*, 2016; Hammes and Gänzle, 1998) e all'elevata acidità del prodotto (Messenes & De Vuyst, 2002; Gänzle, 2004; Poutanen *et al.* 2009); per l'incremento delle qualità sensoriali definite da una maggiore elasticità (Clarke *et al.*, 2004; Takeda *et al.*, 2001), umidità interna (Corsetti *et al.*, 2012) e concentrazione di composti volatili (Makhoul *et al.*, 2015) e infine per l'incremento del valore nutrizionale dovuto alla riduzione di composti anti-nutrizionali (Gänzle, 2014; Leenhardt *et al.*, 2005).

Su scala industriale, seppur ampiamente sfruttato, l'uso di impasti acidi semi-solidi (tipo I) risulta dispendioso, in quanto richiede tempo e personale qualificato per la gestione dei rinfreschi giornalieri; per superare questa limitazione, negli ultimi anni è stato introdotto a livello industriale l'uso di impasto acido liquido (tipo II) al fine di ottenere prodotti tradizionali con caratteristiche peculiari e costanti pur sfruttando una nuova tecnologia. In tal contesto, la valutazione della diversità e della dinamica di impasti acidi liquidi ottenuti da impasti acidi tradizionali risulta essenziale al fine di comprendere in primo luogo la stabilità di tale impasto nel passaggio dallo stato solido allo stato liquido e in secondo luogo la fattibilità del processo di panificazione artigianale basato sull'impiego di tale agente lievitante, nonché le proprietà organolettiche del pane prodotto con tale tecnologia.

In relazione a quanto esposto, nel corso del Dottorato, è stato sperimentato l'uso di impasti acidi liquidi per la produzione di pane da sfarinati di frumento tenero macinato a pietra (tipo 2) con l'obiettivo di valutarne l'applicabilità nell'ambito della panificazione artigianale. Nello specifico, sono state realizzate due produzioni di impasto acido liquido a cui sono seguite due panificazioni sperimentali presso il panificio "Il Biroccio" di

Filottrano (AN). In ciascuna prova, sono stati prodotti due impasti acidi liquidi (DY 350) utilizzando come inoculo un impasto acido semi-solido (DY 156) aggiunto al 25% ( $p\ p^{-1}$  dell'impasto), precedentemente realizzato e conservato presso i laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche. Gli impasti acidi liquidi ottenuti sono stati sottoposti a determinazione di pH e acidità totale titolabile e ad enumerazione dei batteri lattici. Tali impasti sono stati, inoltre, caratterizzati microbiologicamente mediante estrazione del DNA e successiva analisi PCR-DGGE. Il pane prodotto utilizzando gli impasti acidi semi-solidi, gli impasti acidi liquidi e il pane di controllo, prodotto con lievito industriale (lievito di birra commerciale), sono stati sottoposti a determinazione di pH, acidità totale titolabile, volume specifico, *texture* ed infine grado di apprezzamento da parte di un *panel* di assaggiatori non addestrati ma familiari al consumo di pane.

.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Disegno sperimentale

Per l'allestimento della prova sperimentale due *batches* di farina di grano tenero (*Triticum aestivum*) macinata a pietra di tipo 2, forniti dalla cooperativa agricola "Il Biroccio" (Filottrano, Ancona, Italia), sono stati usati per l'allestimento di due diverse prove di fermentazione e panificazione condotte separatamente.

Ogni singolo *batch* di farina, da prima caratterizzato, è stato utilizzato per la preparazione di un impasto acido di tipo I, il quale è stato sfruttato per la produzione di due distinti impasti acidi di tipo II, utilizzati nell'allestimento della prova di panificazione.

Tutti i campioni sottoposti ad analisi sono stati analizzati singolarmente e successivamente i dati ottenuti dalla prima e dalla seconda prova sperimentale condotta sono stati considerati assieme e i dati espressi come valori medi  $\pm$  deviazione standard.

#### 3.2. Preparazione degli Impasti Acidi

##### 3.2.1. Impasto acido di tipo I

L'impasto acido di tipo I già presente nel laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, precedentemente sottoposto a caratterizzazione microbiologica e chimico-fisica, è stato sottoposto a rinfreschi settimanali per il mantenimento dell'attività metabolica del consorzio microbico. Per l'allestimento della presente prova sperimentale, l'impasto acido di tipo I (DY 156), denominato S<sub>I</sub>, è stato sottoposto a rinfreschi giornalieri per 7 giorni al fine di ottenere un'elevata e costante attività lievitante ed acidificante.

Il rinfresco è stato condotto con la tecnica del *back-slopping*, che prevede l'inoculo di una porzione di impasto acido di tipo I in un nuovo impasto di acqua minerale naturale a temperatura ambiente e farina di frumento tenero di tipo 2. Giornalmente, infatti, quantitativi progressivamente crescenti di impasto acido di tipo I (da 100 g a 600 g) sono stati inoculati in impasti aventi quantità equivalenti di farina (rapporto 1:1 farina e impasto acido) e quantità dimezzate di acqua minerale naturale (rapporto 0,5:1 acqua e impasto acido).

L'impasto, lavorato manualmente per 5-10 minuti, è stato riposto in un contenitore di vetro opportunamente rivestito di alluminio e lasciato fermentare a temperatura ambiente,  $\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ , per circa 6-8 h, fino al raddoppio della massa dell'impasto acido di tipo I stesso. A seguito della fermentazione l'impasto è stato mantenuto a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  fino al rinfresco successivo.

### 3.2.2. Impasto acido di tipo II

Per la preparazione degli impasti acidi di tipo II, denominati  $S_{II}$ , sono stati allestiti 4 fermentatori da laboratorio (2L) (Fermentatore Biostat®-B, B.Braun, Biotech International, Melsungen, Germania) al fine di ottenere impasti acidi di tipo II, con un volume totale di 1 L e un valore di *dough yield* di 350, mantenendo costanti le condizioni di temperatura ed agitazione.

A tal fine, per ogni prova sperimentale allestita separatamente 250 g ( $25\% \text{ p p}^{-1}$ ) di impasto acido di tipo I sono stati posti in due diversi fermentatori al fine di ottenere due impasti acidi di tipo II ( $S_{IIa}$ ,  $S_{IIb}$ ). In dettaglio, ogni fermentatore è stato allestito aggiungendo 250 g di impasto acido di tipo I, 126 g di farina di frumento tenero macina a pietra di tipo 2 e 624 g di acqua minerale natura a temperatura ambiente; la fermentazione è stata condotta ad una temperatura costante di  $30^{\circ}\text{C}$  e un'agitazione costante di 300 rpm per 96 h.

### 3.3. Panificazione

La panificazione è stata condotta presso la cooperativa agricola "Il Biroccio" da personale esperto e qualificato secondo le modalità comunemente utilizzate nella panificazione artigianale.

Tutti gli impasti prodotti sono stati lavorati meccanicamente con un'impastatrice professionale per  $\sim 10$  min ad elevata velocità, l'impasto così ottenuto è stato successivamente lavorato a mano al fine di ottenere filoni dal peso di 300 g, fatti lievitare per tempi variabili in apposite celle di lievitazione a condizioni controllate di temperatura ed umidità ( $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  e 70% UR).

In dettaglio 4 diverse tesi sperimentali sono state utilizzate per la preparazione del pane:

- ✓ Tesi a\_ pane prodotto con l'utilizzo del  $25\% (\text{p p}^{-1})$  di impasto acido di tipo II ( $S_{IIa}$ ) addizionato al  $2\% (\text{p p}^{-1})$  di lievito industriale. Impasto lievitato per  $\sim 1\text{ h}$ .

- ✓ Tesi b\_ pane prodotto con l'utilizzo del 25% ( $p\ p^{-1}$ ) di impasto acido di tipo II ( $S_{IIb}$ ) addizionato al 2% ( $p\ p^{-1}$ ) di lievito industriale. Impasto lievitato per ~1h.
- ✓ Tesi c\_ pane prodotto con l'utilizzo del 25% ( $p\ p^{-1}$ ) di impasto acido di tipo I ( $S_I$ ). Impasto lievitato per ~5h.
- ✓ Tesi d\_ pane prodotto con l'utilizzo del 2% ( $p\ p^{-1}$ ) di lievito industriale. Impasto sottoposto a lievitazione di ~1h.

Tutto il pane, prodotto senza aggiunta di NaCl, è stato sottoposto a cottura in forni industriali (Mod. Ecomondial, Mondial Forni, Verona, Italy) per 10 min a 200 °C e successivamente a 220 °C per 45 minuti.

Il pane è stato campionato direttamente presso l'azienda a seguito della cottura e trasferito in laboratorio a temperatura ambiente; le successive analisi sono state condotte entro 5h dal campionamento.

### 3.4. *Analisi chimiche e reologiche sulla farina*

I due lotti di farina di frumento tenero di tipo II utilizzati nelle prove sperimentali sono stati entrambi sottoposti ad analisi chimiche e reologiche presso un laboratorio accreditato esterno.

Per ogni campione, analizzato in duplicato è stato definito: i) l'indice di caduta con il metodo standard internazionale (UNI-ISO 2171: 2010), ii) il contenuto in ceneri secondo la metodica AOAC, 920.153, ii) l'umidità mediante Termobilancia "Buhler" (Buhler spa, Winnipeg, Canada), iv) il contenuto proteico mediante analizzatore Infratec 1275 (Foss Italia, Padova, Italia). Le farine sono state, inoltre, sottoposte ad analisi reologiche secondo metodi standard internazionali per la determinazione di: i) indice farinografico di stabilità di Brabender mediante farinografo di Brabender (Farinograph-E, Brabender, Duisburg, Germania) (UNI EN ISO 5530-1: 2015); ii) indice alveografico utilizzando l'alveografo di Chopin (alveo-consiste in alveolink NG, Chopin, Villeneuve-la-Garenne, Francia) (UNI EN ISO 227971: 2008), iii) proprietà di gelatinizzazione dell'amido attraverso il Visco-amilografo (Micro visco-amylograph, Brabender, Duisburg, Germania) (UNI 10872: 2000).

### 3.5. *Conte vitali in piastra*

Al fine di valutare la vitalità cellulare dell'impasto acido di tipo I e l'evoluzione microbica dell'impasto acido di tipo II sono state allestite conte vitali in piastra su terreno specifico *Sourdough Bacteria* modificato (mSDB),

in accordo con quanto descritto da Vogel e collaboratori (1994). Il terreno, specifico per l'enumerazione dei lattobacilli, mostra un'elevata specificità per la specie *Lact. sanfranciscensis*. La composizione del terreno utilizzato è di seguito riportata:

- ✓ 1,8% Agar
- ✓ 0,05% Cisteina-HCl
- ✓ 0,2% Citrato di ammonio
- ✓ 0,5% Citrato di diammonio
- ✓ 0,2% Estratto di carne
- ✓ 0,7% Estratto di lievito
- ✓ 15% Estratto di lievito fresco (FYE)
- ✓ 0,25% Fosfato di potassio triidrato
- ✓ 0,7% Fruttosio
- ✓ 0,7% Glucosio
- ✓ 0,7% Maltosio
- ✓ 0,5% Sodio acetato triidrato
- ✓ 0,2% Sodio gluconato
- ✓ 0,001% Solfato di ferro eptaidrato
- ✓ 0,02% Solfato di manganese eptaidrato
- ✓ 0,005% Solfato di manganese tetraidrato
- ✓ 1% Triptone
- ✓ 0,1% Tween 80

Il terreno è stato portato ad un pH finale di 5,6 con acido lattico al 85% e successivamente autoclavato a 121 °C per 15 minuti, a seguito del trattamento termico il terreno è stato aggiunto di cicloesimide in ragione di 0,1g L<sup>-1</sup> in etanolo.

In dettaglio, per la preparazione dell'estratto di lievito fresco, una sospensione al 25% di lievito fresco (lievito di birra commerciale) in 1000 mL di acqua distillata è stata autoclavata e successivamente lasciata decantare

overnight a 4°C. Il surnatante così ottenuto è stato successivamente aliquotato in provette *Falcon* da 50 mL, centrifugato ed aggiunto nel terreno di coltura prima della sterilizzazione.

Per l'allestimento delle conte vitali in piastra, 10 g di impasto acido di tipo I e 10 mL di impasto acido di tipo II, rispettivamente a 0 e 96 h di fermentazione, sono stati aggiunti di 90 mL di soluzione acquosa peptonata sterile (0,1 % peptone, p v<sup>-1</sup>) ed omogenati con un omogeneizzatore peristaltico Stomacher 400 Circulator (International PBI, Milano, Italia) per 2 minuti a 260 rpm. 1 mL diretto di omogenato è stato dunque utilizzato per l'allestimento di diluizioni scalari decimali in soluzione acquosa peptonata sterile e aliquote di 100 µL di ciascuna diluizione decimale sono state quindi seminate in doppio su terreno mSDB incubato a 37 °C per 24 – 48 h.

### 3.6. Allestimento dei bulk di colonia

Per la valutazione della comunità batterica, le piastre di terreno mSDB presentanti un numero di colonie comprese tra 30 e 300 (alta diluizione\_A) e presentanti colonie confluenti (bassa diluizione\_B) sono state selezionate ed utilizzate per l'allestimento di *bulk* di colonia sulla base del metodo descritto per la prima volta da Ercolini e collaboratori nel 2001 e successivamente modificato da Garofalo e colleghi nel 2015.

Le colonie presenti sulle piastre ad alta e bassa diluizione sono state raccolte con 1,5 mL di soluzione sterile contenente il 50% di NaCl (0,85% p v<sup>-1</sup>) e il 50% di glicerolo (99,5%) con l'ausilio di un'ansa ad L sterile monouso. La sospensione cellulare così ottenuta è stata raccolta con l'ausilio di pipette monouso, trasferita in provette sterile, conservata a -20 °C e successivamente sottoposta ad estrazione del DNA cellulare ed analisi molecolari.

### 3.7. Determinazione del pH

La misurazione del pH dell'impasto di tipo I, dell'impasto acido di tipo II a 0 e 96 h di fermentazione e del pane prodotto è stata condotta con pH-metro con elettrodo solido HI2031 (modello 300, Hanna Instruments, Padova, Italia).

Tutte le misurazioni sono state ripetute in triplo ed espresse come media ± deviazione standard.

### 3.8. Determinazione dell'acidità totale titolabile (Total titratable acidity-TTA)

Per la determinazione dell'acidità totale titolabile, 10 g di impasto acido di tipo I e di pane e 10 mL di impasto acido di tipo II a 0 e 96 h di fermentazione sono stati posti in un *becker* e addizionati di 90 mL di acqua deionizzata. La sospensione così ottenuta, omogeneizzata con un agitatore magnetico, è stata titolata con NaOH 0,1 N, fino al raggiungimento di un valore di pH pari a 8,3 (Minervini *et al.*, 2012).

Il valore di acidità titolabile totale è stato dunque espresso come mL di NaOH 0,1 N utilizzati.

### 3.9. Estrazione del DNA microbico

#### 3.9.1. Estrazione del DNA totale da matrice

Il DNA microbico totale è stato estratto direttamente dall'omogenato ottenuto per la farina e gli impasti acidi di tipo I e II, utilizzando il kit commerciale *PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit* (Mo Bio laboratories, Carlsbad, USA) seguendo il protocollo operativo specifico fornito dalla ditta costruttrice.

#### 3.9.2. Estrazione del DNA batterico da bulk di colonia

L'estrazione del DNA batterico da *bulk* di colonia è stata condotta sulla base del protocollo esplicito nel capitolo II, paragrafo 3.7.3 della presente tesi, secondo la metodica descritta da Hynes e collaboratori (1992) e successivamente modificata da Osimani e colleghi nel 2015.

### 3.10. Analisi PCR-DGGE

L'analisi PCR-DGGE dei campioni è stata allestita analogamente a quanto descritto nel paragrafo 3.10 del capitolo II della presente tesi, usando i *primers* universali 338f<sub>GC</sub> e 518r, rispettando le condizioni precedentemente descritte.

In entrambe le prove allestite, i campioni di DNA estratto direttamente dalla matrice degli impasti acidi di tipo II (S<sub>IIa</sub> e S<sub>IIb</sub>) a 0 e 96h di fermentazione, allestiti nei due diversi fermentatori, sono stati uniti ed analizzati in *pool*. I campioni sono stati pertanto rinominati come S<sub>II0</sub> (*pool* dei campioni S<sub>IIa0</sub> e S<sub>IIb0</sub>) per quanto concerne il campionamento eseguito a 0h di fermentazione, al momento dell'allestimento del fermentatore, e S<sub>II96</sub> (*pool*

dei campioni S<sub>IIa</sub>96 e S<sub>IIb</sub>96) per il campionamento a 96h di fermentazione. Analogamente anche i *bulk* cellulari, ottenuti dalle conte vitali in piastra, sono stati uniti al fine di ottenere una valutazione complessiva dalla popolazione microbica. A tal fine, il DNA estratto dai *bulk* cellulari dei campioni S<sub>IIa</sub>0 e S<sub>IIb</sub>0 ottenuti dalle piastre ad alta diluizione è stato unito ed analizzato in pool con il codice identificativo BS<sub>II</sub>0A, mentre il DNA ottenuto dalle piastre a bassa diluizione è stato identificato con il codice BS<sub>II</sub>0B. Analogamente, per i *bulk* cellulari dei campioni S<sub>IIa</sub>96 e S<sub>IIb</sub>96 il DNA estratto e unito è stato identificato come BS<sub>II</sub>96A (*bulk* ottenuti dalle piastre ad alta diluizione) e BS<sub>II</sub>96B (*bulk* ottenuti dalle piastre a bassa diluizione).

### 3.11. *Analisi del pane*

Il pane prodotto sulla base delle tesi descritte nel paragrafo 3.3 allestite nelle due diverse prove sperimentali è stato analizzato in *pool*.

In dettaglio, con tesi “AB” sono stato identificato il pane prodotto sulla base delle tesi “a” e “b” nella prima e nella seconda prova di panificazione; con tesi “C” è stato identificato il pane prodotto sulla base della tesi “c”, unendo le due prove di panificazione; con tesi “D” è stato identificato il pane prodotto sulla base della tesi “d” nella prima e seconda prova di panificazione.

#### 3.11.1. *Analisi del pH e dell'acidità totale titolabile*

L'analisi del pH e dell'acidità totale titolabile è stata eseguita come descritto nel paragrafo 3.7 e 3.8 rispettivamente, per tutti i pani prodotti nella sperimentazione.

#### 3.11.2. *Determinazione volume specifico*

Il pane prodotto dopo circa 30 minuti dal suo completo raffreddamento è stato sottoposto a determinazione del peso, mediante bilancia digitale da laboratorio, e a determinazione del volume mediante il metodo *Rapeseed displacement* AACC 10-05.01 (AACC, 2000).

In dettaglio, per la determinazione del volume, la pagnotta di pane è stata posta in un *becher* graduato da 5 L e coperta completamente da semi di cime di rapa fino al livello massimo; a questo punto la pagnotta è stata tolta dal *becher* ed è stato determinato il volume di semi di cime di rapa presenti nel contenitore. Per differenza

è stato da prima definito il volume del pane e successivamente è stato definito il volume specifico, espresso come mL g<sup>-1</sup>, calcolato come rapporto tra volume e peso del pane.

Per ogni tesi analizzata, la determinazione del volume specifico è stata eseguita su diverse pagnotte.

### 3.11.3. *Analisi della texture*

La *texture* di tutti i pani prodotti è stata misurata con analizzatore CT3-4500 *texture analyzer* (Brookfield Engineering Laboratories INC, Middleboro MA, USA) dotato di sonda per il pane da 36 mm di diametro, in base al metodo AACC 74-09.01 (AACC, 2000). L'analisi, condotta entro 2-6 h dal raffreddamento del pane, è stata eseguita su una fetta con uno spessore di circa 25 mm, ottenuta nella parte centrale del filone di pane. Le singole fette posizionate tra la cella di carico (4500 g) e la base di fissaggio dello strumento, sono state analizzate nella parte centrale in triplicato con un limite di compressione del 40%, con una profondità di compressione di 10 mm e una velocità di compressione di 1,6 mm s<sup>-1</sup>.

Per ogni tesi sperimentale sono state analizzate due fettine di pane ottenute da tre diverse pagnotte.

### 3.11.4. *Analisi sensoriali*

L'analisi sensoriale, eseguita entro 6 h dal raffreddamento del pane, è stata condotta sulla base del *consumer test* proposto da Svensson (2012) e successivamente applicato da Mariotti e collaboratori (2014). Per l'analisi sono stati coinvolti 9 operatori non addestrati, familiari al consumo di pane, ai quali è stato chiesto di esprimere un giudizio di gradimento (*global liking*) complessivo compreso tra 1 e 9 (Peryam & Pilgrim, 1957).

## 3.12. *Analisi statistica*

I dati relativi a pH e acidità totale titolabile degli impasti acidi di tipo I e di tipo II, così come i dati relativi a pH, acidità totale titolabile, *texture*, volume specifico e *global liking* del pane prodotto sono stati confrontati mediante analisi della varianza ad un via (ANOVA) sulla base del Tukey test ( $\alpha = 0,05$ ). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il *software* Statistica 7 (StatSoft, Dell, Round Rock, Texas, Stati Uniti).

## 4. Risultati

### 4.1. Caratterizzazione chimica e reologica della farina

La caratterizzazione chimica e reologica dei due *batches* di farina di frumento tenero di tipo 2 macinata a pietra utilizzati nell'allestimento delle prove sperimentali in studio sono mostrati nella Tabella IV.1.

**Tabella IV.1.** Caratterizzazione della farina utilizzata nelle due prove sperimentali allestite.

|                                                      | Farina<br>1 <sup>a</sup> prova | Farina<br>2 <sup>a</sup> prova |
|------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Umidità (%)                                          | 11,8                           | 11,9                           |
| Contenuto proteico (% s.s.)                          | 14,7                           | 14,9                           |
| Ceneri (%)                                           | 0,98                           | 1,00                           |
| Alveogramma di Chopin                                |                                |                                |
| W (J)                                                | 331                            | 237                            |
| P/L (mm H <sub>2</sub> O mm <sup>-1</sup> )          | 1,16                           | 0,68                           |
| Farinogramma Brabender                               |                                |                                |
| Assorbimento acqua (%)                               | 65,8                           | 66                             |
| Consistenza (UF)                                     | 515                            | 502                            |
| Sviluppo (min)                                       | 7                              | 7,1                            |
| Stabilità (min)                                      | 16,6                           | 9,2                            |
| Grado di rammollimento (10 min dall'inizio) (UF)     | 8                              | 19                             |
| Grado di rammollimento (12 min dopo il massimo) (UF) | 39                             | 62                             |
| Numero di qualità farinografica                      | 165                            | 113                            |
| Viscosità massima (Amilogramma Brabender) (UA)       | 825                            | 797                            |
| Indice di caduta (sec)                               | 357                            | 346                            |

W: lavoro espresso in Joule (J); P/L: tenacità dell'impasto/estensibilità dell'impasto; UF: unità farinografiche o unità brabender; UA: unità amilografiche.

Le farine utilizzate nella propagazione dell'impasto acido di tipo I, nella preparazione degli impasti acidi di tipo II e nelle prove di panificazione risultano tra loro comparabili per quanto riguarda l'umidità, il contenuto in proteine e contenuto percentuale in ceneri, mentre sembrano differire in merito alle proprietà plastiche identificate dall'alveogramma di Chopin. Complessivamente, il buon grado di assorbimento dell'acqua e di stabilità dell'impasto rendono queste le farine adatte alla panificazione e dunque consone per l'allestimento delle prove sperimentali.

### 4.2. Caratterizzazione degli impasti acidi

I risultati della caratterizzazione degli impasti acidi di tipo I e di tipo II utilizzati nell'allestimento nella sperimentazione, considerando enumerazione della popolazione di batteri lattici, determinazione del pH e dell'acidità totale titolabile, sono mostrati in Tabella IV.2.

L'impasto acido di tipo I utilizzato nella sperimentazione come inoculo per la realizzazione degli impasti acidi di tipo II, è stato caratterizzato per un valore di pH medio pari a 3,97, un'acidità totale titolabile media pari a 9,8 e una carica di batteri lattici che si attesta attorno a  $9,23 \log \text{UFC g}^{-1}$ .

Contestualmente, la caratterizzazione dell'impasto acido di tipo II ha permesso di evidenziare un decremento del pH progressivo e statisticamente significativo nelle prime 72h di fermentazione, passando da un valore medio di 3,83 a 0h a un valore medio di 3,54 a 72h. Il pH subisce infine un incremento statisticamente significativo al termine della fermentazione, tornando a valori prossimi e non dissimili al valore di pH registrato all'inizio del processo fermentativo.

Analogamente, la determinazione dell'acidità totale titolabile dell'impasto acido di tipo II è stata caratterizzata da un incremento di acidi organici nelle prime 72h di fermentazione evidenziato dall'aumento dell'acidità totale titolabile. Al termine del processo fermentativo, l'acidità titolabile media mostra invece un lieve decremento che non risulta statisticamente significativo rispetto al valore medio identificato a 72h. Infine, l'impasto acido di tipo II è stato caratterizzato da una carica microbica di batteri lattici con valore medio attorno a  $9 \log \text{UFC L}^{-1}$  dopo 96h di fermentazione partendo da una carica media di  $\sim 8,71 \log \text{UFC L}^{-1}$  nel momento in cui è stato allestito il fermentatore per la realizzazione dell'impasto acido di tipo II stesso.

**Tabella IV.2.** Enumerazione dei lattobacilli, determinazione del pH e dell'acidità totale titolabile dell'impasto acido di tipo I e degli impasti acidi di tipo II a 0h e 96h di fermentazione.

|                   | pH                   | TTA<br>mL NaOH 0,1N | Conte<br>$\log \text{UFC g}^{-1} \text{ o } \text{L}^{-1}$ |
|-------------------|----------------------|---------------------|------------------------------------------------------------|
| S <sub>I</sub>    | $3,97 \pm 0,18$      | $9,8 \pm 0,54$      | $9,23 \pm 0,01$                                            |
| S <sub>II0</sub>  | $3,83 \pm 0,12^a$    | $5,5 \pm 0,79^c$    | $8,71 \pm 0,06$                                            |
| S <sub>II24</sub> | $3,68 \pm 0,05^{bc}$ | $8,5 \pm 0,23^b$    | nd                                                         |
| S <sub>II48</sub> | $3,62 \pm 0,06^{cd}$ | $9,7 \pm 0,54^{ab}$ | nd                                                         |
| S <sub>II72</sub> | $3,54 \pm 0,19^d$    | $11,0 \pm 0,25^a$   | nd                                                         |
| S <sub>II96</sub> | $3,78 \pm 0,04^{ab}$ | $10,3 \pm 1,47^a$   | $9,08 \pm 0,13$                                            |

S<sub>I</sub>: impasto acido di tipo I; S<sub>II0</sub>: impasto acido di tipo II a 0h di fermentazione; S<sub>II24</sub>: impasto acido di tipo II a 24h di fermentazione; S<sub>II48</sub>: impasto acido di tipo II a 48h di fermentazione; S<sub>II72</sub>: impasto acido di tipo II a 72h di fermentazione; S<sub>II96</sub>: impasto acido di tipo II a 96h di fermentazione. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative tra i campioni secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.3. Analisi PCR-DGGE

I profili DGGE ottenuti dall'analisi della regione V3 del gene codificante per il 16S rDNA amplificata con i primers 338f<sub>GC</sub>-518r del DNA batterico estratto direttamente dalla matrice della farina, dell'impasto acido di tipo I, degli impasti acidi di tipo II e dai *bulk* di colonia raccolti sono mostrati nella Figura IV.1 per la prima prova sperimentale allestita e nella Figura IV.2 per la seconda prova sperimentale. I risultati degli allineamenti condotti sulla piattaforma BLAST delle sequenze di DNA ottenute dal sequenziamento delle bande DGGE selezionate ed excise dal gel sono mostrati in Tabella IV.3.

Dall'analisi PCR-DDGE di entrambi i *batches* di farina utilizzati per le prove sperimentali, si evidenzia l'assenza di DNA batterico e la sola presenza di DNA eucariotico della specie *Triticum aestivum*. Inoltre, dall'analisi del DNA estratto dalle matrici e dai *bulk* di colonia degli impasti acidi di tipo I e II, si evidenzia la presenza di una tipica popolazione batterica rappresentata dalla specie *Lact. brevis* e dai membri del gruppo microbico *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius*. Il sequenziamento ha mostrato, inoltre, una totale omologia del profilo microbico degli impasti acidi di tipo I e di tipo II utilizzati nelle due diverse prove sperimentali, già in parte mostrata dai profili visualizzati sul gel DGGE stesso, nel quale si evidenzia un'elevatissima omologia dei profili.

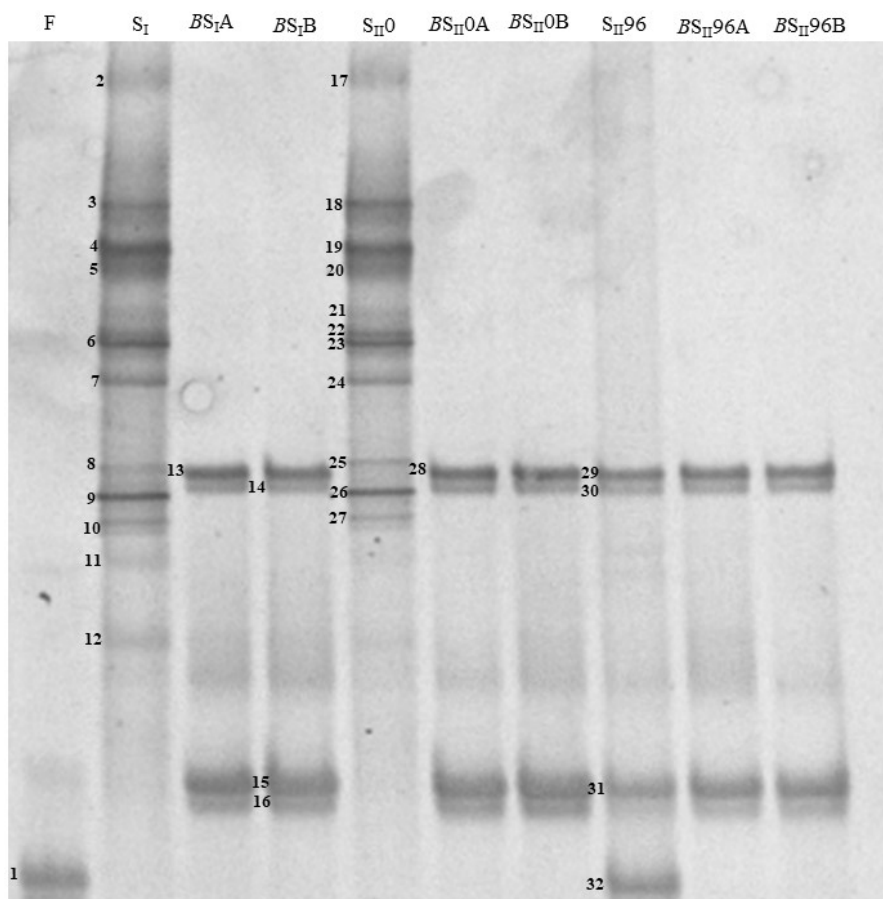


**Figura IV.1.** Profilo DGGE del DNA batterico estratto nella prima prova sperimentale, dai *bulk* di colonia e dalla matrice dei campioni di: farina (F), impasto acido di tipo I ( $S_I$ ), impasto acido di tipo II a 0h di fermentazione ( $S_{II0}$ ) ed impasto acido di tipo II a 96h di fermentazione ( $S_{II96}$ ).

*Lanes*  $BS_I A$  e  $BS_I B$ ) DNA estratto dai *bulk* ottenuti dalle colonie raccolte nelle piastre di mSDB agar allestite per l'impasto acido di tipo I, aventi rispettivamente alta e bassa diluizione. *Lanes*  $BS_{II0} A$  e  $BS_{II0} B$ ) DNA estratto dai *bulk* ottenuti dalle colonie raccolte nelle piastre di mSDB agar allestite per l'impasto acido di tipo II a 0h di fermentazione, aventi rispettivamente alta e bassa diluizione. *Lanes*  $BS_{II96} A$  e  $BS_{II96} B$ ) DNA estratto dai *bulk* ottenuti dalle colonie raccolte nelle piastre di mSDB agar allestite per l'impasto acido di tipo II a 96h di fermentazione, aventi rispettivamente alta e bassa diluizione.

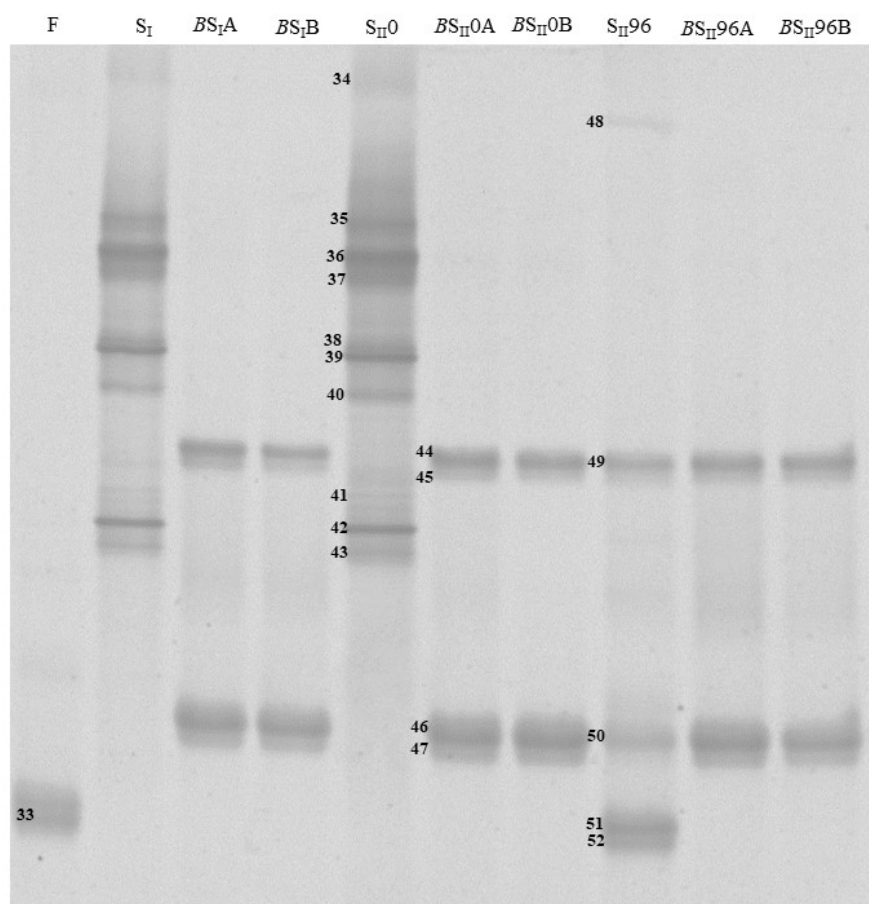


Figura IV.2. Profilo DGGE del DNA batterico estratto nella seconda prova sperimentale, dai *bulk* di colonia e dalla matrice dei campioni di: farina (F), impasto acido di tipo I ( $S_I$ ), impasto acido di tipo II a 0h di fermentazione ( $S_{II0}$ ) ed impasto acido di tipo II a 96h di fermentazione ( $S_{II96}$ ).

*Lanes*  $BS_I A$  e  $BS_I B$ ) DNA estratto dai *bulk* ottenuti dalle colonie raccolte nelle piastre di mSDB agar allestite per l'impasto acido di tipo I, aventi rispettivamente alta e bassa diluizione. *Lanes*  $BS_{II0} A$  e  $BS_{II0} B$ ) DNA estratto dai *bulk* ottenuti dalle colonie raccolte nelle piastre di mSDB agar allestite per l'impasto acido di tipo II a 0h di fermentazione, aventi rispettivamente alta e bassa diluizione. *Lanes*  $BS_{II96} A$  e  $BS_{II96} B$ ) DNA estratto dai *bulk* ottenuti dalle colonie raccolte nelle piastre di mSDB agar allestite per l'impasto acido di tipo II a 96h di fermentazione, aventi rispettivamente alta e bassa diluizione.

**Tabella IV.3.** Risultati del sequenziamento delle bande DGGE excise dal gel.

| Banda | Closest relative                       | % Ident. <sup>a</sup> | Acc. nu. <sup>b</sup> |
|-------|----------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 1     | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 87                    | HG670306              |
| 2     | <i>Lactobacillus brevis</i>            | 96                    | JF763842              |
| 3     | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 99                    | KX648974              |
| 4     | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ592713              |
| 5     | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 87                    | HG670306              |
| 6     | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ614403              |
| 7     | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 8     | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 9     | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 10    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 98                    | LC063166              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 98                    | AB626063              |
| 11    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 12    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 13    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 98                    | LC063166              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 98                    | AB626063              |
| 14    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 99                    | KX648974              |
| 15    | <i>Lactobacillus brevis</i>            | 99                    | JN863616              |
| 16    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 99                    | KX648974              |
| 17    | <i>Lactobacillus brevis</i>            | 96                    | JF763842              |
| 18    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 99                    | KX648974              |
| 19    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ614403              |
| 20    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 87                    | HG670306              |
| 21    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ592713              |
| 22    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ614403              |
| 23    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ614403              |
| 24    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 25    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 26    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 27    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 98                    | LC063166              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 98                    | AB626063              |
| 28    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 98                    | LC063166              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 98                    | AB626063              |
| 29    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 98                    | LC063166              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 98                    | AB626063              |
| 30    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 99                    | KX648974              |
| 31    | <i>Lactobacillus brevis</i>            | 99                    | JN863616              |
| 32    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 87                    | HG670306              |
| 33    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 87                    | HG670306              |
| 34    | <i>Lactobacillus brevis</i>            | 96                    | JF763842              |
| 35    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 99                    | KX648974              |
| 36    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ614403              |
| 37    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 87                    | HG670306              |
| 38    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ614403              |
| 39    | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast   | 99                    | KJ614403              |
| 40    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 41    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 42    | <i>Triticum aestivum</i> mitochondrion | 99                    | GU985444              |
| 43    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 98                    | LC063166              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 98                    | AB626063              |
| 44    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |
|       | <i>Lactobacillus alimentarius</i>      | 99                    | KX648974              |
| 45    | <i>Lactobacillus paralimentarius</i>   | 99                    | JN863628              |

|    |                                      |    |          |
|----|--------------------------------------|----|----------|
|    | <i>Lactobacillus alimentarius</i>    | 99 | KX648974 |
| 46 | <i>Lactobacillus brevis</i>          | 96 | JF763842 |
| 47 | <i>Lactobacillus paralimentarius</i> | 99 | JN863628 |
|    | <i>Lactobacillus alimentarius</i>    | 99 | KX648974 |
| 48 | Failed                               |    |          |
| 49 | <i>Lactobacillus paralimentarius</i> | 99 | JN863628 |
|    | <i>Lactobacillus alimentarius</i>    | 99 | KX648974 |
| 50 | <i>Lactobacillus brevis</i>          | 99 | JN863616 |
| 51 | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast | 87 | HG670306 |
| 52 | <i>Triticum aestivum</i> chloroplast | 87 | HG670306 |

<sup>a</sup> Percentuale di identità tra la sequenza ottenuta dal sequenziamento e la sequenza nucleotidica relativa alla specie identificata dall'allineamento nel database GenBank.

<sup>b</sup> Accession number relativo ad ogni specie identificata attraverso il BLAST.

#### 4.4. Caratterizzazione del pane

La caratterizzazione del pane prodotto sulla base delle tesi sperimentali saggiate, relativamente a pH, acidità totale titolabile, *texture*, volume specifico e gradimento complessivo, è mostrata in Tabella IV.4.

Dall'analisi del pH si evince una netta differenza statistica tra le tesi in studio, in particolare il pane prodotto con l'uso di impasto acido di tipo I risulta essere il più acido con un valore medio pari a 4,51. L'uso di impasto acido di tipo II induce la produzione di un pane nettamente meno acido con un pH medio di 5,47 rispetto al pane prodotto con l'impasto acido di tipo I. Infine, il pane prodotto con l'uso esclusivo di lievito industriale mostra un valore di pH medio pari a 5,79 che risulta statisticamente più alto rispetto ai valori di pH ottenuti con l'uso di impasto acido di tipo I e II.

Analogamente a quanto descritto per il pH anche l'acidità totale titolabile dei pani in studio ha mostrato differenze significative; il pane caratterizzato dal più elevato valore di acidità totale titolabile è stato quello prodotto sulla base della tesi c, prodotto previo utilizzo di impasto acido di tipo I, con un valore medio pari a 7,25 mL di NaOH 0.1N. L'acidità totale titolabile è risultata nettamente inferiore per i pani prodotti con impasto acido di tipo II, con valore medio di 3,77 mL di NaOH 0.1N e ancora più bassa per il pane prodotto con lievito industriale con un valori medio di 2,20 mL di NaOH 0.1N.

**Tabella IV.4.** Caratterizzazione del pane

| Tesi | pH                       | TTA<br>mL NaOH 0.1N      | Texture<br>g                  | Volume specifico<br>mL g <sup>-1</sup> | Global liking            |
|------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| AB   | 5,47 ± 0,11 <sup>b</sup> | 3,77 ± 0,56 <sup>b</sup> | 754,33 ± 349,13 <sup>a</sup>  | 5,09 ± 0,65 <sup>a</sup>               | 6,75 ± 0,77 <sup>a</sup> |
| C    | 4,51 ± 0,04 <sup>c</sup> | 7,25 ± 1,33 <sup>a</sup> | 1096,50 ± 265,76 <sup>a</sup> | 4,41 ± 0,75 <sup>a</sup>               | 6,89 ± 0,90 <sup>a</sup> |
| D    | 5,79 ± 0,26 <sup>a</sup> | 2,20 ± 0,20 <sup>c</sup> | 839,08 ± 292,26 <sup>a</sup>  | 4,90 ± 0,70 <sup>a</sup>               | 5,67 ± 0,49 <sup>b</sup> |

Tesi AB: Pane prodotto sulla base delle tesi a e b con l'uso del 25% di impasto acido di tipo II addizionato al 2% di lievito industriale; Tesi C: pane prodotto sulla base delle tesi c con l'utilizzo del 25% di impasto acido di tipo I; Tesi D: pane prodotto sulla base delle tesi d con l'utilizzo del 2% di lievito industriale.

I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative tra i campioni secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Dall'analisi di *texture* e volume specifico è emersa un'elevata similarità tra i pani prodotti sulla base delle tesi sperimentali saggiate. Nessuna differenza statistica è emersa analizzando i valori di *texture* ottenuti dall'analisi dei pani prodotti con impasto acido di tipo I e di tipo II e dal pane prodotto con lievito industriale. Analogamente, non sono state identificate differenze statistiche per quanto riguarda il volume specifico dei pani in studio, risultando pertanto comparabili.

Dai dati ottenuti dal *panel test*, condotto al fine di valutare il gradimento complessivo del pane prodotto, è emersa una elevata omologia tra il pane prodotto con impasto acido di tipo I e impasto acido di tipo II, che sono risultati statisticamente più apprezzati rispetto al pane ottenuto utilizzando lievito industriale. Il pane prodotto con impasto acido di tipo I e di tipo II, risultato mediamente apprezzato su una scala da 1 a 9, ha mostrato valori medi pari a 6,89 e 6,75 rispettivamente, mentre il pane prodotto con l'aggiunta di lievito industriale ha mostrato un grado di apprezzamento inferiore, con valore di *global liking* medio pari a 5,67.

## 5. Discussione e conclusione

Il lievito naturale, impasto acido o *sourdough* definito come un impasto di acqua e farina fermentato da lieviti e batteri lattici (Chavan & Chavan, 2011; Hammes & Gänzle, 1998; Lönner *et al.*, 1986), rappresenta uno dei più antichi esempi di starter usato nella produzione di prodotti fermentati a base di cereali. Tradizionalmente prodotti con farina di segale o frumento, gli impasti acidi possono attualmente essere prodotti con tipologie diverse di sfarinati, come semolino (*Triticum durum*) (Alfonzo *et al.*, 2016), farina di quinoa (Rizzello *et al.*, 2016, Iglesias-Puig *et al.*, 2015), amaranto (Alencar *et al.*, 2015), grano saraceno (Aguilar *et al.*, 2016; Stokic *et al.*, 2015) e chia (*Salvia hispanica* L) (Costantini *et al.*, 2014). L'uso di impasto acido nella produzione di pane, dolci, pizza ed altri prodotti da forno è ampiamente diffuso in tutto il mondo e sempre più apprezzato e valorizzato in relazione alle migliorate proprietà sensoriali e nutrizionali che questi prodotti alimentari dimostrano rispetto a quelli prodotti con lievito industriale (Gobbetti *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Thiele *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2015). Da un punto di vista applicativo a livello domestico e artigianale, l'impasto acido di tipo I, caratterizzato generalmente da un valore di DY compreso tra 150-160, risulta essere il più diffuso, seppur negli ultimi anni l'uso di impasto acido di tipo II sta aumentando. L'impasto acido di tipo II in relazione alla consistenza liquida o semi-liquida, con valori di  $DY \geq 200$ , mostra una migliore versatilità e facilità di utilizzo, soprattutto in quanto non necessita di rinfreschi quotidiani per il mantenimento della capacità acidificante e lievitante (Siepmann *et al.*, 2017). Dopo la produzione, infatti, l'impasto acido di tipo II viene da prima stabilizzato mediante raffreddamento e successivamente aggiunto di cloruro di sodio o pastorizzato per interrompere la produzione di anidride carbonica e acidi organici (Brandt, 2007; Decock & Cappelle, 2005), tale pratica è necessaria soprattutto per lo stoccaggio nell'impasto acido. Durante il periodo di conservazione, che può durare da 1-3 giorni, fino ad un massimo di 7 giorni, l'impasto acido di tipo II può essere utilizzato per la produzione di pane il quale risulterà più acido rispetto al pane prodotto con lievito industriale (Corsetti *et al.*, 2012). Inoltre, la fermentazione che si sviluppa in un'unica fase, garantisce un miglior controllo dei parametri di processo permettendo in tal modo un miglioramento delle prestazioni e del metabolismo microbico dell'impasto acido (Mastilovic *et al.*, 2001). L'uso di impasto acido di tipo II, ed in particolare lo sviluppo di impasti acidi specifici mediante selezione di opportune specie di batteri lattici, rappresenta un aspetto fondamentale per la produzione di prodotti finiti con proprietà organolettiche, sensoriali e nutrizionali peculiari. Gli impasti acidi di tipo II, nonostante si sviluppino in condizioni di processo controllate possono subire delle variazioni

a livello microbiologico soprattutto per quanto riguarda la componente di batteri lattici (Carnevali *et al.*, 2007; Di Cagno *et al.*, 2014), determinando potenzialmente la produzione di prodotti finiti diversi da quelli tradizionali. Questa problematica potrebbe in parte essere limitata selezionando ceppi di batteri lattici in grado di soddisfare i requisiti qualitativi e tecnologici richiesti a livello industriale (Gaggiano *et al.*, 2007).

I valori di pH degli impasti acidi di tipo I e di tipo II utilizzati nelle prove sperimentali sono stati analizzati e confrontati al fine di evidenziare eventuali differenze statistiche; dall'analisi è stato possibile evidenziare un pH dell'impasto acido di tipo I, pari ad un valore medio di 3,97, in linea con quanto descritto da Taccari e colleghi (2016) su un impasto acido prodotto con farina di frumento tenero. Viceversa, il pH risulta leggermente inferiore rispetto a quanto descritto da Di Cagno e collaboratori (2014) su quattro diverse tipologie di impasti acidi di tipo I a un giorno di fermentazione. Il pH dell'impasto acido di tipo I inoltre è risultato non diverso statisticamente dal pH dell'impasto acido di tipo II a 0h di fermentazione, questo dato è stato in parte confermato dalle osservazioni di Di Cagno *et al.* (2014), nell'articolo infatti si evidenzia un'apparente similitudine tra i valori di pH identificati per gli impasti acidi di tipo I e gli impasti acidi di tipo II della stessa tipologia dopo un giorno di fermentazione. Inoltre, il valore medio di pH identificato per l'impasto acido di tipo II dopo 24h di fermentazione, risultato statisticamente diverso dal pH medio identificato a 0h di fermentazione, è risultato apparentemente inferiore rispetto a quanto descritto da Di Cagno e collaboratori (2014), con valori di pH di impasti acidi liquidi dopo un giorno di propagazione compresi tra  $4,25 \pm 0,03$  e  $4,37 \pm 0,02$ , rispetto ad un valori di pH dell'impasto acido di tipo II in studio di  $3,68 \pm 0,05$ . Infine, la variazione di pH registrata nelle 96h di fermentazione monitorate nel presente lavoro non può essere confrontata con altri lavori in quanto attualmente non presenti in bibliografia, dall'analisi è possibile però osservare una variazione significativa del pH tra le 72 e le 96h, indice forse di una variazione microbiologica o chimico-fisica dell'ambiente di fermentazione. Tale variazione di pH non è altresì sostenuta da una variazione di acidità totale titolabile dell'impasto acido di tipo II, infatti quest'ultimo parametro risulta mantenersi stabile nell'intervallo di tempo tra le 72 e le 96h di fermentazione. L'acidità totale titolabile dell'impasto acido di tipo I e l'impasto acido di tipo II a 0h di fermentazione è risultata statisticamente diversa, mentre non sono state evidenziate differenze statistiche tra impasto acido di tipo I e impasto acido di tipo II a 24h di fermentazione. L'acidità totale titolabile dell'impasto acido di tipo II a 24 h di fermentazione del presente studio risulta non in linea con quanto descritto da Di Cagno *et al.* (2014); infatti, mentre nel presente lavoro tale parametro è stato identificato con un valore medio di 8,5

mL di NaOH 0,1N, gli impasti acidi di tipo II di Matera e di Altamura hanno mostrato valori di acidità totale titolabile ad un giorno di fermentazione variabili tra 4,1 e 6,6 mL di NaOH 0,1N (Di Cagno *et al.*, 2014). Risulta inoltre interessante sottolineare come gli impasti acidi di tipo I di Matera e Altamura siano stati caratterizzati da un valore di acidità totale titolabile apparentemente inferiore, con valori compresi tra 5,7 e 7,1 mL di NaOH 0,1N rispetto a quanto evidenziato per l'impasto acido di tipo I in studio, caratterizzato da un valore medio di acidità totale titolabile pari a 9,8 mL di NaOH 0,1N.

L'enumerazione dei batteri lattici presenti negli impasti di tipo I e negli impasti acidi di tipo II ha permesso di evidenziare una carica microbica batterica piuttosto elevata con valori medi di 9 log UFC g<sup>-1</sup> o L<sup>-1</sup>, in particolare l'impasto acido di tipo I è stato caratterizzato da valori di carica di batteri lattici statisticamente più elevati rispetto agli impasti acidi di tipo II. I dati ottenuti dal presente lavoro, seppur relativi a tempi di campionamento diversi, risultano apparentemente in linea con quanto esposto da Taccari e colleghi (2016) mentre risultano discordanti rispetto a quanto descritto da Di Cagno e colleghi (2014). In particolare, negli impasti acidi di tipo I e di tipo II di Altamura e Matera a un giorno di propagazione sono state evidenziate cariche microbiche di batteri lattici variabili tra 7 e 8 log UFC g<sup>-1</sup> o L<sup>-1</sup>, con valori di carica batterica dell'impasto acido di tipo II generalmente inferiori rispetto a quelli dell'impasto acido di tipo I.

L'analisi PCR-DGGE degli impasti acidi di tipo I e degli impasti acidi di tipo II a 0 e 96h di fermentazione ha permesso di evidenziare un'apparente stabilità microbiologica, tale evidenza limitata alla valutazione nelle 96h di fermentazione non risulta confermata da studi condotti monitorando impasti acidi liquidi in periodi temporali più lunghi. Nel lavoro condotto da Di Cagno e colleghi (2014) infatti, è stato possibile evidenziare un'elevata diversità microbica tra gli impasti acidi di tipo I e di tipo II nei 28 giorni di propagazione. In particolare, nello studio viene evidenziata anche una progressiva perdita di diversità di specie di batteri lattici negli impasti acidi di tipo II che risulta invece meno evidente negli impasti acidi di tipo I. L'analisi del DNA estratto direttamente dalle matrici in studio nel presente lavoro di tesi ha permesso di evidenziare la presenza esclusiva della specie batteriche *Lact. brevis* e dei membri del gruppo microbico *Lact. alimentarius/paralimentarius*, inoltre dall'analisi è emersa la presenza di DNA eucariotico della specie *T. aestivum*. In particolare, l'identificazione di DNA eucariotico, rilevato anche nello studio di Di Cagno *et al.* (2014), è probabilmente correlata ad una non completa specificità della coppia di *primers* 338f-518r utilizzati per l'amplificazione del DNA batterico (Garofalo *et al.*, 2017).

La specie *Lact. brevis*, microrganismo eterofermentante obbligato, frequentemente identificato negli impasti acidi prodotti con farina di frumento in Italia (Taccari *et al.*, 2016; Iacumin *et al.*, 2009; Ricciardi *et al.*, 2005; Catzeddu *et al.*, 2006; Minervini *et al.*, 2012b; Rizzello *et al.*, 2015; Osimani *et al.*, 2009; Reale *et al.*, 2005; Corsetti *et al.*, 2001) e in altri paesi come descritto da Gobbetti *et al.* (2016), è una delle specie più diffuse negli impasti acidi assieme alle specie *Lact. sanfranciscensis*, *Lact. plantarum* e *P. pentosaceus* (Siepmann *et al.*, 2017). Inoltre, la sua presenza in impasti acidi di tipo II è stata precedentemente evidenziata da Di Cagno *et al.* (2014) in un impasto acido di Matera a 1, 7 e 14 giorni di propagazione.

I membri del gruppo microbico *Lact. alimentarius/paralimentarius*, riscontrati negli impasti acidi con frequenza minore rispetto alla specie *Lact. brevis*, sono stati descritti in impasti acidi preparati con farina di frumento in Italia (Randazzo *et al.* 2005; Gobbetti *et al.* 1994; Catzeddu *et al.*, 2006; Corsetti *et al.*, 2001; Valmorri, *et al.*, 2006; Gatto & Torriani, 2004; Iacumin *et al.*, 2009; Osimani *et al.*, 2009; Siragusa *et al.*, 2009; Minervini *et al.*, 2012a) e in altri paesi quali Francia, Cina, Grecia, Stati Uniti e Belgio come riportato da Gobbetti *et al.* (2016).

I prodotti a lievitazione naturale, ed in particolare il pane, mostrano caratteristiche specifiche generalmente migliorate in termini di *shelf life*, profilo sensoriale e profilo nutrizionale rispetto ai prodotti ottenuti con il lievito industriale.

Nel presente lavoro, il pane ottenuto sulla base delle tesi sperimentali saggiate, è stato valutato al fine di definirne l'acidità, espressa come pH e acidità totale titolabile, la *texture*, il volume specifico e il grado di apprezzamento globale. Dalle ricerche bibliografiche eseguite, questo risulta essere il primo lavoro condotto al fine di valutare l'impatto di impasti acidi di tipo II nella panificazione con sferinati di frumento tenero di tipo 2 macinato a pietra.

Un aspetto importante legato all'uso di impasto acido in panificazione artigianale risulta essere l'incremento di acidità del prodotto finito (Messenes & De Vuyst, 2002; Gänzle, 2004; Poutanen *et al.* 2009), a conferma di tale evidenza, dall'analisi di pH e acidità totale titolabile dei campioni in studio è emersa una netta differenza statistica tra il pane prodotto con impasto acido di tipo I, pane prodotto con impasto acido di tipo II e pane di controllo prodotto con lievito industriale. Il pane prodotto con il 25% ( $p\ p^{-1}$ ) di impasto acido di tipo I, come atteso, ha mostrato un valore medio di pH (4,51) statisticamente più basso rispetto al pane prodotto con lievito

industriale (pH medio 5,79). Come descritto da vari autori (Messenes & De Vuyst, 2002; Gänzle, 2004; Poutanen *et al* 2009), l'impasto acido di tipo I determina un incremento dell'acidità del pane in relazione all'elevata concentrazione di acido lattico e acido acetico prodotto durante il processo fermentativo. Il basso valore di pH è, pertanto, direttamente correlato al valore di acidità totale titolabile riscontrato nel presente lavoro per il medesimo pane. L'acidità totale titolabile, infatti, del pane prodotto con impasto acido di tipo I (TTA media 7,25) è risultata statisticamente più elevata rispetto al pane di controllo (TTA media 2,20). Differenze statistiche significative sono state evidenziate tra il pane prodotto con impasto acido di tipo I e con impasto acido di tipo II; in particolare, il pane prodotto con impasto acido di tipo II ha mostrato valori medi di pH (5,47) superiori e di acidità totale titolabile (3,77) inferiori rispetto al pane prodotto con impasto acido di tipo I. I dati, non confrontabili con altri lavori scientifici, evidenziano inoltre la differenza statistica tra pane prodotto con impasto acido di tipo II e pane di controllo prodotto con lievito industriale, confermando in parte quanto atteso in merito all'uso di impasti acidi in panificazione. Il pane prodotto con impasto acido di tipo II, pur risultando significativamente meno acido del pane prodotto con impasto acido di tipo I, è risultato significativamente più acido rispetto al pane di controllo. Analogamente, il valore di acidità totale titolabile del pane prodotto con impasto acido di tipo II è risultato significativamente diverso rispetto a quanto identificato nel pane prodotto con impasto acido di tipo I e nel pane di controllo.

La *texture* è una delle più importanti caratteristiche sensoriali dei prodotti alimentari, definita nel pane dalla presenza di glutine (Gänzle *et al.*, 2007). Negli impasti acidi, durante la fermentazione, l'aumento di acidità della matrice, legata all'idrolisi dell'amido ad opera dei batteri lattici, determina la potenziale proteolisi del glutine, in particolare l'acido acetico e l'acido lattico possono idrolizzare le molecole di glutenina presenti nella macromolecola del glutine (Corsetti *et al.*, 1998). La potenziale idrolisi del glutine potrebbe determinare la formazione di un impasto più morbido e meno elastico determinando così la produzione di un pane più duro e con un volume ridotto (Armero & Collar, 1998; Gocmen *et al.*, 2007). Le proprietà reologiche dell'impasto finale dipendono dalla concentrazione di impasto acido utilizzato come agente lievitante e dall'estensione del glutine durante la fermentazione (Clarke *et al.*, 2004, Takeda *et al.*, 2001, Corsetti *et al.*, 2000; Hoskeney, 1994). La *texture* può, inoltre, essere influenzata dalla produzione da parte dei batteri lattici di esopolisaccaridi come il destrano che agiscono migliorando il volume e la *texture* del pane prodotto (Wolter *et al.*, 2014; Di Cagno *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2016). Seppur in letteratura è descritto un generale aumento della durezza del pane

prodotto con impasto acido, nel presente studio non è stato possibile evidenziare una differenza statistica tra i valori medi di *texture* del pane in esame, in contrasto con quanto descritto da Rinaldi e collaboratori (2015) per pani prodotti con farina di grano tenero con impiego di impasto acido rispetto a pani prodotti con medesima farina e lievito naturale.

Analogamente a quanto definito per la *texture*, il volume specifico dei pani in esame non ha mostrato differenze statisticamente significative, in contrasto con quanto esposto da Rinaldi *et al.*, 2015. Nel presente lavoro di dottorato, infatti, non sono state evidenziate differenze statistiche significative tra il pane prodotto con lievito industriale e pane prodotto con impasto acido, mentre nello studio di Rinaldi *et al.*, 2015 il pane prodotto con impasto acido è risultato statisticamente più piccolo rispetto al pane prodotto con lievito industriale. Contestualmente nella presente sperimentazione il pane prodotto con impasto acido di tipo I non ha mostrato differenze significative rispetto al pane prodotto con impasto acido di tipo II.

Il *panel test* condotto da assaggiatori non addestrati, ma familiari al consumo di pane, ha permesso di evidenziare un grado di apprezzamento superiore del pane prodotto con impasto acido di tipo I e di tipo II rispetto al pane prodotto con lievito industriale, dato in linea con quanto descritto in bibliografia sul miglioramento del profilo organolettico del pane. Inoltre, dall'analisi è stato possibile definire come il pane prodotto con l'impasto acido di tipo I e quello prodotto con impasto acido di tipo II non mostrino differenze significative di apprezzamento da parte del *panel* di assaggiatori. Il maggior indice di gradimento del pane ottenuto con impasto acido rispetta in parte quanto atteso, anche in relazione alla forte tradizione storica presente in Italia sul pane a lievitazione naturale; mediante il presente studio non è altresì possibile definire se tale indice di gradimento sia legato ad un diverso profilo aromatico del pane, in relazione alla mancanza di dati in merito a tale aspetto. Concludendo è possibile affermare che l'uso di impasto acido nella presente sperimentazione ha modificato l'acidità e il pH del pane prodotto, definendo la produzione un alimento più gradito, inoltre sulla base dei dati ottenuti si evidenzia come nel caso specifico l'uso di impasto acido di tipo II non determini variazioni rispetto al pane prodotto con impasto acido di tipo I. Quest'ultima osservazione risulta interessante nell'ottica di una possibile estensione dell'uso di impasti acidi di tipo II anche a livello di produttori artigianali, al fine di garantire la fattibilità di questa ipotesi ulteriori studi dovranno essere condotti al fine di analizzare non solo gli aspetti tecnologici ma anche gli aspetti qualitativi ed organolettici del pane prodotto con impasti acidi di tipo II.

## 6. Bibliografia

- AACCI, 2000. Method 10e05.01; 44-15.02; 32-45.01. Guidelines for Measurement of Volume by Rapeseed Displacement. Approved Methods of Analysis, eleventh ed. U.S.A. AACC International, St. Paul, MN.
- Aguilar, N., Albanell, E., Miñarro, B., Capellas, M. 2016. Chestnut flour sourdough for gluten-free bread making. *European Food Research Technology* 242:1795-1802.
- Alencar, N.M.M., Steel, C.J., Alvim, I. D., DeMoraes, E.C., Bolini, M.A. 2015. Addition of quinoa and amaranth flour in gluten-free bread: temporal profile and instrumental analysis. *LWT-Food Science and Technology* 62:1011–1018.
- Alfonzo, A., Urso, V., Corona, O., Francesca, N., Amato, G., Settanni, L., Di Miceli, G. 2016. Development of a method for the direct fermentation of semolina by selected sourdough lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 239:65-78.
- Arendt, E.K., Ryan, L.A.M., Dal Bello, F. 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology* 24:165–174
- Armero, E., Collar, C. 1998. Crumb firming kinetics of wheat breads with anti-staling additives. *Journal of Cereal Science* 28:165-174.
- Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W.P. 1995. Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie des sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl und Brot* 49:370-374.
- Brandt, M.J. 2007. Sourdough products for convenient use in baking. *Food Microbiology* 24:161-164.
- Brandt, M.J., Hammes, W.P., Gänzle, M.G. 2004. Effects of process parameters on growth and metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida humilis* during rye sourdough fermentation. *European Food Research and Technology* 218:333-338.
- Brummer, J.M., Lorenz, K. 1991. European developments in wheat sourdoughs. *Cereal Foods World* 36:31-314.
- Carnevali P, Ciatì R, Leporati A, Paese M. 2007. Liquid sourdough fermentation: Industrial application perspectives. *Food Microbiology* 24:150–4.
- Catzeddu, P., Mura, E., Parente, E., Sanna, M., Farris, G.A. 2006. Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. *Systematic and Applied Microbiology* 29:138-144.
- Chavan, R.S., Chavan, S.R. 2011. Sourdough technology-a traditional way for wholesome foods: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10:170–183
- Chen, X.Y., Levy, C., Gänzle, M.G. 2016. Structure-function relationships of bacterial and enzymatically produced reuterans and dextran in sourdough bread baking application. *International Journal of Food Microbiology* 239:95-102.
- Clarke, C.I., Schober, T., Dockery, P., O'Sullivan, K., Arendt, E.K. 2004. Wheat sourdough fermentation: effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry* 81:409-417.
- Corsetti, A. 2012. Technology of sourdough fermentation and sourdough applications. In S. Cappelle, L. Guylaine, M. Gänzle, & M. Gobbetti (Eds.), *Handbook on sourdough biotechnology* (first ed.). Springer: Germany.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., Rossi, J. 1998. Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *Journal of Food Science* 63:347-351.

- Corsetti, A., Gobbetti, M., De Marco, B., Balestrieri, F., Paoletti, F., Rossi, J. 2000. Combined effect of sourdough lactic acid bacteria and additives on bread firmness and staling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48:3044-3051.
- Corsetti, A., Lavermicocca, P., Morea, M., Baruzzi, F., Tosti, N., Gobbetti, M. 2001. Phenotypic and molecular identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat (species *Triticum durum* and *Triticum aestivum*) sourdoughs of Southern Italy. *International Journal of Food Microbiology* 64:95-104.
- Costantini, L., Luksic, L., Molinari, R., Kreft, I., Bonafaccia, G., Manzi, L., Merendino, N. 2014. Development of gluten-free bread using tartary buckwheat and chia flour rich in flavonoids and omega-3 fatty acids as ingredients. *Food Chemistry* 165:232-240.
- De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel H-M, Weckx S. 2014. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiology* 37:11-29.
- De Vuyst, L., Harth, H., Van Kerrebroeck, S., Leroy, F. 2016. Yeast diversity of sourdoughs and associated metabolic properties and functionalities. *International Journal of Food Microbiology* 239:26-34.
- De Vuyst, L., Neysens P. 2005. The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Food Science & Technology* 16:43-56.
- De Vuyst, L., Vrancken, G., Ravyts, F., Rimaux, T., Weckx, S. 2009. Biodiversity, technological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Food Microbiology* 26:666-675.
- Decock, P., Cappelle, S. 2005. Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science & Technology* 16:113-120.
- Di Cagno, R., De Angelis, M., Limitone, A., Minervini, F., Carnevali, P., Corsetti, A., Gaenzle, M., Ciati, R., Gobbetti, M. 2006. Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 54:9873-9881.
- Ercolini, D., Moschetti, G., Blaiotta, G., Coppola, S. 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture independent analyses. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 610-617.
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* 24:128-138.
- Gänzle, M.G., Vogel, R.F. 2003. Contribution of reutericyclin production to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation. *International Journal of Food Microbiology* 80:31-45.
- Gänzle, M.G. 2004. Reutericyclin: biological activity, mode of action, and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64:326-332.
- Gänzle, M.G., Vermeulen, N., Vogel, R.F. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* 24:128-138.
- Gänzle, M.G., Ehman, M., Hammes, W.P. 1998. Modeling of growth of *Lactobacillus sanfranciscensis* and *Candida milleri* in response to process parameters of sourdough fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 64:2616-2623.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippi, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementi, F. 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology* 49:123-133.
- Garofalo, C., Bancalari, E., Milanović, V., Cardinali, F., Osimani, A., Savo Sardaro, M.L., Bottari, B., Bernini, V., Aquilanti, L., Clementi, F., Neviani, E., Gatti, M. 2017. Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 242:24-36.

- Gatto, V., Torriani, S. 2004. Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. *Annals of Microbiology* 54:31-42.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno, R., De Angelis, M. 2016. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *International Journal of Food Microbiology* 239:3-18.
- Gobbetti, M., 1998. Interactions between lactic acid bacteria and yeasts in sourdoughs. *Trends in Food Science & Technology* 9:267-274.
- Gobbetti, M., Corsetti, A. 1996. Co-metabolism of citrate and maltose by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* citrate-negative strain: effect on growth, end products and sourdough fermentation. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 203:82-87.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J. 1995. Maltose-fructose co-fermentation by *Lactobacillus brevis* subsp. *lindneri* CB1 fructose-negative strain. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42:939-944.
- Gobbetti, M., Corsetti, A., Rossi, J., La Rosa, F., De Vincenzi, S. 1994. Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of Central Italy. *Italian Journal of Food Science* 6:85-94.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., Di Cagno, R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* 16:57-69.
- Gobbetti, M., Minervini, F., Pontonio, E., Di Cagno R., De Angelis, M. 2016. Drivers for the establishment and composition of the sourdough lactic acid bacteria biota. *International Journal of Food Microbiology* 239:3-18.
- Gobbetti, M., Rizzello, C.G., Di Cagno, R., De Angelis, M. 2014. How the sourdough may affect the functional features of leavened baked goods. *Food Microbiology* 37:30-40.
- Gocmen, D., Gurbuz, O., Kumral, A.Y., Dagdelen, A.F., Sahin, I. 2007. The effects of wheat sourdough on glutenin patterns, dough rheology and bread properties. *European Food Research and Technology* 225:821-830.
- Hamad, S.H., Böcker, G., Vogel, R.F., Hammes, W.P. 1992. Microbiological and chemical analysis of fermented sorghum dough for Kisra production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37:728-731.
- Hamad, S.H., Dieng, M.C., Ehrmann, M.A., Vogel, R.F. 1997. Characterization of the bacterial flora of Sudanese sorghum flour and sorghum sourdough. *Journal of Applied Microbiology* 83:764-770.
- Hammes, W.P., Stolz, P., Gänzle, M. 1996. Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Advances in Food Sciences* 18:176-184.
- Hammes, W.P., Gänzle, M.G. 1998. Sourdough breads and related products. In B. J. B. Woods, *Microbiology of Fermented Foods*, Vol. 1. London: Blackie Academic/Professional. 199-216.
- Hansen, A., Schieberle, P. 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science & Technology* 16:85-94.
- Hoseney, C. 1994. *Principles of cereals science and technology* (2nd ed.). USA: American Association of Cereal Chemists.
- Hynes, W.L., Ferretti, J.J., Gilmore, M.S., Segarra, R.A. 1992. PCR amplification of streptococcal DNA using crude cell lysates. *FEMS Microbiology Letters* 73:139-142.
- Iacumin, L., Cecchini, F., Manzano, M., Osualdini, M., Orlic, S., Comi, G., Boscolo, D. 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. *Food Microbiology* 26:1-135.
- Iglesias-Puig, E., Monedero, V., Haros, M. 2015. Bread with whole quinoa flour and bifidobacterial phytases increases dietary mineral intake and bioavailability. *LWT- Food Science and Technology* 60: 71-77.

- Istituto Nazionale di Sociologia Rurale (INSOR). 2000. Atlante dei prodotti tipici: il pane. In: F. Angeli (Ed.). Roma. Agra RAI-ERI.
- Kline, L., Sugihara, T.F. 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Applied Microbiology* 21:459-465.
- Liu, T., Li, Y., Chen, J., Sadiq, F.A., Zhang, G., Li, Y., He, G. 2016. Prevalence and diversity of lactic acid bacteria in Chinese traditional sourdough revealed by culture dependent and pyrosequencing approaches. *LWT- Food Science and Technology* 68:91-97
- Lönner, C., Welander, T., Dostálek, M. M. 1986. The microflora in a sourdough started spontaneously on typical swedish ryemeal. *Food Microbiology* 3:3-12.
- Makhoul, S., Romano, A., Capozzi, V., Spano, G., Aprea, E., Cappellin, L., Benozzi, E., Scampicchio, M., Märk, T.D., Gasperi, F., El-Nakat, H., Guzzo, J., Biasioli, F. 2015. Volatile compound production during the bread- making process: effect of flour, yeast and their interaction. *Food and Bioprocess Technology* 8:1925-1937.
- Manini, F., Casiraghi, M. C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D., Plumed-Ferrer, C. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Science and Technology* 66:275-283.
- Mariotti, M., Garofalo, C., Aquilanti, L., Osimani, A., Fongaro, L., Tavoletti, S., Hager, A.S., Clementi, F. 2014. Barley flour exploitation in sourdough bread-making: a technological, nutritional and sensory evaluation. *LWT- Food Science and Technology* 59:973-80.
- Messens, W., De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdough. A review. *International Journal of Food Microbiology* 72:31-43.
- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M. 2014. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International Journal of Food Microbiology* 171:136-146.
- Minervini, F., Di Cagno, R., Lattanzi, A., De Angelis, M., Antonielli, L., Cardinali, G., Cappelle, S., Gobbetti, M. 2012a. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of 19 sourdoughs used for traditional/typical Italian breads: interactions between ingredients and microbial species diversity. *Applied and Environmental Microbiology* 78:1251-1264.
- Minervini, F., Lattanzi, A., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M. 2012b. Influence of artisan bakery- or laboratory-propagated sourdoughs on the diversity of lactic acid bacterium and yeast microbiotas. *Applied and Environmental Microbiology* 78:5328-5340.
- Onno, B., Roussel, P. 1994. Technologie et microbiologie de la panification au levain. In: De Roissart, H., Luquet, F.M. (Eds.), Bactéries Lactiques. Loriga, 11. Uriage, France, pp. 293-320.
- Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanović, V., Clementi, F. 2015. Unpasteurized commercial boza as a source of microbial diversity. *International Journal of Food Microbiology* 194:62-70.
- Osimani, A., Zannini, E., Aquilanti, L., Mannazzu, I., Comitini, F., Clementi, F. 2009. Lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of the Marche region. *Italian Journal of Food Science* 21:269-286.
- Peryam, D.R., Pilgrim, F.J. 1957. Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology* 11: 9-14.
- Pétel, C., Onno, B., Prost, C. 2017. Sourdough volatile compounds and their contribution to bread: A Review. *Trends in Food Science & Technology* 59:105-123.
- Poutanen, K., Flander, L., Katina, K. 2009. Sourdough and cereal fermentation in a nutritional perspective. *Food Microbiology* 26:693-699.

- Randazzo, C.L., Heilig, H., Restuccia, C., Giudici, P., Caggia, C. 2005. Bacterial population in traditional sourdough evaluated by molecular methods. *Journal of Applied Microbiology* 99:251-258.
- Reale, A., Tremonte, P., Succi, M., Sorrentino, E., Coppola, R. 2005. Exploration of lactic acid bacteria ecosystem of sourdoughs from the Molise region. *Annals of Microbiology* 55:17-22.
- Ricciardi, A., Parente, E., Piraino, P., Paraggio, M., Romano, P. 2005. Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdough for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). *International Journal of Food Microbiology* 98:63-72.
- Rinald, M., Paciulli, M., Caligiani, A., Sgarbi, E., Cirilini, M., Dall'Asta, C., Chiavaro, E. 2015. Durum and soft wheat flours in sourdough and straight-dough bread-making. *Journal of Food Science and Technology* 52:6254-65.
- Rizzello, C.G., Lorusso, A., Montemurro, M., Gobbetti, M. 2016. Use of sourdough made with quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour and autochthonous selected lactic acid bacteria for enhancing the nutritional, textural and sensory features of white bread. *Food Microbiology* 56:1-13
- Rizzello, C.G., Cavoški, I., Turk, J., Ercolini, D., Nionelli, L., Pontonio, E., De Angelis, M., De Filippis, F., Gobbetti, M., Di Cagno, R. 2015. Organic cultivation of *Triticum turgidum* subsp. durum is reflected in the flour-sourdough fermentation-bread axis. *Applied and Environmental Microbiology* 81:3192-3204.
- Rocha, J.M., Malcata, F.X. 1999. On the microbial profile of traditional Portuguese sourdough. *Journal of Food Protection* 62:1416-1429.
- Rocha, J.M., Malcata, F.X. 2012. Microbiological profile of maize and rye flours, and sourdough used for the manufacture of traditional Portuguese bread. *Food Microbiology* 31:72-88.
- Siepmann FB, Ripari V, Waszczynskyj N, Spier MR. 2017. Overview of Sourdough Technology: from Production to Marketing. *Food Bioprocess Technol. Food and Bioprocess Technology* 1-29.
- Siragusa, S., Di Cagno, R., Ercolini, D., Minervini, F., Gobbetti, M., De Angelis, M. 2009. Taxonomic structure and monitoring of the dominant population of lactic acid bacteria during wheat flour sourdough type I propagation using *Lactobacillus sanfranciscensis* starters. *Applied and Environmental Microbiology* 7:1099-1109.
- Spicher, G., Stephan, H. 1993. Handbuch Sauerteig, Biologie-Biochemie-Technologie 1993.
- Spicher, G., Pomeranz, Y. 1985. Bread and other baked products. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 5<sup>th</sup> ed., vol A4, Verlag VCH, Weinheim.
- Spicher, G., Stephan, H. 1999. Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie 5<sup>th</sup> ed. Behr's Verlag, Hamburg, Germany.
- Stokic, E., Mandic, A., Sakac, M., Misan, A., Pestoric, M., Simurina, O., et al. 2015. Quality of buckwheat-enriched wheat bread and its antihyperlipidemic effect in statin treated patients. *LWT - Food Science and Technology* 63:556-561
- Stolz, P. 1999. Mikrobiologie des Sauerteiges. In G. Spicher, & H. Stephan (Eds.), Handbuch Sauerteig: Biologie, Biochemie, Technologie 5<sup>th</sup> ed. Hamburg: Behr's Verlag. 35-60.
- Stolz, P., Böcker, G., Hammes, W.P., Vogel, R.F. 1995. Utilization of electron acceptors by lactobacilli isolated from sourdough. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 201:91-96.
- Sugihara, T.F., Kline, L., Miller, M.W. 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. I. Yeasts responsible for the leavening action. *Applied Microbiology* 21:456-458.
- Suihko, M.L., Makinen, V. 1984. Tolerance of acetate, propionate and sorbate by *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulopsis holmii*. *Food Microbiology* 1:105-110.

- Svensson, L. 2012. Design and performance of small scale sensory consumer tests. Master's thesis, 30hec, Second cycle, A2E. Publikation/Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen, för livsmedelsvetenskap, no. 354. Uppsala: The Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Taccari, M., Aquilanti, L., Polverigiani, S., Osimani, A., Garofalo, C., Milanović, V., Clementi, F. 2016. Microbial Diversity of Type I Sourdoughs Prepared and Back-Slopped with Wholemeal and Refined Soft (*Triticum aestivum*) Wheat Flours. *Journal of Food Science* 81:1996-2005.
- Takeda, K., Matsumura, Y., Shimizu, M. 2001. Emulsifying and surface properties of wheat gluten under acidic conditions. *Journal of Food Science* 66:393-399
- Thiele, C., Gänzle, M.G., Vogel, R.F. 2002. Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor. *Cereal Chemistry Journal* 79: 45-51.
- Valmorri, S., Settanni, L., Suzzi, G., Gardini, F., Vernocchi, P., Corsetti, A. 2006. Application of a novel polyphasic approach to study the lactobacilli composition of sourdoughs from the Abruzzo region (Central Italy). *Letters in Applied Microbiology* 43:343-349.
- Van der Meulen, R., Scheirlinck, I., Van Schoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., De Vuyst, L. 2007. Population dynamics and metabolite target analysis during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4741-4750.
- Van Kerrebroeck, S., Maes, D., De Vuyst, L. 2017. Sourdoughs as a function of their species diversity and process conditions, a meta-analysis. *Trends in Food Science & Technology* 68:152-159.
- VanderMeulen, R., Scheirlinck, I., VanSchoor, A., Huys, G., Vancanneyt, M., Vandamme, P., De Vuyst, L. 2007. Population dynamics and metabolite target analysis during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Applied and Environmental Microbiology* 73:4741-4750.
- Vogel, R.F., Böcker, G., Stolz, P., Ehrmann, M., Fanta, D., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., Schleifer, K.H., Hammes, W.P. 1994. Identification of Lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 44:223-229.
- Vogel, R.F., Knorr, R., Müller, M.R.A., Steudel, U., Gänzle, M.G., Ehrmann, M.A. 1999. Non-dairy lactic fermentations: the cereal world. *Antonie van Leeuwenhoek* 76:403-411.
- Vogel, R.F., Müller, M.R.A., Stolz, P., Ehrmann, M.A. 1996. Ecology in sourdough produced by traditional and modern technologies. *Advances in Food Sciences* 18:152-159.
- Weckx, S., Van der Meulen, R., Maes, D., Scheirlinck, I., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L. 2010b. Lactic acid bacteria community dynamics and metabolite production of rye sourdough fermentations share characteristics of wheat and spelt sourdough fermentations. *Food Microbiology* 27:1000-1008.
- Weckx, S., Van derMeulen, R., Allemeersch, J., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., De Vuyst, L. 2010a. Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their meta-transcriptome. *Applied and Environmental Microbiology* 76:5402-5408.
- Wolter, A., Hager, A. S., Zannini, E., Czerny, M., Arendt, E.K. 2014. Influence of dextran-producing *Weissella cibaria* on baking proper- ties and sensory profile of gluten-free andwheat bread. *International Journal of Food Microbiology* 172:83-91.
- Zhao, C., Kinner, M., Wismer, W., Gänzle, M.G. 2015. Effect of glutamate-accumulation during sourdough fermentation with *L. reuteri* on the taste of bread and sodium- reduced bread. *Cereal Chemistry Journal* 92:224-230.
- Zotta, T., Piraino, P., Parente, E. 2008. Characterization of lactic acid bacteria isolated from sourdoughs for Cornetto, a traditional bread produced in Basilicata (Southern Italy). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 24:1785-1795.

## **Capitolo V \_ Innovazione: *bevande fermentate analcoliche a base di cereali o pseudocereali***

## 1. Introduzione

### 1.1. Bevande fermentate: cenni storici

La fermentazione è la tecnica più antica di conservazione del cibo e le prime evidenze storiche, risalenti al 7000 a.C. in Cina e al 6000 a.C. nella zona della Mezzaluna Fertile in Medio Oriente, riguardano processi di fermentazione di latte, carni e ortaggi (McGovern *et al.*, 2004). Recentemente, analisi proteomiche eseguite su reperti archeologici hanno dimostrato la produzione di kefir già 3500 anni fa in Asia (Yang *et al.*, 2014).

Risale al terzo millennio a.C. la scoperta di una bevanda simile alla birra prodotta in epoca mesopotamica grazie alla scoperta di tavolette recanti ricette illustranti la produzione di questa bevanda tipica, così come fonti scritte ed iconografiche risalenti all'antico Egitto dimostrano come la pratica di fermentare cereali in acqua fosse molto diffusa.

Altrettanto antica risulta essere la pratica della vinificazione; raffigurazioni grafiche presenti in una tomba tebana della XVII dinastia (1555-1306 a.C.) e anfore contenenti vino presenti nella tomba del re Tutankamon (1339 a.C.), dimostrano la diffusione della coltivazione dell'uva e della sua raccolta e utilizzo per la produzione di vino nell'antico Egitto. La pratica della viticoltura si estese velocemente anche tra gli Ebrei, gli Arabi e i Greci, in particolare nel mondo greco il vino era considerato un dono degli dei e per questo fu introdotta una divinità, il Dio della convivialità Dionisio, per enfatizzarne il suo valore. Ampia diffusione si ebbe in tutto il bacino del Mediterraneo e dunque anche in Italia e nel resto d'Europa, estremamente diffusa e apprezzata era infatti la pratica della vinificazione soprattutto tra gli antichi Romani.

Altra bevanda alcolica antica risulta essere l'idromele, le origini di questa bevanda, prodotta dalla fermentazione alcolica di miele e acqua, risalgono verosimilmente alla fine del Neolitico. Le prime testimonianze certe sulla produzione di idromele però, risalgono a reperti archeologici rinvenuti nella Penisola Iberica, a Toledo in Spagna, nei quali sono stati evidenziati resti organici di miele probabilmente diluito in acqua. Innumerevoli sono i reperti archeologici che testimoniano il consumo di idromele e questo fatto evidenzia ancor più l'intimo e antichissimo rapporto tra uomo e bevande fermentate. Esempi di bevande fermentate più o meno antiche sono presenti in tutto il mondo; in Africa, Asia, Cina, Paesi dell'Est Europa molteplici sono le bevande alcoliche e non alcoliche ottenute dalla fermentazione di matrici diverse prodotte secondo tecniche tradizionali tramandate di generazione in generazione.

Particolarmente interessante risulta essere la vasta produzione di bevande ottenute dalla fermentazione dei cereali, diffusa in tutto il mondo e rivalutata nell'ultimo ventennio (Blandino *et al.*, 2003; Ciesarová *et al.*, 2017; Altay *et al.*, 2013).

### *1.2. Cereali e pseudocereali*

I cereali sono considerati fonti di carboidrati, fibre alimentari e micronutrienti essenziali quali vitamine, minerali, fitoestrogeni e composti fenolici nella dieta umana (Katina *et al.*, 2007). Tuttavia, il basso contenuto di proteine, in particolare di amminoacidi essenziali come la lisina, la bassa biodisponibilità di amido, la presenza di sostanze antinutrizionali come acido fitico, tannini e polifenoli, e la natura grossolana della matrice, rendono i cereali dal punto di vista nutrizionale e sensoriale inferiori o scadenti rispetto ai prodotti lattiero-caseari (Chavan & Kadam, 1989).

Molti sono i cereali coltivati in tutto il mondo, grano, riso, segale, orzo, mais, sorgo, avena e miglio, e tra questi sicuramente il frumento rappresenta la matrice più utilizzata in campo alimentare (Poutarnen, 2012). Il consumo regolare di cereali e in particolare di frumento è associato alla prevenzione di malattie croniche, come diabete di tipo 2, malattie cardiovascolari, ipertensione e obesità (McKewith, 2004).

Tuttavia, nei paesi occidentali, nell'ultimo decennio, ampio interesse è stato rivolto a cereali antichi e/o di minor diffusione, come kamut, farro, miglio, sorgo e ai cosiddetti pseudocereali, come quinoa, amaranto e grano saraceno in relazione all'elevato contenuto in componenti utili all'organismo umano come fibre alimentari, minerali, vitamine e composti fenolici (Coda *et al.*, 2014).

In particolare, i pseudocereali, pur risultando molto simili per funzione e composizione ai cereali, si caratterizzano per il fatto di appartenere ad una diversa categoria botanica (Ciesarová *et al.*, 2017). Il crescente interesse nei confronti dei pseudocereali è strettamente correlato al loro eccellente valore nutrizionale e biologico definito in primo luogo dall'assenza di glutine e dall'elevato contenuto di componenti con effetti benefici sulla salute umana (Barnhoorn, 2015).

### 1.2.1. Riso rosso

Il riso (*Oryza sativa*) rappresenta una delle colture di cereali più diffuse al mondo, soprattutto nei paesi in via di sviluppo; è uno degli alimenti maggiormente sfruttati al mondo, coprendo il fabbisogno alimentare di circa metà della popolazione mondiale (Gunaratne *et al.*, 2013). La coltivazione di riso rappresenta la principale fonte di reddito per milioni di persone e circa il 95% della produzione mondiale avviene in Asia (Sompong *et al.*, 2011). Il riso ha una composizione tipica costituita da 66,9-86,8 g 100 g<sup>-1</sup> di carboidrati, 6,7-9,4 g 100g<sup>-1</sup> di proteine, 0,6-3,6 g 100 g<sup>-1</sup> di lipidi e 1,5-2,9 g 100 g<sup>-1</sup> di fibra alimentare (Ciesarová *et al.*, 2017) (Tabella V.1.). Dal punto di vista nutrizionale, il riso mostra un profilo proteico molto equilibrato con un contenuto di lisina superiore alla media di frumento, mais, miglio e sorgo (Hegsted, 1969). In particolare, i tegumenti esterni o crusca sono ricchi di proteine, fibre insolubili, oli, minerali, vitamine e sostanze fitochimiche e per questo sono considerati importanti sottoprodotti durante i processi di produzione del riso bianco (Yokoyama, 2004). In commercio, esistono molteplici tipologie di riso: riso integrale o lavorato, riso comune, semifino, fino e superfino, e riso caratterizzato da una pigmentazione come riso Venere, riso Selvaggio, riso Jasmine e riso Red sono solamente alcune delle tante varietà presenti in natura. Anche se consumato generalmente come riso bianco, nell'ultimo decennio molto interesse è stato rivolto alle varietà di riso dotate di una pigmentazione, ed in particolare alle varietà di riso rosso, riso nero e riso marrone in relazione al loro elevato contenuto in antociani a livello del pericarpo (Chaudhary, 2003). Queste varietà di riso che non subiscono trattamenti di rimozione della crusca mantengono pertanto tutte le sostanze nutritive presenti a livello di tale struttura, quali proteine, vitamine e minerali (Suzuki *et al.*, 2004). Per questi motivi, il consumo di riso rosso si è ampiamente diffuso in Giappone come cibo funzionale soprattutto in relazione ai suoi elevati quantitativi di composti fenolici quali antociani, acidi fenolici e proantocianidine (Itani & Ogawa, 2004; Sompong *et al.*, 2011; Walter & Marchesan, 2011). Queste molecole oltre ad avere un potenziale effetto di riduzione dell'ossidazione del colesterolo LDL, sono probabilmente coinvolte nella riduzione delle disfunzioni cardiache attraverso una limitazione della sintesi di composti pro-infiammatori e la riduzione della sintesi di ossido nitrico (Kris-Etherton *et al.*, 2002). In particolare, le antocianidine, presenti nelle varietà di riso pigmentato, sono state identificate come molecole ad azione inibente dei confronti della proliferazione di cellule tumorali *in vitro* (Chen *et al.*,

2006) e sono state inoltre considerate efficienti molecole attive nella riduzione del colesterolo (Lee *et al.*, 2008).

Sompong e colleghi (2011) in uno studio condotto al fine di valutare le proprietà antiossidanti e fisico-chimiche di dodici varietà di riso, di cui nove varietà rosse e tre nere, coltivate in Thailandia, Cina e Sri Lanka, hanno evidenziato come il contenuto fenolico totale sia notevolmente variabile nell'ambito delle varietà analizzate indipendentemente dalla pigmentazione del riso stesso. Gunaratne e collaboratori (2013) testando otto diverse varietà di riso rosso dello Sri Lanka, hanno evidenziato una capacità antiossidante e un contenuto in fenoli medio sette volte più elevata rispetto a tre varietà di riso semilavorato di nuova generazione. E' stato inoltre evidenziato che i composti fenolici sono principalmente costituiti da proantocianidine, acidi fenolici e c-orizanolo, derivati dall'acido ferulico; in particolare, la presenza di proantocianidine è stata rilevata esclusivamente nelle specie tradizionali, le quali si sono inoltre caratterizzate per l'elevato contenuto in tocoferoli e tocotrienoli. Oltre alle interessanti proprietà antiossidanti un aspetto estremamente importante riguarda la presenza nel riso rosso di molecole antinfiammatorie identificate per la prima volta da Niu e collaboratori nel 2013. Nello studio Niu *et al.* è stata, inoltre, identificata la presenza di acido isoferulico, acido siringico, acido clorogenico, acido vanilico e acido *p*-cumarico, importanti per la loro attività antiossidante.

### 1.2.2. Orzo

L'orzo (*Hordeum vulgare*) rappresenta una delle colture agricole più antiche al mondo e attualmente solo il 20-25% dei raccolti è utilizzato nell'industria alimentare mentre il restante 75-80% è destinato all'alimentazione animale e alla produzione di malto (Madhujith *et al.*, 2006; Sharma & Gujral, 2010). Nell'ultimo decennio, l'orzo è stato ampiamente rivalutato come alimento funzionale in relazione alle elevate concentrazioni di composti bioattivi come ad esempio i  $\beta$ -glucani e i polifenoli (Jadhav *et al.*, 1998; Hockett, 2000).

L'orzo la cui composizione tipica è costituita da 71,1-80,7 g 100 g<sup>-1</sup> di carboidrati, 10,1-13,4 g 100 g<sup>-1</sup> di proteine, 1,7-2,1 g 100 g<sup>-1</sup> di lipidi e 12,5 g 100 g<sup>-1</sup> di fibra alimentare (Ciesarová *et al.*, 2017) (Tabella V.1.), si caratterizza per un apprezzabile contenuto in vitamine del gruppo B, tocotrienoli e tocoferoli (Madhujith *et al.*, 2006; Sharma & Gujral, 2010).

I  $\beta$ -glucani sono in particolare molto interessanti dal punto di vista funzionale in quanto possono prevenire o ridurre l'incidenza di patologie cardiache, diverticolite, diabete di tipo 2, oltre a promuovere la perdita di peso aumentando il senso di sazietà (Baik & Ullrich, 2008; EFSA, 2011a, 2011b; FDA, 2006; Izydorczyk & Dexter, 2008)

Generalmente, gli alimenti ricchi in  $\beta$ -glucani mostrano un impatto glicemico inferiore e il loro consumo prolungato nel tempo determina un incremento della sensibilità nei confronti dell'insulina; in particolare infatti, i  $\beta$ -glucani sono in grado di rallentare l'assimilazione dei carboidrati, riducendo in questo modo la risposta glucidica e la produzione di insulina post-prandiale sia nei soggetti sani (Harris & Kris-Etherton, 2010) sia in soggetti affetti da diabete di tipo 2 o sindrome metabolica (Cloetens *et al.*, 2012). In particolare la riduzione della risposta glicemica è comunemente attribuita alla natura viscosa di queste molecole che dunque rallentano il tasso di svuotamento gastrico e dunque il trasferimento dell'alimento nell'intestino tenue (Behall *et al.*, 2004; Behall *et al.*, 2006). Belobrajdic e collaboratori (2015) in uno studio condotto su ratti trattati con diete a diverso apporto di  $\beta$ -glucani è emerso come l'assunzione di orzo ha ridotto la quantità di mangime assunto giornalmente e aumentato la fermentazione a livello intestinale, ma allo stesso tempo lo studio non ha definito una correlazione tra l'assunzione di  $\beta$ -glucani e la sensibilità all'insulina.

In relazione alle caratteristiche dell'orzo, il suo utilizzo è ampiamente diffuso nella produzione di cibi funzionali come cracker, biscotti, pane, tortillas, pasta, barrette energetiche ai cereali e spuntini di varia natura, soprattutto in relazione alle spiccate proprietà di miglioramento del sapore, della consistenza, dell'aspetto e della composizione nutrizionale (Arndt, 2006). In particolare, l'orzo è stato ampiamente valutato per la produzione di nuove bevande funzionali, allo scopo di arricchire la dieta umana e migliorare così la salute, in particolare, l'aggiunta di orzo potrebbe essere sfruttata in sostituzione di alginati, pectine e xantano come addensante nelle preparazioni alimentari (Giese, 1992).

Uno studio condotto da Din e collaboratori (2009) ha permesso di valutare come l'aggiunta di quantitativi di  $\beta$ -glucani, inferiori al 1%, in bevande fermentate non influenza i parametri sensoriali quali sapore, colore e accettabilità rispetto ad un controllo prodotto con l'uso di addensanti comunemente riscontrati in commercio. Inoltre, dallo studio è emerso come la viscosità e l'acidità della bevanda prodotta migliori notevolmente con l'aggiunta di  $\beta$ -glucani estratti dall'orzo.

### 1.2.3. Grano saraceno

Il grano saraceno è uno pseudocereale appartenente alla famiglia botanica delle Polygonaceae, genere *Fagopyrum* (Cai *et al.*, 2004); due sono le specie più diffuse al mondo, grano saraceno comune (*Fagopyrum esculentum*) e grano saraceno di Siberia o amaro (*Fagopyrum tataricum*). Specie meno nota, coltivata esclusivamente in Asia, è invece la specie *Fagopyrum dibotrys*, denominata anche grano saraceno alto o dorato (Liu *et al.*, 2006).

Il grano saraceno mostra un'ottima adattabilità ecologica; la varietà comune è ampiamente diffusa e i maggiori produttori sono Russia, Cina, Ucraina, Francia e Polonia (FAOSTAT, 2015). Da un'analisi statistica condotta dalla FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) è emerso come nel decennio dal 2000 al 2010 la produzione di grano saraceno abbia subito un graduale decremento, salvo poi subire un'inversione di rotta nel 2011, mostrando un progressivo aumento globale (FAOSTAT, 2015). Il grano saraceno, ampiamente consumato sotto forma di semola e farina per la produzione di *porridge*, tagliatelle, pane, frittelle e altri derivati (Cai *et al.*, 2004), ha una composizione chimica definita da 66,0-73,8 g 100 g<sup>-1</sup> di carboidrati, 9,7-12,3 g 100 g<sup>-1</sup> di proteine, 2,1-2,3 g 100 g<sup>-1</sup> di lipidi e 12,2 g 100 g<sup>-1</sup> di fibra alimentare (Ciesarová *et al.*, 2017) (Tabella V.1.).

|                | Carboidrati | Proteine    | Lipidi    | Fibra alimentare |
|----------------|-------------|-------------|-----------|------------------|
| Riso rosso     | 66,9 - 86,8 | 6,7 - 9,4   | 0,6 - 3,6 | 1,5 - 2,9        |
| Orzo           | 71,1 - 80,7 | 10,1 - 13,4 | 1,7 - 2,1 | 12,5             |
| Grano saraceno | 66,0 - 73,8 | 9,7 - 12,3  | 2,1 - 2,3 | 12,2             |

**Tabella V.1.** Composizione chimica di riso rosso, grano saraceno e orzo. Dati espressi come g 100 g<sup>-1</sup>

Il rinnovato interesse verso questo pseudocereale è da ricercare nelle sue spiccate proprietà nutrizionali definite dalla presenza di costituenti funzionali peculiari. Il grano saraceno si caratterizza per una composizione aminoacidica piuttosto equilibrata, con un contenuto di lisina relativamente elevato, rispetto agli altri cereali che spesso ne sono carenti, e arginina (Watanabe, 1998; Zhu, 2016). Grazie alla sua composizione proteica, il grano saraceno complessivamente mostra molti effetti benefici sulla salute quali ad esempio: riduzione dei calcoli biliari, riduzione del colesterolo e maggiore tolleranza al glucosio in pazienti diabetici (Zhang *et al.*,

2007; Tomotake *et al.*, 2000; Koyama *et al.*, 2011). Il grano saraceno mostra un elevato contenuto in flavonoidi, quali iperina, quercetrina, quercetina e rutina; quest'ultima molecola, in particolare, è presente esclusivamente nel grano saraceno e manca in altri pseudocereali (Li & Zhang, 2001; Wijngaard & Arendt, 2006; Koyama *et al.*, 2011). Queste molecole sono coinvolte nella determinazione di effetti benefici sull'organismo, svolgendo un'importante azione anti-ipertensiva e anti-ipercolesterolemica (Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). Il grano saraceno si caratterizza inoltre, per un apprezzabile contenuto in fibre alimentari, vitamina B1 e B2, fitosteroli, carboidrati solubili e altre molecole come il D-chiro-inositolo e le fagopirine (Watanabe, 1998; Li & Zhang, 2001; Wijngaard & Arendt, 2006). Ricco in microelementi come zinco, rame, manganese e selenio (Stibilj *et al.*, 2004) e macronutrienti quali potassio, calcio, sodio e magnesio (Wei *et al.*, 2003), il grano saraceno si caratterizza, inoltre, per un elevato contenuto di acidi grassi insaturi, di cui il 40% è rappresentato da acidi grassi polinsaturi, come l'acido linoleico (Krkošková & Mrázová, 2005). Esperimenti condotti sui ratti hanno, inoltre, dimostrato come un'alimentazione a base di grano saraceno sia in grado di ridurre l'ossidazione dei lipidi (Ma *et al.*, 2010), abbia un'azione anti-obesità, anti-costipazione e antiproliferativa nei confronti di cellule tumorali (Tomotake *et al.*, 2006), possa indurre un effetto anti-affaticamento (Jin & Wei, 2011) e di stimolazione della secrezione di citochine in modo da aumentare la differenziazione cellulare e la maturità dei monociti (Wu & Lee, 2011). Alla luce dei benefici descritti, sono stati sviluppati molti prodotti per l'alimentazione umana, tra i quali è possibile annoverare aceto, birra, whisky, pane, cereali per la colazione, porridge, zuppe, pasta, pancake, biscotti e torte, seppur questi mostrano una diffusione commerciale piuttosto ristretta, spesso limitata a mercati di nicchia (Cai *et al.*, 2004; Hatcher *et al.* 2008; Li & Zhang, 2001; Zhang *et al.*, 2011).

### 1.3. Fermentazione dei cereali

I cereali grezzi si caratterizzano per odori piatti, spesso tendenti al vegetale, piuttosto sgradevoli, correlati spesso a sapori amari e sensazioni astringenti che rendono questi alimenti scarsamente accettabili dal consumatore (Zhou *et al.*, 1999; Heiniö *et al.*, 2011). Per questo motivo, nel corso del tempo svariate sono state le tecniche messe a punto per migliorare le proprietà nutrizionali ed organolettiche di cereali e pseudocereali;

bollitura, tostatura e fermentazione lattica sono tra i metodi più diffusi e in particolare quest'ultima tecnica, la fermentazione, risulta essere sicuramente la più efficiente (Mattila-Sandholm, 1998; Coda *et al.*, 2011).

La fermentazione di bevande a base di cereali e altri substrati alimentari operata dai batteri lattici ha dimostrato di migliorare la digeribilità delle proteine (Holzapfel, 1997; Taylor & Taylor, 2002), aumentare la biodisponibilità nutrizionale dei minerali e di altri micronutrienti (Agarrry *et al.*, 2010; Greffeuille *et al.*, 2011), prolungare la *shelf life* del prodotto finito (es. pane) (Angelov *et al.*, 2006; Gupta, *et al.*, 2010) ed infine migliorare le qualità organolettiche del prodotto (Nionelli *et al.*, 2014; Peyer *et al.*, 2016).

Il contenuto di macro e micronutrienti dei cereali, ed in particolare la disponibilità di carboidrati, aminoacidi, peptidi, nucleotidi, vitamine, minerali e acidi grassi rendono, queste matrici ottimi substrati per la fermentazione operata dai batteri lattici (Blandino *et al.*, 2003; Endo & Dicks, 2014). Inoltre, studi condotti sulla biodisponibilità di nutrienti hanno evidenziato come l'aggiunta di cereali maltati o enzimi idrolitici, come amilasi, glucanasi e peptidasi aumentino notevolmente la disponibilità di questi nutrienti (Gupta *et al.*, 2010a; Nionelli *et al.*, 2014). Durante la fermentazione inoltre, il raggiungimento di un pH acido permette la degradazione dei complessi cationici, normalmente presenti nei cereali, tra fitati e ioni ferro, calcio o zinco o con alcune proteine, permettendo così la liberazione dei metalli presenti e l'aumento della biodisponibilità di questi nutrienti (Chavan *et al.*, 1989; Gillooly *et al.*, 1984; Haard *et al.*, 1999; Khetarpaul & Chauhan, 1990; Nout & Motarjemi, 1997; Stewart & Getachew, 1962). Batteri lattici appartenenti ai generi *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Weissella* naturalmente presenti sulla superficie delle cariossidi dei cereali (Guyot, 2012) costituiscono spesso l'inoculo naturale, insieme a specie di eumiceti, per la fermentazione di bevande fermentate tradizionali prodotte spesso in realtà rurali o casalinghe (Nout, 2009).

Un aspetto molto importante durante la fermentazione dei cereali riguarda la liberazione di composti responsabili della definizione del sapore e del gusto a partire da carboidrati, aminoacidi e altri composti organici come acidi organici e acidi grassi degradati durante il processo o direttamente prodotti dai batteri lattici stessi (Gänzle *et al.*, 2007). I composti che definiscono il gusto e il sapore dei prodotti fermentati a base di cereali sono acidi carbossilici quali acido acetico (Coda *et al.*, 2011; Peyer *et al.*, 2015) e acido lattico (Muyanja *et al.*, 2012; Salmerón *et al.*, 2014); aldeidi e chetoni come acetaldeide (Salmerón *et al.*, 2014, 2015), acetoino (Coda *et al.*, 2011; Peyer *et al.*, 2015), acetone (Salmerón *et al.*, 2014), diacetile (Peyer *et al.*, 2015; Salmerón

*et al.*, 2014 ); esteri come l'etilacetato (Salmerón *et al.*, 2014); zuccheri quali glucosio (Charalampopoulos *et al.*, 2002; Mårtensson *et al.*, 2002), fruttosio (Charalampopoulos *et al.*, 2002; Zannini *et al.*, 2013) e maltosio (Muyanja *et al.*, 2012; Zannini *et al.*, 2013) (Peyer *et al.*, 2016).

#### *1.4. Dolcificanti naturali*

Il consumo di cibi e bevande ad alto tasso glicemico è molto diffuso in molti paesi; sebbene l'assunzione di carboidrati semplici e complessi sia una parte essenziale di una qualsiasi dieta bilanciata, la dose raccomandata non dovrebbe mai superare il 10% delle calorie totali assunte, e spesso questo non avviene (Sibbald, 2003). Problemi di obesità, diabete e malattie cardiovascolari, ma anche problemi del sistema nervoso, rappresentano questioni importanti per la sanità pubblica, pertanto l'attenzione della comunità scientifica e dell'opinione pubblica è sempre più rivolta ad un'alimentazione equilibrata e bilanciata, dove il consumo di alimenti e bevande a ridotto contenuto calorico è privilegiato. In particolare, negli ultimi anni sempre più interesse è stato rivolto nei confronti dei dolcificanti naturali, alcuni dei quali proposti per fornire effetti benefici per la salute in relazione al loro elevato contenuto in polifenoli e all'elevata attività antiossidante (Biesaga & Pyrzynska, 2013; Caderby *et al.*, 2013; Erejuwa *et al.*, 2012). La sostituzione degli zuccheri raffinati con dolcificanti naturali potrebbe essere un'alternativa valida per incoraggiare l'assunzione di molecole bio-funzionali da parte di un consumatore più attento ad uno stile alimentare sano ed equilibrato. Molti sono i dolcificanti naturali in commercio: miele, melassa nera, succo d'agave, xilitolo, stevia, zucchero di canna integrale, sciroppo di riso, sciroppo di mais, sciroppo d'acero, malto d'orzo, amasake, sciroppo di mele. Tra questi, lo sciroppo d'acero è stato ampiamente studiato dalla comunità scientifica perché rispetto agli altri dolcificanti naturali è considerato superiore dal punto di vista sensoriale, per la composizione in minerali, per la capacità antiossidante, antimutagenica, antinfiammatoria e in generale per gli effetti benefici sull'organismo (Thériault *et al.*, 2006; González-Sarriás *et al.*, 2012; Perkins & Van den Berg, 2009; Phillips *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2014; Nahar *et al.*, 20014).

#### 1.4.1. Sciroppo d'acero

Lo sciroppo d'acero è un dolcificante naturale ottenuto dall'ebollizione della linfa di due diverse specie di acero entrambi originarie del Nord America, principalmente Canada, l'acero da zucchero (*Acer saccharum*) e l'acero rosso (*Acer rubrum*) (Li & Seeram, 2010; Perkins & van den Berg, 2009). Lo sciroppo d'acero è caratterizzato da una colorazione bruna, più o meno scura, in relazione al tipo di trattamento eseguito per la produzione dello sciroppo stesso. La linfa d'acero è una sostanza molto chiara, liquida e leggermente dolciastra per la presenza del 2- 3% di zucchero, di cui il 95% è costituito da saccarosio, il 4% da glucosio e circa 1% da fruttosio. In particolare, il glucosio e il fruttosio sono ottenuti per azione dell'enzima invertasi, che scinde la molecola di saccarosio (Allard, 1974). La linfa estratta viene sottoposta a un processo di evaporazione che determina un aumento della densità della sostanza e una concentrazione degli zuccheri presenti, permettendo così di ottenere uno sciroppo con caratteristiche diverse in base al tipo di processo tecnologico applicato. Lo sciroppo d'acero viene classificato in relazione a due diverse tipologia di classificazione, quella americana e quella canadese, sulla base del colore e delle proprietà sensoriali del prodotto, ma complessivamente tutte le tipologie si caratterizzano per medesima purezza e contenuto in zuccheri (Aider *et al.*, 2007). Lo sciroppo si caratterizza, inoltre, per la presenza di altri componenti importanti quali minerali, acidi organici, aminoacidi, vitamine, composti fenolici e fitormoni (Kermasha, *et al.*, 1995; Stuckel & Low, 1996; Waseem, *et al.*, 1991; Abou-Zaid, *et al.*, 2008; Ball, 2007; Li & Seeram, 2010). Proprio questi composti sono stati studiati per i possibili effetti benefici soprattutto nella regolazione del metabolismo dello zucchero. Ad esempio, alcuni dei composti fenolici, isolati dallo sciroppo d'acero, hanno dimostrato avere un'attività inibitoria nei confronti dell'enzima  $\alpha$ -glucosidasi, limitando così l'assorbimento del glucosio da parte del intestino in risposta all'ingestione del dolcificante (Li & Seeram, 2010; Wan *et al.*, 2012). Inoltre, la linfa d'acero contiene acido abscissico, un fitormone responsabile della regolazione della crescita, sviluppo e della risposta agli stress nelle piante, proposto e valutato come possibile molecola antidiabetica (Guri *et al.*, 2007; Bruzzzone *et al.*, 2008; Guri *et al.*, 2008; Guri *et al.*, 2010), in relazione alla sua similarità strutturale con i tiazolidindioni, farmaci utilizzati nel trattamento nel diabete di tipo 2.

In particolare, uno studio condotta da St-Pierre e collaboratori nel 2014, confrontando dolcificanti naturali diversi quali melassa, sciroppo di riso integrale, sciroppo di mais, sciroppo d'agave e miele, ha dimostrato che

sia la composizione dello sciroppo d'acero che la risposta metabolica alla sua ingestione in ratti sani indicano la possibilità di utilizzare tale sciroppo come alternativa naturale al consumo di zucchero raffinato.

## 2. Scopo del lavoro

Il consumatore oggi, sempre più consapevole ed informato, richiede prodotti funzionali, sani e diversificati che soddisfino sia le esigenze nutrizionali, sia la necessità di far fronte a intolleranze, allergie e problemi di malassorbimento. Inoltre, scelte di stili di vita alimentari ben precisi quali vegetarianismo, veganismo, dieta a basso contenuto di grassi, sale o zuccheri, pongono la ricerca di fronte a nuove sfide.

In tal contesto, le bevande a base di cereali o pseudocereali possono essere considerate una valida fonte di nutrienti con un valore aggiunto impartito dalla fermentazione lattica che ne determina un miglioramento sensoriale e funzionale rispetto alle matrici grezze. In particolare, la selezione di colture starter specifiche offre uno strumento utile per il miglioramento, l'innovazione e la diversificazione delle bevande prodotte.

Lo scopo del presente lavoro è quello di realizzare uno studio di fattibilità sulla realizzazione di tre diverse bevande sperimentali fermentate a base rispettivamente di riso rosso, grano saraceno ed orzo, con il fine di verificare la possibilità di ottenere una bevanda ricca in fermenti lattici, pertanto simile allo yogurt, ma totalmente priva di latte. La totale assenza di proteine del latte rende tale bevanda idonea al consumo da parte di consumatori allergici o intolleranti, aspetto questo estremamente importante attualmente. Inoltre, nel caso specifico delle bevande a base di grano saraceno e riso, la natura delle matrici stesse rende questi prodotti idonei anche per il consumo da parte di soggetti affetti da celiachia in relazione alla totale assenza di glutine.

Per ottenere i prodotti finiti (prototipi), le tre matrici sono state macinate grossolanamente, sottoposte a trattamento termico e successiva fermentazione acido-lattica ad opera di colture selezionate di batteri lattici (*starter*), previa aggiunta di sciroppo d'acero. La selezione dello starter è stata operata su un *pool* di batteri conservati presso la Collezione di colture dei laboratori di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali dell'Università Politecnica delle Marche sulla base delle peculiari capacità acidificanti e sulle caratteristiche sensoriali fornite ai diversi substrati di fermentazione, attraverso determinazione del pH e del profilo sensoriale dei campioni a seguito del processo fermentativo.

Sulla base della valutazione di tali parametri, rispetto ad ogni singolo substrato, gli isolati con le migliori *performance* in coltura pura, sono stati inoculati in *pool* nella bevanda al fine di valutare le caratteristiche chimico-fisiche, bromatologiche e sensoriali delle bevande finali ottenute, durante e al termine del periodo di

*shelf life* di 31 giorni. Contestualmente, per ogni matrice analizzata sono stati prodotti dei prototipi di controllo che non sono stati sottoposti a fermentazione lattica della matrice.

Tutte le bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo sono state sottoposte a conte vitali in piastra dei batteri lattici, analisi bromatologiche, valutazione del pH nel tempo, del profilo sensoriale, determinazione dell'acidità totale titolabile e del contenuto in fosforo totale ed acido fitico durante la conservazione in condizioni di refrigerazione (4 °C).

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Colture di batteri lattici di riferimento

Al fine di valutare le colture di batteri lattici aventi le migliori *performance* fermentative rispetto ai tre substrati in analisi, specificatamente riso rosso, grano saraceno ed orzo, 23 isolati appartenenti alle specie *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus parabuchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus parvulus*, *Lactobacillus coryniformis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Weissella oryzae* e *Streptococcus thermophilus* sono state sottoposte ad analisi. Venti delle colture isolate precedentemente da Boza bulgara (Osimani *et al.*, 2015) fanno parte della collezione del laboratorio di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, due colture sono parte della collezione di batteri lattici (CBL) del medesimo laboratorio di Microbiologia e infine una coltura è stata acquistata da “*Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*” (DSMZ, Braunschweig, Germania, <http://www.dsmz.de/>).

Ogni coltura di collezione, mantenuta a -80 °C in glicerolo (50% NaCl 0,85% p v<sup>-1</sup>, 50% glicerolo 99,5%) è stata rivitalizzata su terreno MRSA (de Man, Rogosa, Sharpe Agar -VWR International S.r.l.) con incubazione a 37 °C per 48 ore in condizioni di aerobiosi.

#### 3.2. Preparazione dei substrati di fermentazione

Le tre matrici usate nel presente lavoro sono state trattate come mostrato nelle Figura V.1 e di seguito descritto al fine di ottenere un substrato idoneo al processo fermentativo.

In dettaglio, 100 g delle tre matrici sono stati tritati con l’ausilio di un molino manuale, fino all’ottenimento di un granulato dalla *texture* grossolana, al quale sono stati aggiunti 600 mL di acqua minerale naturale. Il preparato è stato poi sottoposto a trattamento con autoclave a 121 °C per 15 minuti e successivamente filtrato mediante l’ausilio di un colino a maglie strette.

L’estratto acquoso così ottenuto è stato utilizzato per la preparazione della bevanda necessaria per l’allestimento delle prove preliminari di fermentazione e delle analisi durante la *shelf life* del prodotto, attenendosi alle seguenti proporzioni:

- 33% p p<sup>-1</sup> di estratto acquoso,

- 57% p p<sup>-1</sup> di acqua minerale naturale,
- 10% p p<sup>-1</sup> di sciroppo d'acero.

La preparazione così ottenuta è stata dunque sterilizzata in autoclave a 121 °C per 15 minuti e successivamente raffreddata per essere sottoposta ad inoculo con le colture selezionate usate come *starter*.

In particolare, per ogni substrato, per l'allestimento delle prove preliminari di fermentazione in monocultura, la bevanda è stata aliquotata in provette sterili da 15 mL, in ragione di 10 mL per ogni provetta, al fine di valutare l'attività fermentativa delle singole culture batteriche sottoposte ad analisi preliminari. Mentre, per la valutazione durante la *shelf life* per ogni substrato, sono stati allestiti 4 diversi *batches* con un volume di 1 L ciascuno, due dei quali sono stati mantenuti come controllo, e dunque non sottoposti ad inoculo di batteri lattici (bevanda di controllo), due invece utilizzati per l'inoculo e successiva fermentazione.

### 3.3. Prove preliminari di fermentazione

Al fine di valutare la capacità fermentativa delle 23 colture di batterici lattici in studio rispetto alle tre matrici utilizzate, ogni provetta contenente 10 mL del preparato di cui sopra, è stata inoculata in doppio, in condizioni di sterilità, con un'ansata (ansa con *loop* da 1 µL) di coltura singola pura allestita in terreno MRSA e sottoposta a determinazione della carica microbica tramite conta vitale in piastra. Pertanto, dopo l'inoculo ogni provetta è stata incubata per 24 ore a 37 °C ed in seguito sottoposta a misurazione del pH a 0, 8 e 24 ore di fermentazione e analisi sensoriale. Il raggiungimento di un pH ≤ 4,8 nelle prime 24 h di fermentazione e di un valore di gradimento ≥ 7 sono stati considerati i due parametri indispensabili per la selezione delle colture da utilizzare come starter per la produzione della bevande.

#### 3.3.1. Determinazione del pH

La misurazione del pH è stata condotta con pH-metro con elettrodo solido HI2031 (modello 300, Hanna Instruments, Padova, Italia). Nelle prove preliminari il pH è stato considerato come valore discriminante per selezionare le colture starter adatte alla produzione della bevanda.

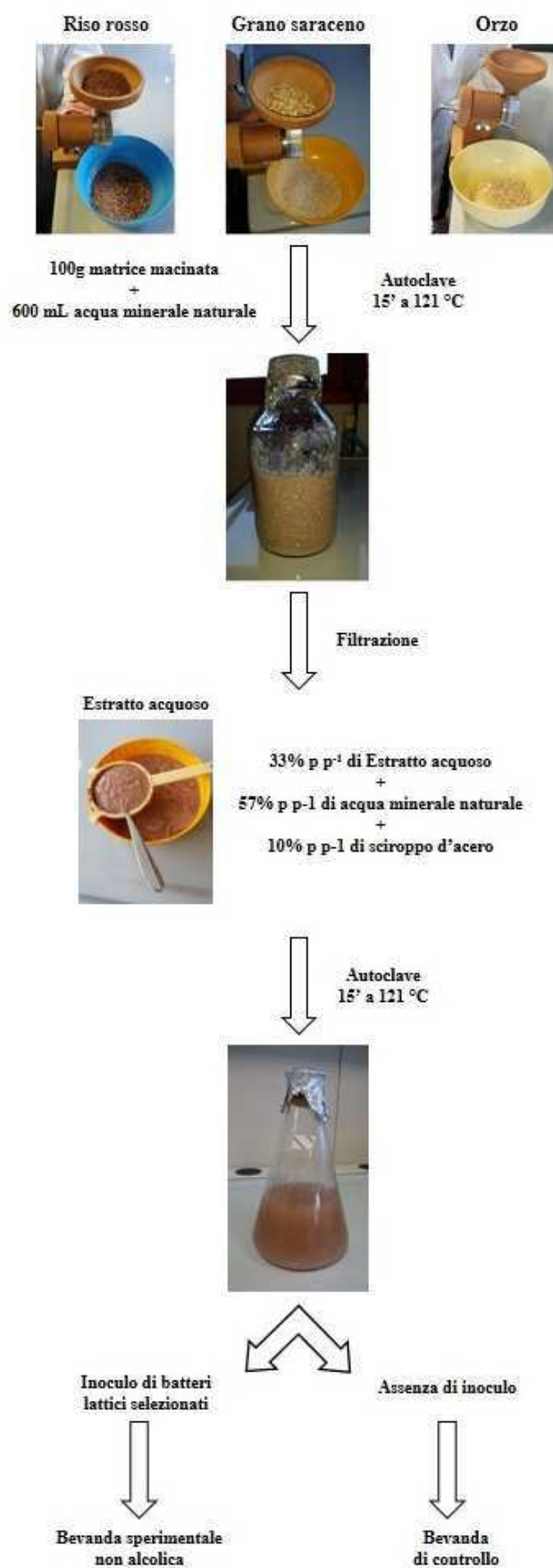


**Figura V.1.** Diagramma di flusso del processo produttivo delle bevande a base di riso rosso, grano saraceno e orzo.

### 3.3.2. Analisi sensoriale

Al termine delle 24 h di incubazione a 37 °C, i campioni di bevanda inoculata in monocultura in doppio, sono stati sottoposti ad analisi sensoriale, al fine di valutare i descrittori specifici quali cereale, vegetale, fruttato e tostato per l'odore e l'aroma, mentre per i sapori fondamentali sono stati valutati i descrittori quali dolce, acido ed amaro. Per ogni campione è stato inoltre determinato un giudizio complessivo di gradimento (*global liking*) sulla base di quanto presente nella scheda di gradimento fornita ai degustatori.

Il *panel* è stato eseguito da operatori non addestrati, ai quali è stato chiesto di esprimere un giudizio compreso tra 1 e 9 (Peryam & Pilgrim, 1957) per ogni descrittore valutato. Ogni campione è stato somministrato a temperatura di incubazione, ~37 °C, seguendo uno schema monadico sequenziale.

### 3.4. Allestimento delle precolture

Per l'allestimento delle colture (pre-colture) da utilizzare per l'inoculo delle tre bevande sperimentali, le colture pure selezionate in relazione alle migliori *performance* fermentative rispetto ad ogni singola matrice, sono state inoculate in doppio in provette sterili contenenti 10 mL di substrato di fermentazione allestito come descritto nel paragrafo 3.2.

Per l'inoculo, le singole monoculture di interesse sono state prelevate con un'ansa monouso da 1 µL da una coltura pura su terreno MRSA incubata a 37 °C per 48 ore. Al fine di valutare l'effettiva vitalità delle colture batteriche e il raggiungimento di una concentrazione cellulare  $\geq 10^6$  UFC g<sup>-1</sup> (nella bevanda inoculata al tempo 0), a seguito dell'incubazione delle precolture a 37 °C per 48 ore, sono state allestite conte vitali in piastra su terreno MRSA per la determinazione della concentrazione di batteri lattici utilizzati come inoculo per le bevande sperimentali prodotte, come descritto nel paragrafo 3.5.1.

### 3.5. Preparazione delle bevande e analisi durante la shelf life

Per ogni substrato utilizzato, due *batches* (1 L ciascuno) di ogni bevanda sono stati inoculati con le colture pure selezionate nelle prove preliminari ad una concentrazione cellulare  $\geq 10^6$  UFC g<sup>-1</sup>, mentre due *batches* sono stati refrigerati immediatamente dopo la preparazione e considerati controlli negativi.

Al fine di valutare la vitalità e la stabilità delle colture batteriche inoculate in *mix* in ciascuna bevanda ottenuta rispettivamente dai tre substrati analizzati, e la caratterizzazione della bevanda durante il periodo di *shelf life* (31 giorni), i due *batches* inoculati sono stati sottoposti a enumerazione dei batteri lattici in piastra, analisi bromatologiche, valutazione del pH, del profilo sensoriale, determinazione dell'acidità totale titolabile e del contenuto in fitati e acido fitico durante la conservazione in condizioni di refrigerazione (4 °C).

In particolare, per quanto riguarda la determinazione della vitalità cellulare e del pH, le analisi sono state eseguite a 0, 24 h di fermentazione e 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 24, 27, 29 e 31 giorni di *shelf life*. Mentre le analisi per la determinazione dell'acidità totale titolabile, del contenuto in fitati, delle caratteristiche bromatologiche e del profilo sensoriale sono state condotte esclusivamente al termine del periodo di *shelf life* delle bevande stesse. La valutazione del pH e del profilo sensoriale sono state condotte analogamente a quanto descritto nel paragrafo 3.3.1 e 3.3.2 rispettivamente.

#### *3.5.1. Determinazione della vitalità cellulare*

Per la determinazione della carica e della vitalità cellulare, 1 mL di ogni precoltura allestita per la fermentazione della bevanda e di ogni bevanda inoculata è stato utilizzato per l'allestimento di diluizioni seriali decimali in soluzione acquosa peptonata sterile (0,1 % peptone,  $p^{-1}$ ). Aliquote di 100  $\mu$ L di ciascuna diluizione decimale sono state quindi seminate in doppio su terreno MRSA incubato a 37 °C per 48h in condizioni di aerobiosi per l'enumerazione dei lattobacilli (De Man *et al.*, 1960).

#### *3.5.2. Determinazione dell'acidità totale titolabile (Total titratable acidity-TTA)*

Per la determinazione dell'acidità totale titolabile, 10 g di bevanda sono stati posti in un *becker* e addizionati di 90 mL di acqua deionizzata, la sospensione così ottenuta, omogeneizzata con un agitatore magnetico, è stata titolata con NaOH 0,1 N, fino al raggiungimento di un valore di pH pari a 8,3 (Minervini *et al.*, 2012).

L'acidità totale titolabile è stata espressa come mL di NaOH 0,1 N utilizzati.

### 3.5.3. Determinazione del contenuto di fosforo totale e di acido fitico

La determinazione del contenuto di fosforo totale e di acido fitico è stata condotta sulle materie prime utilizzate, riso rosso, grano saraceno ed orzo, sottoposte a macinatura a mano, sulle bevande fermentate dalle colture di batteri lattici selezionate e inoculate e sulle bevande non fermentate mantenute come controllo.

La determinazione è stata effettuata con il kit commerciale *Phytic Acid (Phytate)/Total Phosphorus* (Megazyme International Ireland, Wicklow, Irlanda) seguendo il protocollo operativo specifico fornito dalla ditta produttrice.

### 3.5.4. Analisi bromatologiche

Le bevande fermentate e non fermentate a base di riso rosso, grano saraceno e orzo sono state analizzate da un laboratorio accreditato esterno (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Sezione di Perugia) al fine di determinare sostanza secca, proteine, lipidi, carboidrati, fibra alimentare e ceneri. In dettaglio, la sostanza secca e le ceneri sono state valutate con esame gravimetrico sulla base della norma PRT.PGCHIM.206 Rev. 008 2015 e PRT.PGBT.202 Rev. 000 2007 rispettivamente. I lipidi sono stati definiti con estrazione eterea (PRT.PGBT.204 Rev. 001 2017), le proteine sono state determinate con il metodo Kjeldahl (PRT.PGBT.248 Rev. 001 2017), i carboidrati sono stati determinati attraverso un calcolo matematico in conformità alla norma PRT.PGBT.246 Rev. 001 2010, infine la fibra alimentare è stata definita con un metodo gravimetrico/Kjeldahl AOAC 991.43

### 3.6. Analisi statistica

I dati relativi a pH e indice di gradimento relativi ai singoli isolati analizzate nelle prove preliminari, pH, acidità totale titolabile, contenuto in acido fitico e fosforo totale e valutazione sensoriale delle bevande fermentate sono stati confrontati mediante analisi della varianza ad un via (ANOVA) sulla base del Tukey test ( $\alpha = 0,05$ ). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il *software* Statistica 7 (StatSoft, Dell, Round Rock, Texas, Stati Uniti).

## 4. Risultati

### 4.1. Prove preliminari

#### 4.1.1. Valutazione dell'attività fermentativa delle colture di batteri lattici

Le matrici da sottoporre a fermentazione, utilizzate per l'allestimento delle prove preliminari, hanno mostrato un valore di pH iniziale pari a  $7,02 \pm 0,83$ ,  $7,35 \pm 0,24$  e  $6,23 \pm 0,30$  rispettivamente per il riso rosso, grano saraceno ed orzo.

I valori di pH ottenuti dalla misurazione a 8 e 24 h di fermentazione delle monoculture di batteri lattici analizzate rispetto ai tre diversi substrati di fermentazione sono riportate in Tabella V.2.

| Isolato                                   | Riso rosso           |                        | Grano saraceno         |                       | Orzo                 |                   |
|-------------------------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|-------------------|
|                                           | pH (8h)              | pH (24h)               | pH (8h)                | pH (24h)              | pH (8h)              | pH (24h)          |
| BZ2 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | $5,33 \pm 0,00^{ab}$ | $4,72 \pm 0,36^{abcd}$ | $4,78 \pm 0,18^d$      | $4,43 \pm 0,17^{cde}$ | $4,35 \pm 0,04^{ab}$ | $4,12 \pm 0,18^a$ |
| BZ5 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | $5,37 \pm 0,02^{ab}$ | $4,68 \pm 0,15^{abcd}$ | $4,46 \pm 0,38^d$      | $4,42 \pm 0,21^{cde}$ | $4,40 \pm 0,19^{ab}$ | $4,06 \pm 0,13^a$ |
| BZ10 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | $5,74 \pm 0,64^{ab}$ | $4,39 \pm 0,12^{abcd}$ | $5,55 \pm 0,54^{abcd}$ | $4,01 \pm 0,28^{de}$  | $5,25 \pm 0,26^{ab}$ | $3,82 \pm 0,12^a$ |
| BZ21 <i>Lactobacillus casei</i>           | $5,55 \pm 0,06^{ab}$ | $4,46 \pm 0,39^{abcd}$ | $5,42 \pm 0,38^{abcd}$ | $3,77 \pm 0,05^e$     | $5,54 \pm 0,06^{ab}$ | $4,33 \pm 1,04^a$ |
| BZ22 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | $5,65 \pm 0,29^{ab}$ | $4,55 \pm 0,13^{abcd}$ | $5,35 \pm 0,37^{abcd}$ | $4,08 \pm 0,08^{de}$  | $5,21 \pm 0,22^{ab}$ | $4,06 \pm 0,29^a$ |
| BZ26 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | $5,86 \pm 0,12^{ab}$ | $4,52 \pm 0,28^{abcd}$ | $7,17 \pm 0,16^a$      | $4,99 \pm 0,43^{cde}$ | $5,05 \pm 0,43^{ab}$ | $4,22 \pm 0,33^a$ |
| BZ28 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | $6,12 \pm 0,63^{ab}$ | $4,84 \pm 0,14^{abcd}$ | $7,05 \pm 0,18^{ab}$   | $6,70 \pm 0,30^{ab}$  | $5,58 \pm 1,15^{ab}$ | $4,77 \pm 1,51^a$ |
| BZ30 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | $6,71 \pm 0,42^{ab}$ | $5,39 \pm 0,63^a$      | $6,31 \pm 1,37^{abcd}$ | $5,28 \pm 1,57^{bcd}$ | $6,03 \pm 0,61^{ab}$ | $5,17 \pm 0,59^a$ |
| BZ31 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | $5,42 \pm 0,61^{ab}$ | $4,45 \pm 0,23^{abcd}$ | $5,30 \pm 0,69^{abcd}$ | $4,22 \pm 0,03^{de}$  | $4,77 \pm 0,11^{ab}$ | $3,91 \pm 0,12^a$ |
| BZ32 <i>Lactobacillus buchneri</i>        | $5,54 \pm 0,20^{ab}$ | $4,66 \pm 0,18^{abcd}$ | $6,82 \pm 0,49^{abc}$  | $5,85 \pm 1,18^{abc}$ | $5,55 \pm 0,37^{ab}$ | $4,16 \pm 0,19^a$ |
| BZ33 <i>Lactobacillus casei</i>           | $5,3 \pm 0,14^b$     | $3,97 \pm 0,15^d$      | $5,53 \pm 0,08^{abcd}$ | $3,71 \pm 0,10^e$     | $5,23 \pm 0,75^{ab}$ | $3,82 \pm 0,23^a$ |
| BZ34 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | $5,15 \pm 0,02^b$    | $4,11 \pm 0,04^{cd}$   | $5,38 \pm 0,02^{abcd}$ | $3,73 \pm 0,11^e$     | $5,17 \pm 0,33^{ab}$ | $3,69 \pm 0,15^a$ |
| BZ35 <i>Lactobacillus casei</i>           | $6,05 \pm 0,14^{ab}$ | $4,26 \pm 0,29^{bcd}$  | $5,85 \pm 0,47^{abcd}$ | $4,13 \pm 0,24^{de}$  | $5,92 \pm 0,77^{ab}$ | $4,29 \pm 0,48^a$ |
| BZ36 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | $5,17 \pm 0,66^b$    | $4,38 \pm 0,13^{abcd}$ | $5,31 \pm 0,39^{abcd}$ | $4,33 \pm 0,08^{de}$  | $5,25 \pm 0,61^{ab}$ | $3,98 \pm 0,12^a$ |
| BZ37 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | $5,39 \pm 0,41^{ab}$ | $4,53 \pm 0,23^{abcd}$ | $5,17 \pm 0,59^{bcd}$  | $4,29 \pm 0,08^{de}$  | $5,34 \pm 0,00^{ab}$ | $4,04 \pm 0,24^a$ |
| BZ38 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | $5,28 \pm 0,61^b$    | $4,47 \pm 0,22^{abcd}$ | $5,09 \pm 0,35^{cd}$   | $4,34 \pm 0,05^{de}$  | $5,03 \pm 0,32^{ab}$ | $4,08 \pm 0,21^a$ |
| BZ39 <i>Pediococcus parvulus</i>          | $6,94 \pm 0,30^a$    | $5,31 \pm 1,12^{ab}$   | $6,94 \pm 0,14^{abc}$  | $4,46 \pm 0,21^{cde}$ | $5,94 \pm 0,71^{ab}$ | $4,47 \pm 0,95^a$ |
| BZ43 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | $5,45 \pm 0,02^{ab}$ | $4,61 \pm 0,14^{abcd}$ | $4,74 \pm 0,13^d$      | $4,28 \pm 0,29^{de}$  | $4,22 \pm 0,01^b$    | $4,01 \pm 0,18^a$ |
| BZ44 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | $5,69 \pm 0,47^{ab}$ | $4,40 \pm 0,27^{abcd}$ | $5,19 \pm 0,66^{bcd}$  | $4,11 \pm 0,16^{de}$  | $4,57 \pm 0,26^{ab}$ | $3,98 \pm 0,42^a$ |
| BZ47 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | $5,44 \pm 0,24^{ab}$ | $4,11 \pm 0,27^{cd}$   | $5,22 \pm 0,27^{bcd}$  | $3,72 \pm 0,04^e$     | $5,11 \pm 0,06^{ab}$ | $3,83 \pm 0,12^a$ |
| CBL 35 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>     | $5,70 \pm 0,27^{ab}$ | $3,88 \pm 0,10^d$      | $6,93 \pm 0,16^{abc}$  | $6,97 \pm 0,23^a$     | $6,13 \pm 0,13^a$    | $3,92 \pm 0,07^a$ |
| CBL 53 <i>Streptococcus thermophilus</i>  | $5,47 \pm 0,11^{ab}$ | $5,09 \pm 0,15^{abc}$  | $5,20 \pm 0,14^{bcd}$  | $4,58 \pm 0,40^{cde}$ | $5,32 \pm 0,00^{ab}$ | $4,28 \pm 0,02^a$ |
| DSM 25784 <i>Weissella oryzae</i>         | $6,47 \pm 0,88^{ab}$ | $5,41 \pm 0,05^a$      | $5,89 \pm 0,52^{abcd}$ | $4,95 \pm 0,19^{cde}$ | $5,47 \pm 0,71^{ab}$ | $5,15 \pm 1,08^a$ |

**Tabella V.2.** Valori di pH rilevati a 8 e 24 h di fermentazione espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Dall'analisi dei dati riportati in tabella emerge come ad 8 h di fermentazione pochi isolati hanno un'elevata attività acidificante in grado di produrre una riduzione del pH a valori  $\leq 4,8$ . In particolare, per la matrice riso rosso nessun isolato è in grado di raggiungere tale soglia, mentre per il grano saraceno si evidenzia una forte

attività acidificante a 8 h solo per gli isolati BZ2-*Lactobacillus fermentum*, BZ5-*Lactobacillus fermentum*, e BZ43-*Lactobacillus coryniformis*. Questi isolati, assieme a BZ31-*Lactobacillus parabuchneri* e BZ44-*Lactobacillus coryniformis* hanno evidenziato un'evidente attività acidificante anche sulla matrice orzo.

I pH registrati a 24 h di fermentazione hanno invece mostrato una situazione nettamente diversa per tutte le matrici in studio. La maggior parte degli isolati, infatti, è stata in grado di acidificare il mezzo al di sotto del valore soglia, ad eccezione di BZ39-*Pediococcus parvulus*, CBL53-*Streptococcus thermophilus* per il riso rosso, BZ26-*Lactobacillus parabuchneri*, BZ28-*Lactobacillus parabuchneri*, BZ32-*Lactobacillus buchneri*, CBL35-*Lactobacillus rhamnosus* per il grano saraceno.

Mentre, gli isolati BZ30-*Lactobacillus parabuchneri* e DSM25784-*Weissella oryzae* non sono stati in grado di acidificare nessuna delle matrici analizzate.

#### 4.1.2. Valutazione del profilo sensoriale

La valutazione del profilo sensoriale di ogni isolato rispetto alle tre matrici analizzate è riportata rispettivamente nell' Appendice V.1 per il riso rosso, V.2 per il grano saraceno e V.3 per l'orzo; mentre i valori di apprezzamento complessivo (*global liking*) relativi alla bevanda a base di riso rosso, grano saraceno e orzo sono riportati nelle Tabella V.3.

Sulla base dei dati raccolti nelle prove preliminari e dal confronto dei valori di pH raggiunti dopo 24 h di fermentazione e del valore di gradimento globale pari o superiore ad un punteggio di 7, sono state selezionate, per ogni substrato, un massimo di 4 colture da usare in *mix* come starter per la fermentazione delle bevande stesse.

In particolare per la fermentazione della bevanda a base di riso rosso sono state selezionate le colture:

- ✓ BZ22-*Lactobacillus paracasei*,
- ✓ BZ33-*Lactobacillus casei*,
- ✓ BZ44-*Lactobacillus coryniformis*,
- ✓ CBL35-*Lactobacillus rhamnosus*.

Per la bevanda a base di grano saraceno sono state selezionate esclusivamente le tre colture che hanno mostrato valori di gradimento pari o al di sopra del limite definito, quali:

- ✓ BZ21-*Lactobacillus casei*,

- ✓ BZ22-*Lactobacillus paracasei*,
- ✓ BZ35-*Lactobacillus casei*.

Mentre per la bevanda a base di orzo le colture selezionate sono state:

- ✓ BZ33-*Lactobacillus casei*,
- ✓ BZ34-*Lactobacillus casei/paracasei*,
- ✓ BZ47-*Lactobacillus casei/paracasei*,
- ✓ CBL35-*Lactobacillus rhamnosus*.

| Isolato                                   | Global liking                |                             |                            |
|-------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
|                                           | Riso rosso                   | Grano saraceno              | Orzo                       |
| BZ2 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 6,50 ± 0,50 <sup>abcde</sup> | 3,67 ± 0,58 <sup>ef</sup>   | 6,33 ± 0,58 <sup>abc</sup> |
| BZ5 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 5,42 ± 0,38 <sup>efgh</sup>  | 5,00 ± 0,00 <sup>cde</sup>  | 3,33 ± 1,53 <sup>d</sup>   |
| BZ10 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 7,08 ± 0,88 <sup>abc</sup>   | 6,00 ± 0,00 <sup>abcd</sup> | 5,67 ± 0,53 <sup>bc</sup>  |
| BZ21 <i>Lactobacillus casei</i>           | 7,17 ± 0,76 <sup>abc</sup>   | 7,00 ± 0,50 <sup>a</sup>    | 1,00 ± 0,00 <sup>e</sup>   |
| BZ22 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 7,25 ± 0,25 <sup>ab</sup>    | 7,25 ± 0,43 <sup>a</sup>    | 6,00 ± 0,00 <sup>bc</sup>  |
| BZ26 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 7,00 ± 0,00 <sup>abcd</sup>  | 3,33 ± 0,58 <sup>f</sup>    | 6,00 ± 0,00 <sup>bc</sup>  |
| BZ28 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 6,17 ± 0,29 <sup>bcde</sup>  | 1,00 ± 0,00 <sup>g</sup>    | 4,67 ± 0,58 <sup>cd</sup>  |
| BZ30 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 4,50 ± 0,50 <sup>gh</sup>    | 3,33 ± 1,15 <sup>f</sup>    | 5,00 ± 1,00 <sup>cd</sup>  |
| BZ31 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 7,00 ± 0,00 <sup>abcd</sup>  | 6,33 ± 0,58 <sup>abc</sup>  | 1,00 ± 0,00 <sup>e</sup>   |
| BZ32 <i>Lactobacillus buchneri</i>        | 7,67 ± 0,29 <sup>a</sup>     | 1,00 ± 0,00 <sup>g</sup>    | 1,00 ± 0,00 <sup>e</sup>   |
| BZ33 <i>Lactobacillus casei</i>           | 7,83 ± 0,29 <sup>a</sup>     | 6,17 ± 0,29 <sup>abcd</sup> | 7,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>  |
| BZ34 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 6,50 ± 0,00 <sup>abcde</sup> | 6,00 ± 0,00 <sup>abcd</sup> | 7,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>  |
| BZ35 <i>Lactobacillus casei</i>           | 7,33 ± 0,58 <sup>ab</sup>    | 7,00 ± 0,00 <sup>a</sup>    | 5,67 ± 0,58 <sup>bc</sup>  |
| BZ36 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 5,58 ± 0,63 <sup>efgh</sup>  | 5,00 ± 0,00 <sup>cde</sup>  | 4,67 ± 0,58 <sup>cd</sup>  |
| BZ37 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 7,00 ± 0,00 <sup>abcd</sup>  | 5,33 ± 0,29 <sup>cd</sup>   | 3,67 ± 1,15 <sup>d</sup>   |
| BZ38 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 5,67 ± 0,58 <sup>defgh</sup> | 5,83 ± 0,29 <sup>abcd</sup> | 4,67 ± 0,58 <sup>cd</sup>  |
| BZ39 <i>Pediococcus parvulus</i>          | 6,58 ± 0,38 <sup>abcde</sup> | 5,50 ± 0,50 <sup>bcd</sup>  | 5,00 ± 0,00 <sup>cd</sup>  |
| BZ43 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 5,83 ± 0,29 <sup>cdefg</sup> | 4,83 ± 0,76 <sup>de</sup>   | 5,00 ± 0,00 <sup>cd</sup>  |
| BZ44 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 7,00 ± 0,50 <sup>abcd</sup>  | 5,33 ± 0,58 <sup>cd</sup>   | 5,50 ± 0,87 <sup>bc</sup>  |
| BZ47 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 7,00 ± 0,00 <sup>abcd</sup>  | 6,83 ± 0,29 <sup>ab</sup>   | 7,00 ± 0,00 <sup>ab</sup>  |
| CBL35 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>      | 7,42 ± 0,14 <sup>ab</sup>    | 1,00 ± 0,00 <sup>g</sup>    | 7,83 ± 0,29 <sup>a</sup>   |
| CBL53 <i>Streptococcus thermophilus</i>   | 5,00 ± 0,00 <sup>fgh</sup>   | 6,17 ± 0,29 <sup>abcd</sup> | 6,17 ± 0,29 <sup>abc</sup> |
| DSM25784 <i>Weissella oryzae</i>          | 4,33 ± 0,58 <sup>h</sup>     | 5,83 ± 0,76 <sup>abcd</sup> | 1,00 ± 0,00 <sup>e</sup>   |

**Tabella V.3** Valori di *global liking* calcolati come media ± deviazione standard dei valori ottenuti dall'analisi sensoriale. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4.2. Analisi delle bevande

### 4.2.1. Monitoraggio della vitalità cellulare

Il monitoraggio della vitalità cellulare delle colture di batteri lattici inoculati come starter nelle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo è mostrato in Figura V.3. Dall'analisi dei dati si evince come l'andamento della vitalità cellulare della popolazione microbica nelle tre bevande sia piuttosto simile, con valori iniziali di carica batterica pari a  $\sim 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> che si innalzano nelle prime 24 h (1g) fino a raggiungere valori attorno di  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> per la bevanda a base di grano saraceno ed orzo e leggermente inferiori per la bevanda a base di riso rosso ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>). La valutazione della vitalità cellulare delle colture di batteri lattici inoculate in *mix* nelle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo ha permesso di evidenziare un elevato grado di stabilità della popolazione microbica stessa, mostrando valori pressoché costanti durante tutto il periodo di conservazione di 31 giorni, per le bevande prodotte con il medesimo substrato.

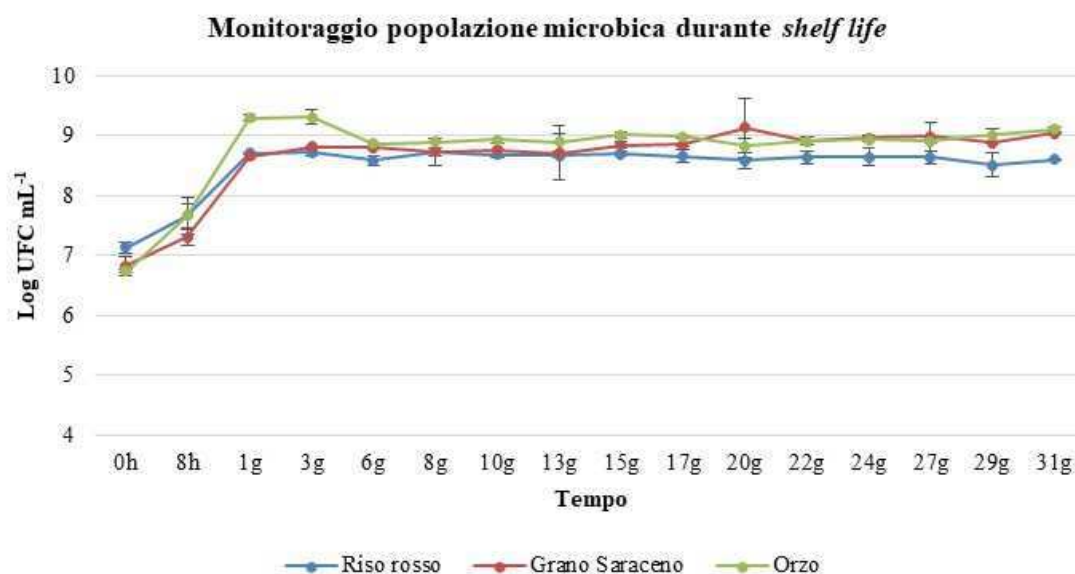


**Figure V.3.** Monitoraggio della vitalità cellulare delle colture di batteri lattici inoculate nelle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo durante il periodo di *shelf life* del prodotto.

#### 4.2.2. Valutazione del pH

Il monitoraggio del pH delle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo condotto durante tutto il periodo di *shelf life* è mostrato in Figura V.4. Dall'analisi dei dati si evince come per tutte le bevande in studio il pH, che inizialmente si aggira attorno alla neutralità (T0), scenda rapidamente dopo le prime 24 h di fermentazione a valori prossimi a 4. In particolare, per le bevande a base di riso rosso il pH permane attorno a tale valore fino alla fine della *shelf life*, mentre per le bevande a base di grano saraceno e orzo si assiste ad un maggiore decremento del pH, raggiungendo valori leggermente superiori a 3. Durante tutto il periodo di *shelf life* è inoltre possibile evidenziare un mantenimento del pH su valori costanti e quasi totalmente invariati per tutte le bevande in analisi.

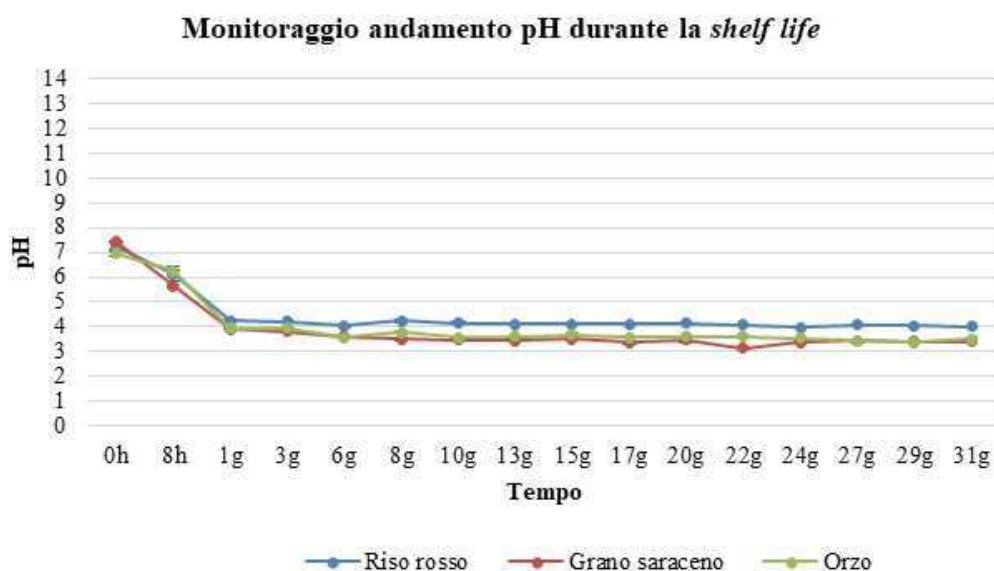


**Figura V.4.** Monitoraggio del pH durante la *shelf life* delle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo, inoculate con i batteri lattici selezionati, usati come colture starter.

#### 4.2.3. Determinazione dell'acidità totale titolabile

I valori di acidità totale titolabile determinati per le bevande a base di riso rosso, grano saraceno e orzo in studio, sono riportati in Tabella V.4.

|                | T0g               | T31g                |
|----------------|-------------------|---------------------|
| Riso rosso     | $0,13 \pm 0,01^c$ | $1,64 \pm 0,07^c$ * |
| Grano saraceno | $2,65 \pm 0,13^a$ | $7,60 \pm 0,18^a$ * |
| Orzo           | $2,13 \pm 0,05^b$ | $4,95 \pm 0,13^b$ * |

**Tabella V.4.** Dati relativi alla determinazione dei valori di acidità totale titolabile nelle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo a tempo 0 giorni (T0g, inoculo della bevanda) e 31 giorni (T31g, fine del periodo di *shelf life*). I valori sono espressi come media mL di NaOH 0,1 N  $\pm$  deviazione standard. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Confrontando i dati ottenuti dall'analisi dell'acidità totale titolabile durante il periodo di *shelf life*, è stato possibile osservare valori statisticamente diversi tra le bevande in studio.

In particolare, mentre le differenze in valore assoluto risultano più contenute nel momento della produzione delle bevande (T0 g), al termine del periodo di conservazione delle bevande le differenze sono risultate estremamente più elevate e marcate con un valore di l'acidità totale titolabile pari a 1,64 mL di NaOH 0,1 N per le bevande a base di riso rosso, un valore pari a 4,95 mL di NaOH 0,1 N per le bevande a base di orzo e un valore pari a 7,60 mL di NaOH 0,1 N per le bevande a base di grano saraceno. Inoltre, è stato possibile evidenziare come l'incremento di acidi organici nelle bevande sia evidentemente differenziato in base al tipo di substrato di fermentazione e alle colture di batteri lattici inoculati. In particolare, infatti, mentre le bevande a base di riso rosso si mantengono costantemente entro valori piuttosto bassi, le bevande a base di grano saraceno e orzo subiscono un evidente incremento. Analizzando esclusivamente quest'ultime due tipologie di bevande, è possibile evidenziare come l'incremento di acidità totale titolabile sia meno marcato, seppur evidente, per le bevande a base di orzo con un raddoppiamento del valore analizzato, mentre per le bevande a base di grano saraceno il valore di acidità totale titolabile risulta triplicato rispetto al valore di partenza.

#### 4.2.4. Determinazione del contenuto di fosforo totale e di acido fitico

Il contenuto di fosforo totale e di acido fitico determinato i) nelle farine ottenute dalla macinazione di riso rosso, grano saraceno ed orzo, ii) nelle bevande ottenute dall'inoculo delle culture di batteri lattici usate come starter e iii) nelle bevande di controllo prodotte senza inoculo di batteri lattici è mostrato in Tabella V.5.

| Substrato      | Campione             | Fosforo totale<br>g 100g <sup>-1</sup> | Acido fitico<br>g 100g <sup>-1</sup> |
|----------------|----------------------|----------------------------------------|--------------------------------------|
| Riso rosso     | Farina               | 0,089 ± 0,028 <sup>a</sup>             | 0,314 ± 0,099 <sup>a</sup>           |
|                | Bevanda              | 0,024 ± 0,026 <sup>a</sup>             | 0,084 ± 0,091 <sup>a</sup>           |
|                | Bevanda di controllo | 0,007 ± 0,010 <sup>a</sup>             | 0,026 ± 0,034 <sup>a</sup>           |
| Grano saraceno | Farina               | 0,121 ± 0,087 <sup>a</sup>             | 0,428 ± 0,308 <sup>a</sup>           |
|                | Bevanda              | 0,042 ± 0,003 <sup>a</sup>             | 0,147 ± 0,010 <sup>a</sup>           |
|                | Bevanda di controllo | 0,033 ± 0,007 <sup>a</sup>             | 0,115 ± 0,025 <sup>a</sup>           |
| Orzo           | Farina               | 0,115 ± 0,009 <sup>a</sup>             | 0,407 ± 0,031 <sup>a</sup>           |
|                | Bevanda              | 0,067 ± 0,000 <sup>a</sup>             | 0,196 ± 0,147 <sup>a</sup>           |
|                | Bevanda di controllo | 0,055 ± 0,041 <sup>a</sup>             | 0,238 ± 0,000 <sup>a</sup>           |

**Tabella V.5.** Determinazione di fosforo totale e di acido fitico nelle tre matrici analizzate, riso rosso, grano saraceno ed orzo, nelle bevande prodotte come controllo, senza inoculo di batteri lattici, e nelle bevande inoculate con le culture di batteri lattici selezionate. I valori sono espressi come media ± deviazione standard. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative tra i campioni secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

L'analisi statistica ha mostrato assenza di differenze significative tra i campioni di farina, bevande fermentate e bevande non fermentate rispetto ad ogni substrato in analisi sia per quanto riguarda il contenuto di fosforo totale sia per quanto riguarda il contenuto di acido fitico.

#### 4.2.5. Analisi bromatologiche

I dati relativi alle analisi bromatologiche eseguite sulle bevande inoculate con le colture di batteri lattici selezione e sulle bevande di controllo, non inoculate, sono mostrati in Tabella V.6.

Tutte le bevande analizzate mostrano totale assenza di lipidi e una quantità di fibra alimentare non significativamente diversa, che si attesta tra valori compresi da  $0,93 \pm 0,35$  g 100 g<sup>-1</sup> a  $1,19 \pm 0,11$  g 100 g<sup>-1</sup>. Per quanto riguarda la quantità di sostanza secca (%) delle tre diverse tipologie di bevande, questa si attesta su valori compresi tra  $9,05 \pm 0,07$  e  $10,73 \pm 0,01$ . Dall'analisi della sostanza secca si evidenziano differenze significative tra le tre tipologie di bevande prodotte con riso rosso, grano saraceno e orzo, mentre non si evidenziano differenze significative tra le bevande inoculate ed i rispettivi controlli rispetto alla medesima materia prima.

Un andamento analogo può essere riscontrato anche per il contenuto in carboidrati, per il quale si evidenzia una concentrazione zuccherina più bassa per le bevande prodotte a base di grano saraceno ( $\sim 8 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ) ed un contenuto più alto nelle bevande a base di riso rosso ( $\sim 10 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ ). Analogamente al caso precedente, non si evidenziano differenze tra le bevande inoculate e le bevande di controllo rispetto alla stessa matrice analizzata. Infine, per quanto riguarda il contenuto in ceneri, si evidenzia l'assenza di differenze significative ad eccezione della bevanda di controllo a base di riso rosso, la quale risulta essere l'unica statisticamente diversa dalle altre.

|                |           | Sostanza Secca<br>%  | Proteine<br>$\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ | Carboidrati<br>$\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ | Fibra Alimentare<br>$\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ | Ceneri<br>$\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ |
|----------------|-----------|----------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Riso Rosso     | Bevanda   | $10.73 \pm 0.01^a$   | $0.28 \pm 0.01^{ab}$                       | $10.31 \pm 0.01^a$                            | $1.15 \pm 0.17^a$                                  | $0.12 \pm 0.00^b$                        |
|                | Controllo | $10.61 \pm 0.08^a$   | $0.22 \pm 0.00^{bc}$                       | $10.22 \pm 0.05^a$                            | $1.01 \pm 0.46^a$                                  | $0.16 \pm 0.01^a$                        |
| Grano Saraceno | Bevanda   | $9.05 \pm 0.07^d$    | $0.28 \pm 0.00^a$                          | $8.61 \pm 0.08^c$                             | $0.94 \pm 0.32^a$                                  | $0.12 \pm 0.01^b$                        |
|                | Controllo | $9.26 \pm 0.18^{cd}$ | $0.24 \pm 0.00^{abc}$                      | $8.87 \pm 0.17^{bc}$                          | $0.93 \pm 0.35^a$                                  | $0.11 \pm 0.01^b$                        |
| Orzo           | Bevanda   | $9.81 \pm 0.01^b$    | $0.23 \pm 0.02^{abc}$                      | $9.28 \pm 0.23^b$                             | $1.11 \pm 0.18^a$                                  | $0.11 \pm 0.00^b$                        |
|                | Controllo | $9.60 \pm 0.01^{bc}$ | $0.19 \pm 0.03^c$                          | $9.29 \pm 0.01^b$                             | $1.19 \pm 0.11^a$                                  | $0.11 \pm 0.00^b$                        |

**Tabella V.6.** Analisi bromatologiche eseguite sulle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo inoculate con le colture di batteri lattici selezionati e non inoculate. I valori sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Le diverse lettere sulla stessa colonna indicano differenze significative tra i campioni secondo il test di Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

#### 4.2.6. Profilo sensoriale

L'analisi del profilo sensoriale delle bevande a base di riso rosso, grano saraceno e orzo al termine del periodo di *shelf life* è mostrata in Figura V.5.

Per quanto riguarda la valutazione dell'odore è possibile evidenziare differenze statistiche tra tutti i descrittori analizzati per le tre bevande sperimentali in studio. In particolare, per i descrittori cereale, fruttato e tostato si evidenziano differenze statistiche tra le bevande a base di riso rosso e le bevande a base di grano saraceno ed orzo. Diversamente si osservano differenze significative per il descrittore vegetale, tra le bevande a base di grano saraceno rispetto alle bevande a base di riso rosso e orzo. Per quanto riguarda l'aroma, è possibile evidenziare una differenza statistica tra le bevande a base di riso rosso e le bevande a base di grano saraceno e orzo per i descrittori cereale e tostato, mentre è possibile evidenziare una differenza statistica per il descrittore vegetale tra le bevande a base di grano saraceno e le bevande a base di riso rosso e orzo. Infine, per il descrittore fruttato è stato possibile evidenziare una differenza statistica tra le bevande a base di grano saraceno e riso rosso, seppur le due tipologie di bevanda non differiscano significativamente dalle bevande a base di orzo. Per quanto riguarda la valutazione dei sapori fondamentali, le tre bevande si differenziano tra loro in relazione ai descrittori dolce e acido, mentre non sono statisticamente diverse tra loro per quanto riguarda il descrittore amaro.

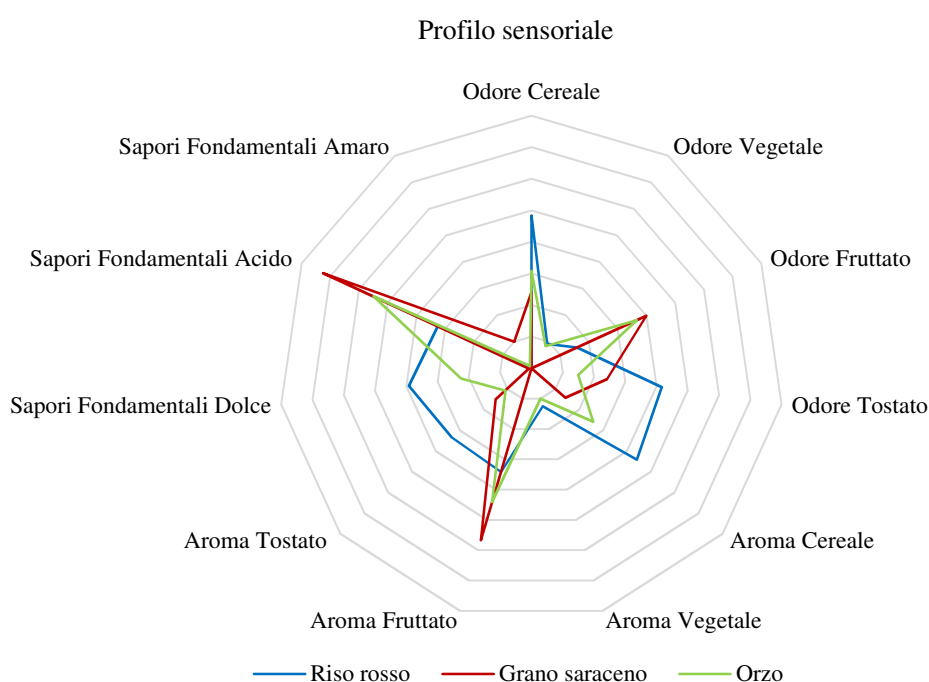


**Figura V.5.** Profilo sensoriale delle bevande a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo al termine del periodo di *shelf life*.

Dall'analisi sensoriale sono emerse differenze statistiche per quanto riguarda il gradimento delle bevande sperimentali a base di riso rosso, grano saraceno e orzo. Infatti, seppur tutte le bevande mostrano un grado di apprezzamento medio-alto, le tre tipologie di bevande si differenziano notevolmente tra loro; in particolare mentre le bevande a base di riso rosso sono risultate in assoluto le più apprezzate raggiungendo un valore di gradimento complessivo pari a  $8,4 \pm 0,6$ , le bevande a base di grano saraceno e orzo si sono attestate su valori più bassi pari rispettivamente a  $6,8 \pm 0,5$  e  $7,1 \pm 0,4$  in una scala di gradimento da 1 a 9.

## 5. Discussione e conclusione

Cibi e bevande fermentate a base di cereali sono prodotte e consumate fin dall'antichità in tutto il mondo sfruttando tecniche di produzione, materie prime e microrganismi diversi (Blandino *et al.*, 2013). Nella maggior parte dei casi, la produzione che viene condotta su piccola scala o addirittura a livello domestico, prevede una fermentazione spontanea guidata da colture miste di lieviti e batteri naturalmente presenti nelle materie prime, negli strumenti o negli ambienti di lavorazione (Nout, 2009; Coda *et al.*, 2011; Basinskiene *et al.*, 2016). Estremamente importante risulta essere il ruolo svolto dai batteri lattici, i quali non solo contribuiscono allo sviluppo delle proprietà sensoriali desiderate nel prodotto finale, ma contribuiscono notevolmente alla sicurezza microbiologica dell'alimento fermentato (Dalié *et al.*, 2010).

Lo studio dei prodotti fermentati tradizionali e lo studio della popolazione microbica naturalmente presente è fondamentale al fine di esplorare, migliorare e valorizzare specifiche proprietà funzionali (Basinskiene *et al.*, 2016). I batteri lattici, in particolare quelli selezionati e applicati come starter commerciali, si offrono come ottimi protagonisti per la produzione di prodotti funzionali innovativi, grazie alla loro capacità di produrre acidi organici e composti bioattivi, che mediante la loro azione antimicrobica (es. batteriocine) e antimicotica fungono da biopreservanti naturali (Dalié *et al.*, 2010; Nionelli *et al.*, 2014; Basinskiene *et al.*, 2016).

Attualmente sul mercato sono presenti molti prodotti con batteri lattici vivi spesso di natura lattiero-casearia che a volte risultano non utilizzabili da alcune categorie di consumatori. In un contesto sociale ed economico, dove sono sempre più diffuse alcune patologie come intolleranze al lattosio, allergie al latte, celiachia e ipercolesterolemia, lo studio di nuovi prodotti con potenziali proprietà funzionali risulta estremamente importante e di interesse per la comunità. In questo contesto i cereali si presentano come ottimi candidati per la produzione di alimenti e bevande funzionali (Waters *et al.*, 2013; Nionelli *et al.*, 2014; Basinskiene *et al.*, 2016; Salmerón *et al.*, 2017). Al fine di produrre nuovi alimenti fermentati con potenziali proprietà funzionali è importante valutare attentamente le materie prime da utilizzare come substrato fermentativo e le colture microbiche da usare come starter. La valutazione del profilo sensoriale rappresenta inoltre un'attività indispensabile al fine di produrre alimenti e/o bevande innovativi graditi al consumatore.

Molti sono gli studi condotti al fine di valutare la produzione di alimenti probiotici fermentati utilizzando come inoculo batteri lattici in coltura singola o in mix (Charalampopoulos *et al.*, 2003; Kedia *et al.*, 2008; Angelov *et al.*, 2006; Muyanja *et al.*, 2003; Helland *et al.*, 2004).

Coda e collaboratori, in uno studio condotto nel 2012 su cinque diverse bevande sperimentali vegetali, a base di miscele diverse di riso, orzo, farro e avena con caratteristiche simili allo yogurt, fermentate da due ceppi selezionati di *Lact. plantarum*, hanno mostrato caratteristiche chimico-fisiche analoghe a quelle oggetto della presente tesi di Dottorato. Dallo studio di Coda *et al.* (2012) è emersa inoltre una riduzione della vitalità cellulare a seguito della fermentazione, condotta per 8h a 30 °C, con valori attorno a 8,4 Log UFC g<sup>-1</sup> per tutte le bevande in studio al termine del periodo di *shelf life*. In particolare, mentre i valori di pH mostrati nello studio risultano in linea con quanto descritto nel presente lavoro per le tre bevande sperimentali non alcoliche a base di riso rosso, grano saraceno e orzo, stessa affermazione non può essere fatta per l'andamento delle popolazione di batteri lattici inoculati. Infatti, mentre nello studio di Coda *et al.* (2012) la popolazione di *Lact. plantarum* inoculata aumenta fino a valori di 9 Log UFC g<sup>-1</sup> a seguito delle 8 h di fermentazione per poi scendere progressivamente durante la conservazione, nel presente lavoro la carica di batteri lattici subisce un incremento meno rapido all'inizio della fermentazione, raggiungendo valori di 9 Log UFC g<sup>-1</sup>, solo dopo 24 h di fermentazione, ma tale valore viene mantenuto costante durante tutta la *shelf life* senza subire decrementi.

Nel presente studio, otto sono stati gli isolati identificati sulla base delle loro *performance* fermentative e del profilo sensoriale prodotto, appartenenti a quattro specie di batteri lattici: *Lact. rhamnosus*, *Lact. casei*, *Lact. paracasei* e *Lact. coryniformis*.

*Lact. rhamnosus* rappresenta una delle specie più comunemente utilizzata come starter nella produzione di alimenti fermentati, soprattutto in relazione alle sue elevate potenzialità come microrganismo probiotico (Tamine *et al.*, 2005; Shah, 2007).

La specie *Lact. casei*, comunemente utilizzata come starter commerciale nell'industria lattiero-casearia, è stata studiata negli ultimi anni per le sue potenzialità applicative nella produzione di alimenti fermentati a base di cereali, pseudocereali e legumi in relazione all'elevata adattabilità (Coda *et al.*, 2010; Passerini *et al.*, 2013).

La specie *Lact. paracasei* è una specie spesso identificata nella produzione lattiero-casearia, in campioni di Kefir (Garofalo *et al.*, 2015), nella produzione di molteplici altri alimenti come ad esempio le olive da tavola (Sisto & Lavermicocca, 2012), le salsicce (Pennacchia *et al.*, 2004) e soprattutto nella produzione di succhi di frutta o verdura (Champagne & Fustier, 2007).

La specie *Lact. coryniformis*, isolata frequentemente in ambiente lattiero-caseario (Rantsiou *et al.*, 2008; Carafa *et al.*, 2005; Aquilanti *et al.*, 2011, 2013; Aydemir *et al.*, 2015) e in alcuni prodotti della tradizione cinese

(Liu *et al.*, 2011), non ha attualmente nessuna applicazione in campo tecnologico come starter commerciale. La sua presenza, però, è stata ampiamente documentata in bevande a base di cereali e in particolare in campioni di Boza bulgara (Yeğin & Üren, 2008; Todorov, 2010; Altay *et al.*, 2013; Osimani *et al.*, 2015).

Considerando che tutte le bevande sono state prodotte con l'aggiunta della medesima concentrazione di sciroppo d'acero, utilizzato come substrato fermentescibile da tutte le colture di batteri lattici saggiati, l'isolato della specie *Lact. coryniformis* utilizzato nella sperimentazione non ha mostrato apparentemente buone capacità fermentative nei confronti di orzo e grano saraceno, mentre ha mostrato apprezzabili *performance* fermentative e sensoriali sulla matrice di riso rosso, indice probabilmente di una buona adattabilità su tale matrice. Quest'ultima matrice si è dimostrata essere un buon substrato fermentescibile per tutte le specie selezionate; infatti, oltre alla specie *Lact. coryniformis*, anche le specie *Lact. rhamnosus*, *Lact. casei* e *Lact. paracasei* si sono dimostrate in grado di fermentare efficacemente questo cereale, determinando la produzione di una bevanda ampiamente apprezzata dal *panel* di assaggiatori. Seppur il consumo di riso rosso sia ampiamente diffuso, non esistono studi relativi a bevande non alcoliche a base di questo cereale prodotte e sottoposte ad analisi di tipo chimico-fisico, bromatologiche e sensoriali. Dall'altro canto è sicuramente più documentata l'adattabilità della specie *Lact. casei* al riso bianco usato in moltissime preparazioni. Tale proprietà intrinseca è confermata in parte dallo studio condotto da Puerari e collaboratori nel 2015 sulla caratterizzazione fisico-chimica e microbiologica di una bevanda tradizionale prodotta dalla tribù Umutina (Brasile) a base di riso, analoga alla "chicha", a fermentazione spontanea. Nella bevanda è stata identificata la presenza della specie *Lact. casei* come unica specie autoctona appartenente al genere *Lactobacillus* presente nelle prime 18 h di fermentazione, evidenza questa della capacità di sopravvivenza e adattabilità al substrato stesso. Tale evidenza è confermata dalla presenza della specie *Lact. casei* anche in alimenti indiani prodotti a partire da riso o da alimenti prodotti attraverso la fermentazione spontanea combinata di riso e fagioli neri (*Phaseolus mungo*) (Ray *et al.*, 2016). Analogamente, la possibilità da parte di *Lact. rhamnosus* di fermentare una matrice a base di riso è stata recentemente sottolineata da uno studio condotto con lo scopo di valutare l'applicabilità di questa specie come agente probiotico nella fermentazione di *pudding* di riso senza lattosio. Lo studio ha mostrato la potenziale applicabilità di questa specie nella produzione di nuovi cibi funzionali a base di riso, confermando in tal senso l'obiettivo del presente lavoro (Williams & Hekmat, 2017). La specie *Lact. paracasei*, normalmente usata

nella produzione di succhi di mela (Pimentel *et al.*, 2016), di uva non alcolici (Altay *et al.*, 2013) e in succhi di pomodoro, arance, ananas e melograno (Champagne & Fustier, 2007; Marsh *et al.*, 2014).

L'elevato grado di adattabilità delle specie *Lact. rhamnosus*, *Lact. casei* e *Lact. paracasei* rispetto alla matrice di orzo, evidenziata dalle interessanti *performance* espresse durante le prove preliminari, è stato confermato dalla letteratura scientifica disponibile in merito alle bevande fermentate a base di orzo ed altri cereali (Gotcheva *et al.*, 2000; Todorov & Dicks, 2006; Botes *et al.*, 2007; Kivanç *et al.*, 2011; Osimani *et al.*, 2015). L'adattabilità di *Lact. rhamnosus* alla matrice di farina di orzo è stata dimostrata già in precedenza in uno studio condotto da Kocková e collaboratori (2013); nello studio la specie testata su varie matrici aveva mostrato elevata adattabilità anche alla farina di grano saraceno, ma tale dato non è stato confermato dal presente studio in quanto *Lact. rhamnosus* non è riuscito a soddisfare entrambi i parametri di selezione per le specie da usare come inoculo.

La matrice di grano saraceno si è dimostrata essere probabilmente complessa da metabolizzare dal punto di vista fermentativo in quanto solo due specie, con un totale di tre isolati si sono dimostrati capaci di utilizzarlo come substrato. La specie *Lact. paracasei* risulta particolarmente adattata alla crescita su farine di grano saraceno; in una sperimentazione condotta da Coman e collaboratori nel 2013, la farina di grano saraceno e di avena, aggiunte a latte intero, hanno permesso di migliorare la vitalità della specie probiotica inoculata. La competitività della specie su substrati costituiti da pseudocereali è stata dimostrata anche su matrici come gli impasti acidi nei quali *Lac. paracasei* si è dimostrato particolarmente competitivo in una matrice di impasti acido a base di grano saraceno (Vogelmann *et al.*, 2009). La specie *Lact. casei* già identificata in bevande tradizionali come la Boza (Gotcheva *et al.*, 2000; Todorov & Dicks, 2006; Botes *et al.*, 2007; Kivanç *et al.*, 2011; Osimani *et al.*, 2015), Hardaliye (Altay *et al.*, 2013), succo di Litchi (Zheng *et al.*, 2014) e altri succhi a base di frutta o vegetali (Champagne & Fustier, 2007) ha mostrato particolare adattabilità nella produzione di bevande fermentate a base di grano saraceno.

Per quanto concerne la caratterizzazione chimico-fisica e composizionale delle tre bevande fermentate sperimentali è stato possibile definire un contenuto iniziale di acidi organici, espresso come acidità totale titolabile, dopo 24 h di fermentazione inferiore rispetto a quanto identificato da Nionelli *et al.*, (2014) in una bevanda a base di avena fermentata per 12h dalla specie *Lact. plantarum*, al contrario la percentuale di sostanza secca presente nella bevanda a base di avena è risultata essere nettamente inferiore (circa ~3%) rispetto alla sostanza

secca rilevata nelle bevande sperimentali a base di riso rosso, grano saraceno ed orzo che hanno mostrato valori compresi tra il 9 e il 10%. Le bevande, inoltre, sono state caratterizzate da un contenuto quasi nullo di lipidi e proteine, un contenuto di carboidrati residui variabile dal 10% delle bevande a base di riso rosso all' 8% della bevanda a base di grano saraceno e un contenuto di fibra alimentare piuttosto basso intorno al 1%.

Inoltre, l'analisi sensoriale ha permesso di identificare caratteristiche peculiari e particolarmente gradevoli per tutte le tre le bevande in studio; in particolare un profilo sensoriale particolarmente bilanciato è stato evidenziato per le bevande a base di riso rosso, nelle quali odore e aroma di cereale e tostato si equilibrano bene con il sapore dolce percepito all'assaggio. Mentre, il profilo sensoriale delle bevande a base di grano saraceno e orzo si è caratterizzato per una spiccata nota acida e un considerevole aroma e odore fruttati.

Concludendo, il presente studio, sebbene limitato a prove sperimentali di laboratorio, ha permesso di evidenziare delle notevoli potenzialità delle bevande sperimentali non alcoliche prodotte a base di riso rosso, grano saraceno e orzo. I prototipi delle bevande fermentate sono risultati interessanti da un punto di vista applicativo in scala industriale soprattutto virtù dell'assenza di proteine del latte, di lattosio e di glutine nel caso delle bevande a base di riso rosso e grano saraceno rendendo così questi prodotti potenzialmente utilizzabili da consumatori vegani, vegetariani, intolleranti al lattosio o celiaci.

## 6. Bibliografia

- Abou-Zaid, M.M., Nozzolillo, C., Tonon, A., Coppens, M., Lombardo, A.D.A. 2008. High performance liquid chromatography characterization and identification of antioxidant polyphenols in maple syrup. *Pharmaceutical Biology* 46:117-125.
- Agarry, O.O., Nkama, I., Akoma, O. 2010. Production of Kunun-zaki (a Nigerian fermented cereal beverage) using starter culture. *International Research Journal of Microbiology* 1:18-25.
- Aider, M., de Halleux, D., Belkacemi, K. 2007. Production of granulated sugar from maple syrup with high content of inverted sugar. *Journal of Food Engineering* 80:791-797.
- Allard, G.B. 1974. Evaporation de la sève d'érable. In 3e Colloque du Génie Rural, Université Laval. Centre de Recherche, de Développement et de Transfert Technologique en Acériculture (ACER Inc.). Publication No 100-HPG-0274.
- Altay, F., Karbancioglu-Güler, F., Daskaya-Dikmen, C., Heperkan, D. 2013. A review on traditional Turkish fermented non-alcoholic beverages: Microbiota, fermentation process and quality characteristics. *International Journal of Food Microbiology* 167:44-56.
- Angelov, A., Gotcheva, V., Kunchewa, R., Hristozova, T. 2006. Development of a new oat-based probiotic drink. *International Journal of Food Microbiology* 112:75-80.
- AOAC Official Method 991.43 Total, Soluble and Insoluble Dietary Fiber in Foods. 1995. Chapter 32:7-9.
- Aquilanti, L., Babini, V., Santarelli, S., Osimani, A., Petruzzelli, A., Clementi, F. 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Letters in Applied Microbiology* 52:651-9.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Babini, V., Osimani, A., Clementi, F. 2013. Quality evaluation and discrimination of semi-hard and hard cheeses from the Marche region (Central Italy) using chemometric tools. *International Dairy Journal* 29:42-52.
- Arndt, E.A. 2006. Whole-grain barley for today's health and wellness needs. ConAgra Foods, Inc. Omaha, NE., 51:20-22.
- Aydemir, O., Harth, H., Weckx, S., Dervişoğlu, M., De Vuyst, L. 2015. Microbial communities involved in Kaşar cheese ripening. *Food Microbiology* 46:587-95.
- Baik, B.K., Ullrich, S.E. 2008. Barley for food: characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science* 48:233-242.
- Ball, D.W. 2007. The chemical composition of maple syrup. *Journal of Chemical Education* 84:1647-1650.
- Barnhoorn, R. 2015. Ancient grains for modern times. Patrick Mannion. Singapore.
- Basinskiene, L., Juodeikiene, G., Vidmantienė, D., Tenkanen, M., Makaravicius, T., Bartkiene, E. 2016. Non-alcoholic beverages from fermented cereals with increased oligosaccharide content. *Food Technology and Biotechnology* 54:36-44.
- Behall, K.M., Scholfield, D.J., Hallfrisch, J. 2004. Diets containing barley significantly reduce lipids in mildly hypercholesterolemic men and women. *The American Journal of Clinical Nutrition* 80:1185-93.
- Behall, K.M., Scholfield, D.J., Hallfrisch, J.G., Liljeberg-Elmstahl, H.G. 2006. Consumption of both resistant starch and beta-glucan improves postprandial plasma glucose and insulin in women. *Diabetes Care* 29:976-81.
- Belobrajdic, D.P., Jobling, S. A., Morell, M.K., Taketa, S., Bird, A.R. 2015. Wholegrain barley  $\beta$ -glucan fermentation does not improve glucose tolerance in rats fed a high-fat diet. *Nutrition Research* 35:162-168.
- Biesaga, M., Pyrzynska, K. 2013. Stability of bioactive polyphenols from honey during different extraction methods. *Food Chemistry* 136:46-54.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C. 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International* 36:527-43.

- Botes, A., Todorov, S.D., von Mollendorff, J.W., Botha, A., Dicks, L.M.T. 2007. Identification of lactic acid bacteria and yeast from boza. *Process Biochemistry* 42: 267-270.
- Bruzzone, S., Bodrato, N., Usai, C., Guida, L., Moreschi, I., Nano, R., Antonioli, B., Fruscione, F., Magnone, M., Scarfi, S., De Flora, A., Zocchi, E. 2008. Absciscic acid is an endogenous stimulator of insulin release from human pancreatic islets with cyclic ADP ribose as second messenger. *The Journal of Biological Chemistry* 283:32188-32197.
- Caderby, E., Baumberger, S., Hoareau, W., Fargues, C., Decloux, M., Maillard, M.N. 2013. Sugar cane stillage: A potential source of natural antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 494-501.
- Cai, Y.Z., Corke, H., Li, W.D. 2004. Buckwheat. In Wrigley C, Corke H and Walker C (eds), *Encyclopedia of Grain Science*. Oxford, Elsevier 1:120-128.
- Carafa, I., Nardin, T., Larcher, R., Viola, R., Tuohy, K., Franciosi, E. 2015. Identification and characterization of wild lactobacilli and pediococci from spontaneously fermented Mountain Cheese. *Food Microbiology* 48:123-32.
- Champagne, C.P., Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology* 18:184-190.
- Charalamopoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C. 2003. Evaluation of the effect of the malt, wheat and barley extracts on the viability of potential probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 82:133-141.
- Charalamopoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C. 2002. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates. *Journal of Applied Microbiology* 92: 851-859.
- Chaudhary, R.C. 2003. Speciality rices of the world: Effect of WTO and IPR on its production trend and marketing. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 1:34-41.
- Chavan, J. K., Kadam, S.S. 1989. Critical reviews in food science and nutrition. *Food Science* 28:348-400.
- Chen, P.N., Kuo, W.H., Chiang, C.L., Chiou, H.L., Hsieh, Y.S., Chu, S.C. 2006. Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chemico-Biological Interactions* 163:218-229.
- Ciesarová, Z., Mikušová, L., Magala, M., Kohajdová, Z., Karovičová, J. 2017. Nonwheat cereal-fermented-derived products. *Fermented Foods in Health and disease prevention*. Chapter 17. 417-432.
- Cloetens, L., Ulmuis, M., Johansson-Persson, A., Åkesson, B., Önning, G. 2012. Role of dietary beta-glucans in the prevention of the metabolic syndrome. *Nutrition Reviews* 70:444-58.
- Coda, R., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Rizzello, C.G. 2014. Sourdough lactic acid bacteria: exploration of non-wheat cereal-based fermentation. *Food Microbiology* 37:51-58.
- Coda, R., Lanera, A., Trani, A., Gobbetti, M., Di Cagno, R. 2012. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties. *International Journal of Food Microbiology* 155:120-7.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Trani, A., Gobbetti, M. 2011. Manufacture and characterization of functional emmer beverages fermented by selected lactic acid bacteria. *Food Microbiology* 28:526-536.
- Coda, R., Rizzello, C.G., Gobbetti, M. 2010. Use of sourdough fermentation and pseudo-cereals and leguminous flours for the making of a functional bread enriched of gamma-aminobutyric acid (GABA). *International Journal of Food Microbiology* 137:236-245
- Coman, M.M., Verdenelli, M.C., Cecchini, C., Silvi, S., Vasile, A., Bahrim, G.E., Orpianesi, C., Cresci, A. 2013. Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and their combination SYN-BIO®, in symbiotic fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 167:261-8.
- Dalié, D.K.D., Deschamps, A.M., Richard-Forget, F. 2010. Lactic acid bacteria – potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. *Food Control* 21:370-80.

- De Man, J.C., Rogosa M., Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Appl. Bacteriol.* 23: 130.
- Din, A., Anjum, F.M., Zahoor, T., Nawaz, H. 2009. Extraction and utilization of barley  $\beta$ -glucan for the preparation of functional beverage. *International Journal of Agriculture and Biology* 11:737-740.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011a). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to beta-glucans from oats and barley and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 1236, 1299), increase in satiety leading to a reduction in energy intake (ID 851, 852), reduction of post-prandial glycaemic responses (ID 821, 824), and “digestive function” (ID 850) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006 [21 pp.] EFSA Journal, 9(6), 2207. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2207>. Available online [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal) (Accessed 02.09.2013).
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). 2011b. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to barley beta-glucans and lowering of blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006 [13 pp.] EFSA Journal, 9(12), 2471. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2471>. Available online [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal) (Accessed 02.09.2013).
- Endo, A., Dicks, L.M.T. 2014. Physiology of the LAB. In W. H. Holzapfel (Ed.), Lactic acid bacteria biodiversity and taxonomy (pp. 13-30). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.
- Erejuwa, O.O., Sulaiman, S.A., Wahab, M.S. 2012. Honey – A novel antidiabetic agent. *International Journal of Biological Sciences* 8:913-934.
- FAOSTAT (Statistics division of food and agriculture organization of the united nations). Available from: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Accessed on November 8th, 2015.
- Food and Drug Administration. 2006. Department of health and human services. federal register e 71 FR 29248: health claims; soluble dietary fiber from certain foods and coronary heart disease. Final Rule, 71(98), 29248e29250. From the Federal Register Online via GPO Access [[waiss.access.gpo.gov](http://www.access.gpo.gov)] Accessed on-line: 02.09.2013.
- Garofalo, C., Osimani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G, Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementi, F. 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiology* 49:123-33.
- Giese, J.H. 1992. Hitting the spot: Beverages and beverage technology. *Food Technology* 46:70-72.
- Gillooly, M., Bothwell, T. H., Charlton, R. W., Torrance, J. D., Bezwoda, W. R., Macphail, A.P., Deman, D. P., Novelli, L., Morrau, D., Mayet, F. 1984. Factors affecting the adsorption of iron from cereals. *British Journal of Nutrition* 51:37-46.
- González-Sarriás, A., Li, L., Seeram, N.P, 2012. Anticancer effects of maple syrup phenolics and extracts on proliferation, apoptosis, and cell cycle arrest of human colon cells. *Journal of Functional Foods* 4: 185-196.
- Gotcheva, V., Pendiella, S.S., Angelov, A., Roshkova, Z.G., Webb, C. 2000. Microflora identification of the Bulgarian cereal-based fermented beverage boza. *Process Biochemistry* 36:127-130.
- Greffeuille, V., Polycarpe Kayodé, A.P., Icard-Vernire, C., Gnimadi, M., Rochette, I., Mouquet-Rivier, C. 2011. Changes in iron, zinc and chelating agents during traditional African processing of maize: effect of iron contamination on bioaccessibility. *Food Chemistry* 126:1800-1807.
- Gunaratne, A., Wu, .K, Li, D., Bentota, A., Corke, H., Cai, Y.Z. 2013. Antioxidant activity and nutritional quality of traditional red-grained rice varieties containing proanthocyanidins. *Food Chemistry* 138:1153-1161.
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N., Gallagher, E. 2010 a. Barley for brewing: characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9:318-328.

- Gupta, S., Cox, S., & Abu-Ghannam, N. 2010. Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats. *Biochemical Engineering Journal* 52:199-204.
- Guri, A J., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J. 2010. Absciscic acid synergizes with rosiglitazone to improve glucose tolerance and down-modulate macrophage accumulation in adipose tissue: Possible action of the cAMP/PKA/PPAR gamma axis. *Clinical Nutrition* 29:646-653.
- Guri, A J., Hontecillas, R., Ferrer, G., Casagran, O., Wankhade, U., Noble, A.M., Eizirik, D.L., Ortis, F., Cnop, M., Liu, D., Si, H., Bassaganya-Riera, J. 2008. Loss of PPAR gamma in immune cells impairs the ability of abscisic acid to improve insulin sensitivity by suppressing monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration into white adipose tissue. *Journal of Nutritional Biochemistry* 19:216-228.
- Guri, A.J., Hontecillas, R., Si, H., Liu, D., Bassaganya-Riera, J. 2007. Dietary abscisic acid ameliorates glucose tolerance and obesity-related inflammation in db/db mice fed high-fat diets. *Clinical Nutrition* 26: 107-116.
- Guyot, J.P. 2012. Cereal-based fermented foods in developing countries: ancient foods for modern research. *International Journal of Food Science & Technology* 47:1109-1114.
- Haard, N. F., Odunfa, S. A., Lee, C.-H., Quintero-Ramírez, R., Lorence-Quiñones, A., Wachter-Radarte, C. 1999. Fermented cereals. A global perspective. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 138.
- Harris, K.A., Kris-Etherton, P.M. 2010. Effects of whole grains on coronary heart disease risk. *Current Atherosclerosis Reports* 12:368-76.
- Hatcher, D.W., You, S., Dexter, J.E., Campbell, C., Izydorczyk, M.S. 2008. Evaluation of the performance of flours from cross- and self-pollinating Canadian common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) cultivars in soba noodles. *Food Chemistry* 107:722-731.
- Hegsted, D.M. 1969. Nutritional value of cereal proteins in relation to human needs. In M. Milner (Ed.), Protein-enriched cereal foods for world needs. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemists. 38-48.
- Heiniö, R.L., Kaukovirta-Norja, A., Poutanen, K. 2011. Flavor in processing new oat foods. *Cereal Foods World* 56:21-26.
- Helland, M.H., Wicklund, T., Narvhus, J.A. 2004. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology* 91: 305-313.
- Hochett, E.A. 2000. In: Kulp, K., Ponte, Jr., J.G. (eds), Barley. Handbook of cereals science and Technology. Marcel Dekker, Inc, New York, Basel. 790.
- Holzappel, W. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control* 8:241-258.
- Itani, T., Ogawa, M. 2004. History and recent trends of red rice in Japan. *Japanese Journal of Crop Science* 73:137-147.
- Izydorczyk, M.S., Dexter, J.E. 2008. Barley b-glucans and arabinoxylans: molecular structure, physicochemical properties, and uses in food products. *Food Research International* 41:850-868.
- Jadhav, S.J., Lutz, S.E., Ghorpade, V.M., Salunkhe, D.K. 1998. Barley: chemistry and value-added processing. *Critical Reviews in Food Science* 38:123-171.
- Jin, H.M., Wei, P. 2011. Anti-Fatigue Properties of Tartary Buckwheat Extracts in Mice. *International Journal of Molecular Sciences* 12:4770-4780.
- Katina, K., Laitila, A., Jovonen, R., Liukkonen, K.-H., Kariluoto, S., Piironen, V., Landberg, R., Åman, P., Poutanen, K. 2007. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye. *Food Microbiology* 24:175-186.
- Kedia, G., Vázquez, J.A., Pandiella, S.S. 2008. Enzymatic digestion and in vitro fermentation of oat fractions by human *Lactobacillus* strains. *Enzyme and Microbial Technology* 43:355-361.

- Kermasha, S., Goetghebeur, M., Dumont, J. 1995. Determination of phenolic compound profiles in maple products by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43:708-716.
- Khetarpaul, N., Chauhan, B.M. 1990. Effect of fermentation by pure cultures of yeasts and lactobacilli on the available carbohydrate content of pearl millet. *Tropical Science* 31:131-139.
- Kivanç, M., Yılmaz, M., Çakir, E. 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. *Turkish Journal of Biology* 35:313-324.
- Kocková, M., Mendel, J., Medvedová, A., Šturdík, E., Valík, L. 2013. Cereals and pseudocereals as substrates for growth and metabolism of a probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Journal of Food and Nutrition Research* 52:25-36.
- Koyama, M., Nakamura, C., Nakamura, K. 2011. Changes in phenols contents from buckwheat sprouts during growth stage. *Journal of Food Science and Technology* 50:86-93.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A.E., Etherton, T.D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine* 113:71-88.
- Krkošková, B., Mrázová, Z. 2005. Prophylactic components of buckwheat. *Food Research International* 38:561-568.
- Lee, J.C., Kim, J.D., Hsieh, F.H., Eun, J.B. 2008. Production of black rice cake using ground black rice and medium-grain brown rice. *International Journal of Food Science and Technology* 43:1078-1082.
- Li, D., Li, X.L., Ding, X.L. 2010. Composition and Antioxidative Properties of the Flavonoid-rich Fractions from Tartary Buckwheat Grains. *Food Science and Biotechnology* 19:711-716.
- Li, L., Seeram, N.P. 2010. Maple syrup phytochemicals include lignans, coumarins, a stilbene, and other previously unreported antioxidant phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 11673-11679.
- Li, S.Q., Zhang, Q.H. 2001. Advances in the development of functional foods from buckwheat.
- Li, X.H., Park, N.I., Xu, H., Woo, S.H., Park, C.H., Park, S.U. 2010. Differential Expression of Flavonoid Biosynthesis Genes and Accumulation of Phenolic Compounds in Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58:12176-12181.
- Liu, G., Li, M., Zhu, Q., Li, Y., & Shui, S. 2006. The research advance on resource plant *Fagopyrum dibotrys*. *Chinese Agricultural Science Bulletin* 22:380-389.
- Liu, S.N., Han, Y., Zhou, Z.J. 2011. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International* 44:643-51.
- Ma, Y., Xiong, Y.L., Zhai, J.J., Zhu, H.N., Dziubla, T. 2010. Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from in vitro digests of buckwheat protein. *Food Chemistry* 118:582-588.
- Madhujith, T., Izdorczyk, M., Shahidi, F. 2006. Antioxidant properties of pearled barley fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:32.
- Mårtensson, O., Öste, R., Holst, O. 2002. Texture promoting capacity and EPS formation by lactic acid bacteria in three different oat-based non-dairy media. *European Food Research and Technology* 214: 232-236.
- Mattila-Sandholm, T. 1998. VTT on lactic acid bacteria. VTT Symposium, 156:1-10.
- McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E.D., Richards, M.P., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., Wang, C. 2004. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101:17593-17598.
- McKewith, B. 2004. Nutrition aspects of cereals: briefing paper. *Nutrition Bulletin* 29:111-142.

- Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M. 2014. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *International Journal of Food Microbiology* 171:136-146.
- Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Langsrud, T. 2012. Organic acids and volatile organic compounds produced during traditional and starter culture fermentation of Bushera, a Ugandan fermented cereal beverage, a Ugandan Fermented Cereal Beverage. *Food Biotechnology* 26:1-28.
- Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J., Langsrud, T. 2003. Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* 80: 201-210.
- Nahar, P.P., Driscoll, M. V., Li, L., Slitt, A.L., Seeram, N.P.. 2014. Phenolic mediated anti-inflammatory properties of a maple syrup extract in RAW 264.7 murine macrophages. *Journal of Functional Foods* 6:126-36.
- Nionelli, L., Coda, R., Curiel, J.A., Kaisa, P., Gobbetti, M., Rizzello, C.G. 2014. Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 185:17-26.
- Niu Y, Gao B, Slavin M, Zhang X, Yang F, Bao J, Shi, H., Xie, Z., Yu, L. 2013. Phytochemical compositions, and antioxidant and anti-inflammatory properties of twenty-two red rice samples grown in Zhejiang. *LWT- Food Science and Technology* 54:521–527.
- Nout, M.J.R. 2009. Rich nutrition from the poorest-cereal fermentations in Africa and Asia. *Food Microbiology* 26:685-692.
- Nout, M.J.R., Motarjemi, Y. 1997. Assessment of fermentation as a household technology for improving food safety: a joint FAO/WHO workshop. *Food Control* 8:221-226.
- Osimani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanović, V., Clementi, F. 2015. Unpasteurized commercial boza as a source of microbial diversity. *International Journal of Food Microbiology* 194:62–70.
- Passerini, D., Coddeville, M., Le Bourgeois, P., Loubière, P., Ritzenthaler, P., Fontagné- Faucher, C., Daveran-Mingot, M.L., Coccagn-Bousquet, M. 2013. The carbohydrate metabolism signature of *Lactococcus lactis* strain A12 reveals its sourdough ecosystem origin. *Applied and Environmental Microbiology* 79: 5844–5852.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G., Villani, F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Science* 67:309-317.
- Perkins, T.D., van den Berg, A.K. 2009. Maple syrup- production, composition, chemistry, and sensory characteristics. *Advances in Food and Nutrition Research* 56:101-143.
- Perkins, T.D., Van den Berg, A.K. 2009. Maple syrup-production, composition, chemistry, and sensory characteristics. *Advances in Food and Nutrition Research* 56:101-143.
- Peryam, D.R., Pilgrim, F.J. 1957. Hedonic scale method of measuring food preferences. *Food Technology* 11: 9-14.
- Peyer, L.C., Zannini, E., Arendt, E.K. 2016. Lactic acid bacteria as sensory biomodulators for fermented cereal-based beverages. *Trends in Food Science & Technology* 54:17-25.
- Peyer, L.C., Zannini, E., Jacob, F., Arendt, E.K. 2015. Growth study, metabolite development and organoleptic profile of a malt-based substrate fermented by lactic acid bacteria. *American Society of Brewing Chemists Journal* 73:303-313.
- Phillips, K.M., Carlsen, M.H., Blomhoff, R. 2009. Total antioxidant content of alternatives to refined sugar. *Journal of The American Dietetic Association* 109:64-71.
- Pimentel, T.C., Madrona, G.S., Garcia, S., Prudencio, S.H. 2015. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *Paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT- Food Science and Technology* 63:415-422.

- Poutanen, K. 2012. Past and future of cereal grains as food for health. *Trends in Food Science & Technology* 25:58-62.
- Puerari, C., Magalhães-Guedes, K.T., Schwan, R.F. 2015. Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. *Food Microbiology* 46:210–217.
- Rantsiou, K., Urso, R., Dolci, P., Comi, G., Cocolin, L. 2008. Microflora of Feta cheese from four Greek manufacturers. *International Journal of Food Microbiology* 126:36-42.
- Ray, M., Ghosh, K., Singh, S., Chandra Mondal, K. 2016. Folk to functional: An explorative overview of rice-based fermented foods and beverages in India. *Journal of Ethnic Foods* 3:5-18.
- Salmerón, I. 2017. Fermented cereal beverages: from probiotic, prebiotic and synbiotic towards Nanoscience designed healthy drinks. *Letters in Applied Microbiology*. 65:114-24.
- Salmerón, I., Thomas, K., Pandiella, S.S. 2014. Effect of substrate composition and inoculum on the fermentation kinetics and flavour compound profiles of potentially non-dairy probiotic formulations. *LWT - Food Science and Technology* 55: 240-247.
- Salmerón, I., Thomas, K., Pandiella, S.S. 2015. Effect of potentially probiotic lactic acid bacteria on the physicochemical composition and acceptance of fermented cereal beverages. *Journal of Functional Foods* 15:106-115.
- Shah, N.P. 2007. Functional Cultures And Health Benefits. *International Dairy Journal* 17:1262-1277.
- Sharma, P., Gujral, H.S. 2011. Effect of sand roasting and microwave cooking on antioxidant activity of barley. *Food Research International* 44:23-240.
- Sibbald, B. 2003. Sugar industry sour on WHO report. *Canadian Medical Association Journal* 168:1585.
- Singh, A.S., Jones, A.M.P., Saxena, P.K. 2014. Variation and correlation of properties in different grades of maple syrup. *Plant Foods for Human Nutrition* 69:50-56.
- Sisto, A., Lavermicocca, P. 2012. Suitability of a probiotic *Lactobacillus paracasei* strain as a starter culture in olive fermentation and development of the innovative patented product “probiotic table olives”. *Frontiers of Microbiology* 3:174.
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G., Berghofer, E. 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry* 124:132-140.
- Sompong, R., Siebenhandl-Ehn, S., Linsberger-Martin, G., Berghofer, E. 2011. Physicochemical and antioxidative properties of red and black rice varieties from Thailand, China and Sri Lanka. *Food Chemistry* 124:132-40.
- Stewart, R. B., Getachew, A. 1962. Investigations on the nature of Injera. *Economic Botany* 16:127.
- Stibilj V., Kreft I., Smrkolj P., Osvald J. 2004. Enhanced selenium content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) and pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds by foliar fertilization. *European Food Research and Technology* 219:142-144.
- St-Pierre P, Pilon G, Dumais V, Dion C, Dubois M-J, Dubé P, Desjardins, Y., Marette, A. 2014. Comparative analysis of maple syrup to other natural sweeteners and evaluation of their metabolic responses in healthy rats. *Journal of Functional Foods* 11:460-71.
- Stuckel, J.G., Low, N.H. 1996. The chemical composition of 80 pure maple syrup samples produced in North America. *Food Research International* 29:373-379.
- Suzuki, M., Kimura, T., Yamagishi, K., Shinmoto, H., Yamaki, K. 2004. Comparison of mineral contents in 8 cultivars of pigmented brown rice. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 51:424-427.
- Tamine, A.Y., Saarela, M., Korslund Sondergaard, A., Mistry, V.V., Shah, N.P. 2005. Production And Maintenance Of Viability Of Probiotic Micro-organisms In Dairy Products. In: Tamine AY, editor. *Probiotic Dairy Products*. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. pp. 39-72.

- Taylor, J., Taylor, J.R N. 2002. Alleviation of the adverse effect of cooking on sorghum protein digestibility through fermentation in traditional African porridges. *International Journal of Food Science and Technology* 37:129-137.
- Thériault, M., Caillet, S., Kermasha, S., Lacroix, M. 2006. Antioxidant, antiradical and antimutagenic activities of phenolic compounds present in maple products. *Food Chemistry* 98:490-501.
- Todorov, S.D. 2010. Diversity of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from boza, a cereal-based fermented beverage from Bulgaria. *Food Control* 21:1011–21.
- Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. 2006. Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry* 41: 11-19.
- Tomotake, H., Shimaoka, I., Kayashita, J., Yokoyama, F., Nakajoh, M., Kato, N. 2000. A Buckwheat protein product suppresses gallstone formation and plasma cholesterol more strongly than soy protein isolate in hamsters. *The Journal of Nutrition* 130:1670-1674.
- Tomotake, H., Yamamoto, N., Yanaka, N., Ohinata, H., Yamazaki, R., Kayashita, J., Kato, N. 2006. High protein buckwheat flour suppresses hypercholesterolemia in rats and gallstone formation in mice by hypercholesterolemic diet and body fat in rats because of its low protein digestibility. *Nutrition* 22: 166-173.
- Vogelmann, S.A., Seitter, M., Singer, U., Brandt, M.J., Hertel, C. 2009. Adaptability of lactic acid bacteria and yeasts to sourdoughs prepared from cereals, pseudocereals and cassava and use of competitive strains as starters. *International Journal of Food Microbiology* 130:205-12.
- Wan, C., Yuan, T., Li, L., Kandhi, V., Cech, N.B., Xie, M., Seeram, N.P. 2012. Maplexins, new alpha-glucosidase inhibitors from red maple (*Acer rubrum*) stems. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 22:597-600.
- Waseem, M., Phipps, J., Carbonneau, R., Simmonds, J. 1991. Plant growth substances in sugar maple (*Acer saccharum* Marsh) Spring sap. Identification of cytokinins, abscisic acid and an indolic compound. *Journal of Plant Physiology* 138:489-493.
- Watanabe, M. 1998. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46:839-845.
- Waters, D.M., Mauch, A., Coffey, A., Arendt, E.K., Zannini, E. 2013. Lactic acid bacteria as a cell factory for the delivery of functional biomolecules and ingredients in cereal based beverages: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 55:503-520
- Wei Y., Hu X., Zhang G., Ouyang S. 2003. Studies on the amino acid and mineral content of buckwheat protein fractions. *Food/Nahrung* 47:114-116.
- Wijngaard, H.H., Arendt, E.K. 2006. Buckwheat. *Cereal Chemistry* 83:391-401.
- Williams, M., Hekmat, S. 2017. *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 in Fermented Rice Pudding Supplemented with Short Chain Inulin, Long Chain Inulin, and Oat as a Novel Functional Food. *Fermentation* 55:1-12.
- Wu, S. C., Lee, B.H. 2011. Buckwheat Polysaccharide Exerts Antiproliferative Effects in THP-1 Human Leukemia Cells by Inducing Differentiation. *Journal of Medicinal Food* 14:26-33.
- Yang, Y., Shevchenko, A., Knaust, A., Abuduresule, I., Li, W., Hu, X., Wang, C., Shevchenko, A. 2014. Proteomics evidence for kefir dairy in Early Bronze Age China. *Journal of Archaeological Science* 45:178-186.
- Yeğin, S., Üren, A. 2008. Biogenic amine content of boza: A traditional cereal-based, fermented Turkish beverage. *Food Chemistry* 111:983–7.
- Yokoyama, W. 2004. Nutritional properties of rice bran. In E. T. Champagne (Ed.), *Rice chemistry and technology*. St. Paul, MN: American Association of Cereal Chemist. 595-609.

- Zannini, E., Mauch, A., Galle, S., Gänzle, M., Coffey, A., Arendt, E.K., Taylor, J.P., Waters, D.M. 2013. Barley malt wort fermentation by exopolysaccharide-forming *Weissella cibaria* MG1 for the production of a novel beverage. *Journal of Applied Microbiology* 115:1379-1387.
- Zhang, H.W., Zhang, Y.H., Lu, M.J., Tong, W.J., Cao, G.W. 2007. Comparison of hypertension, dyslipidaemia and hyperglycaemia between buckwheat seed-consuming and non-consuming Mongolian-Chinese populations in Inner Mongolia, China. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34: 838-844.
- Zhang, L., Gao, F., Gao, L., Yin, X., Xi, Y. 2011. Review on nutritional functions and utilization of buckwheat. *South China Agriculture* 5:74-77.
- Zheng, X., Yu, Y., Xiao, G., Xu, Y., Wu, J., Tang, D., Zhang, Y. 2014. Comparing product stability of probiotic beverages using litchi juice treated by high hydrostatic pressure and heat as substrates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 23:61-67.
- Zhou, M., Robards, K., Glennie-Holmes, M., Helliwell, S. 1999. Analysis of volatile compounds and their contribution to flavor in cereals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47:3941-3953.
- Zhu, F. 2016. Buckwheat starch: Structures, properties, and applications. *Trends in Food Science & Technology* 49:121-35.

## 7. Appendice

| Isolato                                   | Odore       |             |             |             | Aroma       |             |             |             | Sapori fondamentali |             |             |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|
|                                           | Cereale     | Vegetale    | Fruttato    | Tostato     | Cereale     | Vegetale    | Fruttato    | Tostato     | Dolce               | Acido       | Amaro       |
| BZ2 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 4,00 ± 1,00 | 1,67 ± 0,58 | 2,33 ± 0,58 | 3,00 ± 1,73 | 2,67 ± 1,15 | 2,00 ± 1,73 | 3,00 ± 1,73 | 3,33 ± 0,58 | 6,00 ± 1,00         | 2,00 ± 1,00 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ5 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 3,00 ± 1,00 | 1,67 ± 0,58 | 1,67 ± 0,58 | 1,67 ± 0,58 | 3,67 ± 0,58 | 2,00 ± 1,00 | 1,00 ± 0,00 | 2,00 ± 1,00 | 4,67 ± 0,58         | 3,67 ± 1,15 | 1,33 ± 0,58 |
| BZ10 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 3,67 ± 0,58 | 2,00 ± 0,00 | 2,33 ± 1,15 | 3,33 ± 1,53 | 3,33 ± 1,15 | 1,33 ± 0,58 | 1,67 ± 0,58 | 2,67 ± 1,15 | 4,33 ± 1,53         | 4,33 ± 1,15 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ21 <i>Lactobacillus casei</i>           | 3,67 ± 1,53 | 2,00 ± 1,73 | 1,67 ± 1,15 | 2,67 ± 1,15 | 4,33 ± 0,58 | 1,33 ± 0,58 | 2,67 ± 1,53 | 3,00 ± 0,00 | 4,00 ± 1,73         | 4,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ22 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 5,00 ± 1,00 | 2,00 ± 1,73 | 3,00 ± 1,00 | 4,00 ± 1,00 | 4,33 ± 0,58 | 2,33 ± 1,15 | 3,00 ± 1,73 | 3,00 ± 1,00 | 4,33 ± 1,53         | 3,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ26 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 3,67 ± 0,58 | 2,00 ± 1,73 | 2,67 ± 2,08 | 4,00 ± 1,73 | 3,67 ± 0,58 | 1,67 ± 1,15 | 3,33 ± 1,53 | 3,67 ± 1,53 | 5,33 ± 1,15         | 3,67 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ28 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 3,00 ± 1,00 | 1,33 ± 0,58 | 1,67 ± 1,15 | 3,00 ± 1,73 | 3,33 ± 0,58 | 1,33 ± 0,58 | 2,67 ± 2,89 | 2,00 ± 1,00 | 5,33 ± 0,58         | 2,00 ± 1,73 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ30 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 4,33 ± 1,15 | 3,33 ± 0,58 | 1,33 ± 0,58 | 2,67 ± 1,15 | 2,33 ± 0,58 | 1,00 ± 1,00 | 1,33 ± 0,58 | 1,33 ± 0,58 | 7,00 ± 1,00         | 0,67 ± 1,15 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ31 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 4,50 ± 0,71 | 1,67 ± 1,15 | 2,00 ± 1,00 | 3,67 ± 1,15 | 3,50 ± 0,71 | 1,67 ± 0,58 | 2,00 ± 1,41 | 2,33 ± 1,15 | 2,00 ± 0,00         | 3,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ32 <i>Lactobacillus buchneri</i>        | 4,33 ± 1,53 | 1,33 ± 0,58 | 2,33 ± 1,53 | 4,33 ± 0,58 | 4,00 ± 1,00 | 1,67 ± 0,58 | 2,33 ± 2,31 | 4,33 ± 0,58 | 4,67 ± 0,58         | 3,67 ± 1,15 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ33 <i>Lactobacillus casei</i>           | 4,00 ± 2,00 | 1,67 ± 1,15 | 3,67 ± 2,52 | 3,67 ± 1,15 | 3,00 ± 1,00 | 1,33 ± 0,58 | 4,33 ± 1,53 | 2,33 ± 1,15 | 2,83 ± 1,04         | 5,67 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ34 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 4,00 ± 0,00 | 1,67 ± 1,15 | 1,67 ± 0,58 | 2,67 ± 2,08 | 3,00 ± 1,00 | 1,67 ± 0,58 | 2,00 ± 1,00 | 1,67 ± 0,58 | 5,00 ± 0,00         | 2,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ35 <i>Lactobacillus casei</i>           | 4,67 ± 1,15 | 2,00 ± 1,73 | 2,33 ± 0,58 | 4,00 ± 1,00 | 4,00 ± 0,00 | 2,00 ± 1,00 | 2,00 ± 1,00 | 2,33 ± 0,58 | 4,67 ± 1,15         | 5,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ36 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 1,67 ± 0,58 | 2,33 ± 0,58 | 1,67 ± 1,15 | 1,00 ± 0,00 | 4,00 ± 0,00 | 2,33 ± 0,58 | 3,00 ± 1,00 | 2,33 ± 1,15 | 3,00 ± 1,73         | 4,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ37 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 3,00 ± 1,00 | 2,00 ± 0,00 | 1,67 ± 1,15 | 4,00 ± 0,00 | 3,67 ± 1,15 | 1,67 ± 1,15 | 2,33 ± 1,53 | 4,00 ± 1,00 | 4,33 ± 1,15         | 5,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ38 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 1,67 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,67 ± 0,58 | 2,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,33 ± 0,58 | 4,67 ± 1,15         | 2,67 ± 1,53 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ39 <i>Pediococcus parvulus</i>          | 3,00 ± 0,00 | 1,33 ± 0,58 | 2,33 ± 0,58 | 3,33 ± 1,15 | 3,67 ± 1,15 | 1,67 ± 1,15 | 3,00 ± 1,00 | 2,67 ± 1,53 | 5,67 ± 1,00         | 3,33 ± 1,15 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ43 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 4,33 ± 0,58 | 2,33 ± 1,53 | 2,00 ± 1,73 | 2,67 ± 2,08 | 4,33 ± 0,58 | 2,33 ± 2,31 | 3,33 ± 2,52 | 2,00 ± 0,00 | 4,00 ± 1,00         | 3,67 ± 0,58 | 1,33 ± 0,58 |
| BZ44 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 3,67 ± 0,58 | 2,00 ± 0,00 | 1,33 ± 0,58 | 4,00 ± 1,00 | 3,67 ± 0,58 | 2,00 ± 1,73 | 2,33 ± 1,53 | 3,33 ± 0,58 | 5,00 ± 1,00         | 4,33 ± 1,15 | 1,00 ± 0,00 |
| BZ47 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 3,00 ± 1,00 | 1,33 ± 0,58 | 2,33 ± 1,53 | 3,33 ± 1,53 | 2,33 ± 1,15 | 1,00 ± 0,00 | 2,33 ± 1,53 | 2,33 ± 0,58 | 3,00 ± 2,00         | 4,67 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| CBL 35 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>     | 3,67 ± 0,58 | 1,33 ± 0,58 | 2,67 ± 2,08 | 3,00 ± 1,00 | 3,00 ± 1,00 | 1,33 ± 0,58 | 3,67 ± 1,53 | 2,33 ± 1,55 | 3,33 ± 2,52         | 4,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| CBL 53 <i>Streptococcus thermophilus</i>  | 4,67 ± 0,58 | 1,33 ± 0,58 | 2,33 ± 1,53 | 1,33 ± 0,58 | 3,00 ± 1,00 | 1,67 ± 1,15 | 2,67 ± 2,08 | 1,33 ± 0,58 | 6,33 ± 0,58         | 1,33 ± 0,58 | 1,00 ± 0,00 |
| DSM 25784 <i>Weissella oryzae</i>         | 4,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 4,00 ± 0,00 | 2,67 ± 1,53 | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 | 3,67 ± 1,15 | 8,00 ± 1,00         | 1,00 ± 0,00 | 1,00 ± 0,00 |

**Appendice V.1.** Profilo sensoriale valutato per ogni isolato analizzato rispetto alla bevanda a base di riso rosso. I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

| Isolato                                   | Odore       |             |             |             | Aroma       |             |             |             | Sapori fondamentali |             |             |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|
|                                           | Cereale     | Vegetale    | Fruttato    | Tostato     | Cereale     | Vegetale    | Fruttato    | Tostato     | Dolce               | Acido       | Amaro       |
| BZ2 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 3.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 1.67 ± 0.58 | 2.67 ± 1.15 | 3.33 ± 0.58 | 1.67 ± 0.58 | 1.67 ± 0.58 | 3.67 ± 0.58 | 3.33 ± 2.31         | 4.00 ± 1.00 | 1.33 ± 0.58 |
| BZ5 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 3.33 ± 1.53 | 1.67 ± 0.58 | 1.67 ± 0.58 | 3.67 ± 1.53 | 3.00 ± 1.00 | 1.33 ± 0.58 | 1.67 ± 0.58 | 4.33 ± 1.53 | 3.00 ± 1.73         | 3.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ10 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 3.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 4.33 ± 0.58 | 3.33 ± 1.15 | 1.00 ± 0.00 | 1.67 ± 0.58 | 3.67 ± 1.53 | 5.00 ± 1.00         | 2.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ21 <i>Lactobacillus casei</i>           | 3.00 ± 1.00 | 1.33 ± 0.58 | 2.00 ± 1.00 | 4.67 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 | 2.33 ± 1.53 | 3.67 ± 1.53 | 2.67 ± 1.15         | 5.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ22 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 3.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 3.67 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.33 ± 1.53 | 4.33 ± 0.58         | 3.33 ± 1.15 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ26 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 3.67 ± 2.08 | 1.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.67 ± 1.15 | 1.67 ± 0.58 | 1.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 4.00 ± 1.00         | 2.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 |
| BZ28 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ30 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 4.67 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 2.00 ± 1.00 | 3.00 ± 1.00 | 3.00 ± 1.73 | 2.33 ± 0.58 | 1.67 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 4.33 ± 0.58         | 2.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ31 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 3.33 ± 1.15 | 1.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 | 5.00 ± 1.00 | 3.00 ± 1.73 | 1.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 | 7.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00         | 3.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ32 <i>Lactobacillus buchneri</i>        | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ33 <i>Lactobacillus casei</i>           | 5.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 1.67 ± 1.15 | 4.00 ± 1.00 | 4.00 ± 1.73 | 1.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 3.67 ± 1.53 | 2.33 ± 0.58         | 6.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ34 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 3.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 | 4.67 ± 2.31 | 4.33 ± 1.15 | 1.33 ± 0.58 | 1.33 ± 0.58 | 2.67 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00         | 7.33 ± 1.15 | 1.33 ± 0.58 |
| BZ35 <i>Lactobacillus casei</i>           | 4.33 ± 2.08 | 1.00 ± 0.00 | 2.00 ± 1.00 | 5.67 ± 2.31 | 4.33 ± 2.08 | 1.00 ± 0.00 | 1.67 ± 0.58 | 5.67 ± 0.58 | 3.33 ± 0.58         | 4.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ36 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 | 4.67 ± 0.58 | 2.67 ± 0.58         | 4.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ37 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 2.67 ± 1.15 | 1.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 3.67 ± 1.53 | 2.67 ± 1.15 | 2.00 ± 1.00 | 1.33 ± 0.58 | 5.00 ± 1.00 | 2.67 ± 1.15         | 5.33 ± 1.15 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ38 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 5.00 ± 1.00 | 1.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 1.33 ± 0.58 | 1.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 2.33 ± 0.58         | 5.33 ± 1.53 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ39 <i>Pediococcus parvulus</i>          | 3.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 5.00 ± 0.00 | 3.67 ± 1.15 | 1.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 4.33 ± 2.08 | 5.00 ± 1.00         | 2.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ43 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 4.00 ± 1.00 | 2.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 | 3.33 ± 0.58 | 3.00 ± 0.00 | 1.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 3.33 ± 1.53 | 4.33 ± 2.08         | 2.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ44 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 2.67 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 | 3.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 2.33 ± 0.58 | 1.33 ± 0.58 | 3.67 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58         | 4.67 ± 1.15 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ47 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 3.33 ± 1.15 | 1.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.67 ± 1.15 | 3.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.67 ± 1.53 | 2.67 ± 1.15         | 6.67 ± 1.53 | 1.00 ± 0.00 |
| CBL 35 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>     | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| CBL 53 <i>Streptococcus thermophilus</i>  | 3.00 ± 0.00 | 1.33 ± 0.58 | 2.33 ± 1.53 | 4.67 ± 1.15 | 2.67 ± 0.58 | 1.33 ± 0.58 | 2.00 ± 1.00 | 4.67 ± 1.53 | 4.33 ± 0.58         | 2.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| DSM 25784 <i>Weissella oryzae</i>         | 2.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 | 2.67 ± 0.58 | 2.67 ± 0.58 | 2.67 ± 1.15 | 1.33 ± 0.58 | 3.00 ± 0.00 | 3.00 ± 1.00 | 6.00 ± 1.00         | 2.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |

**Appendice V.2.** Profilo sensoriale valutato per ogni isolato analizzato rispetto alla bevanda a base di grano saraceno. I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

| Isolato                                   | Odore       |             |             |             | Aroma       |             |             |             | Sapori fondamentali |             |             |
|-------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|-------------|-------------|
|                                           | Cereale     | Vegetale    | Fruttato    | Tostato     | Cereale     | Vegetale    | Fruttato    | Tostato     | Dolce               | Acido       | Amaro       |
| BZ2 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 4.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.33 ± 0.58 | 3.67 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 3.33 ± 2.31 | 3.33 ± 1.15 | 4.00 ± 0.00         | 4.67 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ5 <i>Lactobacillus fermentum</i>        | 3.00 ± 1.00 | 1.67 ± 0.58 | 1.67 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 4.33 ± 2.31 | 2.67 ± 1.15 | 3.33 ± 1.53 | 2.00 ± 0.00 | 3.00 ± 1.00         | 5.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ10 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 3.67 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 1.67 ± 0.58 | 2.67 ± 0.58 | 3.67 ± 1.15 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± .00  | 3.67 ± 0.58 | 4.33 ± 1.15         | 4.00 ± 1.73 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ21 <i>Lactobacillus casei</i>           | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ22 <i>Lactobacillus paracasei</i>       | 4.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 2.67 ± 1.15 | 3.00 ± 1.00 | 4.67 ± 1.15 | 2.00 ± 0.00 | 3.00 ± 1.00 | 2.67 ± 0.58 | 5.00 ± 1.00         | 4.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ26 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 5.00 ± 1.00 | 2.00 ± 0.00 | 1.67 ± 0.58 | 5.33 ± 0.58 | 4.67 ± 1.15 | 2.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 4.67 ± 2.08 | 4.67 ± 1.15         | 2.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ28 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 6.00 ± 1.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 4.67 ± 0.58 | 5.33 ± 1.53 | 2.00 ± 0.00 | 3.00 ± 1.00 | 3.67 ± 0.58 | 5.67 ± 0.58         | 2.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ30 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 4.33 ± 0.58 | 2.67 ± 1.15 | 2.00 ± 0.00 | 3.33 ± 1.53 | 3.67 ± 1.53 | 2.33 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 2.67 ± 0.58 | 6.00 ± 0.00         | 2.67 ± 1.15 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ31 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ32 <i>Lactobacillus buchneri</i>        | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ33 <i>Lactobacillus casei</i>           | 3.67 ± 1.53 | 2.00 ± 0.00 | 4.00 ± 1.00 | 3.00 ± 1.00 | 3.33 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 4.00 ± 1.00 | 2.67 ± 1.15 | 4.33 ± 1.53         | 5.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ34 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 4.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 3.33 ± 1.53 | 4.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.67 ± 1.53         | 5.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ35 <i>Lactobacillus casei</i>           | 4.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 3.67 ± 1.15 | 4.33 ± 0.58 | 2.67 ± 1.15 | 2.67 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 4.67 ± 0.58         | 3.33 ± 1.53 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ36 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 3.00 ± 1.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 3.67 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00         | 4.33 ± 2.08 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ37 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 2.67 ± 1.15 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.67 ± 1.15 | 3.33 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 3.33 ± 1.15         | 3.67 ± 1.53 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ38 <i>Lactobacillus parabuchneri</i>    | 3.33 ± 1.15 | 2.67 ± 1.15 | 2.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 2.33 ± 0.58 | 2.33 ± 0.58 | 2.67 ± 1.15 | 2.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00         | 3.33 ± 1.53 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ39 <i>Pediococcus parvulus</i>          | 5.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 2.00 ± 0.00 | 4.00 ± 1.00 | 5.00 ± 2.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.67 ± 2.08 | 2.67 ± 0.58 | 4.67 ± 3.21         | 2.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ43 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 3.00 ± 0.00 | 3.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 3.00 ± 0.00 | 3.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 4.00 ± 0.00         | 3.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ44 <i>Lactobacillus coryniformis</i>    | 3.33 ± 1.15 | 2.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 4.33 ± 0.58 | 4.00 ± 1.00 | 2.33 ± 0.58 | 2.67 ± 1.15 | 2.67 ± 0.58 | 3.33 ± 0.58         | 3.67 ± 1.53 | 1.00 ± 0.00 |
| BZ47 <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> | 3.00 ± 1.00 | 2.00 ± 0.00 | 3.00 ± 1.00 | 3.33 ± 1.53 | 4.00 ± 0.00 | 2.33 ± 0.58 | 3.00 ± 1.73 | 2.33 ± 0.58 | 3.67 ± 1.15         | 5.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| CBL 35 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>     | 4.67 ± 0.58 | 2.00 ± 0.00 | 3.67 ± 1.53 | 2.67 ± 1.15 | 3.67 ± 2.08 | 2.33 ± 0.58 | 5.33 ± 2.08 | 2.33 ± 0.58 | 4.67 ± 2.08         | 6.00 ± 1.00 | 1.00 ± 0.00 |
| CBL 53 <i>Streptococcus thermophilus</i>  | 4.67 ± 0.58 | 3.00 ± 1.00 | 1.67 ± 1.15 | 3.33 ± 1.15 | 4.00 ± 1.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.00 ± 0.00 | 2.67 ± 0.58 | 5.00 ± 1.00         | 2.33 ± 0.58 | 1.00 ± 0.00 |
| DSM 25784 <i>Weissella oryzae</i>         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00         | 1.00 ± 0.00 | 1.00 ± 0.00 |

**Appendice V.3.** Profilo sensoriale valutato per ogni isolato analizzato rispetto alla bevanda a base di orzo. I valori sono espressi come media ± deviazione standard.

## **Capitolo VI \_ Pubblicazioni**

# Yeast and mould dynamics in Caciofiore della Sibilla cheese coagulated with an aqueous extract of *Carlina acanthifolia* All.

Federica Cardinali, Manuela Taccari\*, Vesna Milanović, Andrea Osimani, Serena Polverigiani, Cristiana Garofalo, Roberta Foligni, Massimo Mozzon, Silvia Zitti, Nadia Raffaelli, Francesca Clementi and Lucia Aquilanti

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A), Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy

\*Correspondence to:

M. Taccari, Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali (D3A), Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy.

E-mail: m.taccari@univpm.it

## Abstract

**Caciofiore della Sibilla is a speciality ewes' milk cheese traditionally manufactured in a foothill area of the Marche region (Central Italy) with a crude extract of fresh young leaves of *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* as a coagulating agent. The fungal dynamics and diversity of this speciality cheese were investigated throughout the manufacturing and 20-day ripening process, using a combined PCR–DGGE approach. The fungal biota of a control ewes' milk cheese, manufactured with the same batch of milk coagulated with a commercial animal rennet, was also monitored by PCR–DGGE, in order to investigate the contribution of the peculiar vegetable coagulant to the fungal diversity and dynamics of the cheese. Based on the overall results collected, the raw milk and the dairy environment represented the main sources of fungal contamination, with a marginal or null contribution of thistle rennet to the fungal diversity and dynamics of Caciofiore della Sibilla cheese. Copyright © 2016 John Wiley & Sons, Ltd.**

Received: 22 December 2015  
Accepted: 23 April 2016

**Keywords:** raw ewes' milk cheese; Caciofiore della Sibilla; thistle rennet; yeast; mould; PCR–DGGE

## Introduction

The term 'Caciofiore' refers to Italian soft cheeses traditionally manufactured with raw ewes' milk and a vegetable coagulant mostly obtained from dried flowers of herbaceous perennial plants, native to the western and central Mediterranean area, which are commonly known as 'thistles' and scientifically ascribed to different genera within the composite family Asteraceae, viz. *Cynara* (artichoke or cardoon), *Scolymus* (golden thistle or oyster thistle), *Carlina* (carline thistle) or *Silybum* (milk thistle or Marian thistle).

In the Mediterranean area, the exploitation of thistle rennet, especially obtained from *Cynara cardunculus* L., *Cynara scolymus* L. and *Cynara humilis* L., is not confined to Italy, where renowned speciality cheeses, such as Caciofiore

Aquilano and Caciofiore di Columella, are traditionally manufactured in Abruzzo and Lazio, respectively. The use of this type of vegetable coagulant is also particularly widespread in western Africa (García *et al.*, 2012) and the Iberian Peninsula, the latter boasting a large number of Protected Designation of Origin (PDO) cheeses (Roseiro *et al.*, 2003). Even in Latin-American countries, such as Argentina and Chile, where 'cardo de Castilla' (*C. cardunculus* L.) grows vigorously, thistle rennet is used for the manufacture of a variety of ewes' milk cheeses (Fox, 1999).

Crude extracts from flowers or even leaves of thistles are thermostable and characterized by a high proteolytic activity (Fox, 1999) for the occurrence of aspartic proteases, known as cardonsins (or cynarases and cyprosins), with a

high specificity for caseins (Roseiro *et al.*, 2003). As the number of flowers used for the preparation of the coagulant largely depends on the cheesemaker's experience, the amount of coagulant to be added to the milk is also often empirical.

The impact of vegetable coagulants derived from thistles on milk clotting and the physico-chemical, sensory and textural traits of cheese has been thoroughly investigated (Sanjuán *et al.*, 2002; Tejada *et al.*, 2007; García *et al.*, 2012; Llorente *et al.*, 2014; Ordiales *et al.*, 2014) whereas, to date, the contribution of these plant extracts to cheese microbial diversity and dynamics has undoubtedly been less explored, with only a few studies carried out for this specific purpose (Sousa and Malcata, 1997; Vioque *et al.*, 2000; Gómez *et al.*, 2001; Roseiro *et al.*, 2003; Tejada and Fernández-Salguero, 2003; Aquilanti *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2012; Ordiales *et al.*, 2013). This is especially true for yeasts and moulds, whose occurrence and diversity in vegetable coagulants have been very poorly explored (Roseiro *et al.*, 2003). The importance of these microorganisms in cheese manufacturing is being increasingly acknowledged, due to the many beneficial activities of these microorganisms, including the excretion of growth factors (especially vitamins), the metabolization of lactate/lactose, which enhances the growth of a secondary microbiota constituted by acid-sensitive bacteria, the production of alkaline metabolites and aromatic compounds, the inhibition of spoilage microorganisms, the enhancement of cheese flavour and aroma through proteolysis and lipolysis, and even probiosis (Beresford *et al.*, 2001; Jacques and Casaregola, 2008; Panelli *et al.*, 2013; Padilla *et al.*, 2014; Cardoso *et al.*, 2015). On the other hand, fungi can also act as spoilage microorganisms, causing cheese defects such as cheese softening, superficial discoloration, early blowing and the development of off-flavours (Fleet, 1990; Jakobsen and Narvhus, 1996; Carreira *et al.*, 1998; Wyder *et al.*, 1999). Finally, toxicogenic moulds can produce secondary metabolites, generally referred to as 'mycotoxins', which, once ingested, have serious consequences on consumers' health (Creppy, 2002; Sengun *et al.*, 2008).

The fungal biota is widely distributed in dairy environments, originating from multiple sources, including the raw milk, the indoor air, the processing equipment, brine, starter cultures

(Banjara *et al.*, 2015) as well as deliberately added ingredients, such as milk coagulants.

Based on these premises, the aim of the present study was to investigate the fungal diversity and dynamics of a central Italian speciality raw ewes' milk cheese, locally known as 'Caciofiore della Sibilla', throughout its manufacturing and ripening, as affected by milk coagulation with a crude extract of *Carlina acanthifolia* All. subspecies *acanthifolia*. The ancient procedure for the preparation of the vegetable coagulant has been handed down from father to son for generations; it is based on the use of new fresh leaves – containing a considerable quantity of latex – of carline thistle spontaneously grown in the high-altitude pastures (>1000 m above sea level) of the Monti Sibillini National Park. The availability of young leaves within a very short period of time, spanning late spring to early summer, limits the manufacture of this niche cheese to this time window.

If on the one hand Caciofiore della Sibilla represents a small-batch cheese, produced and consumed in a constricted geographical area, on the other hand it represents a magnificent model of Mediterranean cheese made with carline thistle rennet, whose exploitation in dairy transformations has never yet been documented. Accordingly, the fungal communities of both Caciofiore della Sibilla and a control ewes' milk cheese manufactured using commercial animal rennet were analysed through a combined culture-dependent and -independent (PCR–DGGE) approach, relying on the analysis of the fungal DNA extracted directly from samples and the bulk of cells harvested from selected agar dilution plates.

## Materials and methods

### Yeast and mould reference strains

Two DGGE ladders, referred to as Mix' and Mix'', were constructed using five yeast and three mould reference strains, respectively. These were *Wickerhamomyces anomalus* DBVPG 6613, *Starmerella bombicola* DBVPG 3827, *Candida humilis* CBS 6897<sup>T</sup>, *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171<sup>T</sup>, *Kazachstania exigua* DBVPG 6481, *Alternaria alternata* M9, *Cladosporium* spp. M5 and *Mucor racemosus* M12. The yeasts were purchased from the Industrial Yeasts

Collection (DBVPG; University of Perugia, Italy; <http://www.dbvpg.unipg.it/index.php/en/>) and the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS; Utrecht, The Netherlands; <http://www.cbs.knaw.nl/index>), whereas moulds had previously been isolated and molecularly identified in our laboratory (Garofalo *et al.*, 2012).

### Cheese-making and sampling

Cheese-making trials were conducted in a family-run dairy farm located in the Monti Sibillini National Park (Marche Region, Central Italy), following a traditional manufacturing method (for a flow chart, see supporting information, Figure S1), without any addition of starter culture. The raw milk obtained from ewes of the breed *Sopravissana* during one milking day was split into two batches. The first batch, labelled 'Cf', was coagulated with a crude extract from young fresh leaves of *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*. The crude extract was prepared as follows: the petioles of fresh young leaves from four plants of *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*, harvested from an uncultivated foothill area of the Monti Sibillini National Park, were carefully peeled, chopped with a mezzaluna knife and macerated in an aqueous solution of wine vinegar (1:1 ratio) for ~18 h at room temperature. The preparation was filtered through a muslin cloth and ~100 ml crude extract were used to clot ~10 l raw ewes' milk. The second batch, labelled 'C', was coagulated with commercial powdered calf rennet (Caglifacio Clerici, Cadorago, CO, Italy; 1:10000). For each batch, filtered raw milk was poured into a food-grade steel coagulation vat, heated at ~35–36°C, the coagulant added and gently stirred.

After clotting (ca. 30 min), both curds were manually broken into rice-sized grains, then transferred into 8 × 8 cm plastic perforated moulds and manually pressed to drain the whey. Moulded cheeses were held at 12–13°C for 4 h, dry salted and ripened for 20 days at 12–13°C and 70% relative humidity. For each batch of milk, three cheese wheels were produced. During cheese making and ripening, the following samples were collected in triplicate and transported to the laboratory under refrigerated conditions (+4°C): raw ewes' milk; fresh young leaves of *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*; aqueous crude extract;

curds; and cheeses after 1, 3, 6, 10 and 20 days of ripening. Prior to viable counting and PCR–DGGE analyses, triplicate samples were pooled and processed within 24 h.

### pH measurements

All the collected samples, except for the fresh young leaves of *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*, underwent pH measurement using a pH meter (Model 300, Hanna Instruments, Padova, Italy) equipped with a solid electrode (Model HI2031). For each sample, three independent measurements were performed and means were compared using the Least Significant Differences (LSDs).

### Viable cell counting and bulk formation

Aliquots of solid samples (10 g) were homogenized in 90 ml sterile peptone water (0.1% peptone) with a Stomacher apparatus (400 Circulator, International PBI, Milan, Italy) for 2 min at 260 rpm (Osimani *et al.*, 2009). Liquid samples (raw ewes' milk and crude extract) and the homogenates were serially diluted and an aliquot (100 µl) of each dilution was inoculated in duplicate on a Rose Bengal Agar (RBA; Oxoid) base, supplemented with chloramphenicol (0.1 g/l) and incubated at 25°C for 48 h. Viable counts were expressed as means of the Log colony-forming units (CFU)/g or /ml of sample.

After viable counting, bulk cells were prepared using the method described by Ercolini *et al.* (2001) and a saline solution with added glycerol for cell suspension (Garofalo *et al.*, 2015). For all the samples except cheeses, colonies were harvested from selected RBA plates showing confluent colonies (low sample dilution) and a number of colonies in the range 30–300 (high sample dilution); for cheeses, the sole colonies grown on countable plates were suspended in 2 ml saline solution with added glycerol, harvested with a sterile pipette and stored at –20°C.

### DNA extraction

Direct extraction of fungal DNA from samples collected during cheese making and ripening was performed using a commercial kit (PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit, Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA). Briefly, 1.5 ml of raw milk, curdline

thistle rennet, curd and cheese homogenates were transferred into sterile 2 ml tubes and centrifuged at  $12\,000\times g$  for 10 min. For milk and cheese samples, after centrifugation the fat layer on the top was removed with a sterile cotton tip before discarding the supernatant. Extraction of fungal DNA from bulk cells and from the pure reference strains was performed using the method proposed by Makimura *et al.* (1999). All the DNA suspensions were subjected to optical readings at 260, 280 and 234 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) for the assessment of quantity and purity.

### PCR–DGGE analysis

Amplification of the D1–D2 regions of the 26S rRNA gene was performed using primers NL1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3'), with the GC clamp described by Sheffield *et al.* (1989) added at the 5' end, and LS2 (5'-ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC-3') (Cocolin *et al.*, 2000); 2  $\mu$ l fungal DNA (adjusted to 50 ng/ $\mu$ l) were amplified, as reported by Osimani *et al.* (2015), in the thermal cycler MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); aliquots (5  $\mu$ l) of the PCR products were routinely checked for positive amplification on 1.5% w/v agarose gels prior to further DGGE analysis.

PCR products were then separated in 8% polyacrylamide (acrylamide/bis-acrylamide mix 37.5:1 w/v) gels, with a denaturant gradient made of urea/formamide 30–60% w/v, using the DGGE Bio-Rad D-code™ apparatus (Bio-Rad Laboratories). The gels were subjected to a constant voltage of 130 V for 4 h at 60°C. After electrophoresis, the gels were stained in 1 $\times$  TAE buffer containing SYBR Green I Stain 1X (Lonza, Walkersville, MD, USA) and photographed under UV transillumination, using the Complete Photo XT101 system (Explera, Jesi, Italy).

DGGE bands (labelled with unique and progressive numerical codes), selected among those migrating at the same position in the acrylamide gels, were excised from the gels with sterile pipette tips and transferred into microtubes containing 50  $\mu$ l sterile deionized water for elution of DNA. After overnight incubation at 4°C, 5  $\mu$ l DNA suspension was re-amplified with the same primer set (the forward primer deprived of the

GC clamp) and sent to Beckman Coulter Genomics (Hope End, Takeley, UK) for purification and sequencing. The sequences obtained in FASTA format were compared with those deposited in the GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), using basic BLAST search tools (Altschul *et al.*, 1990). A sequence identity  $\geq 97\%$  was chosen as a threshold for unambiguous assignment into species. Sequences > 200 bp have been deposited in the NCBI GenBank data library under Accession Nos KU196966–KU197012.

### Statistical analysis

Viable counts and pH data recorded during cheese ripening at five selected time points (1, 3, 6, 10 and 20 days of maturation) were analysed by a multivariate analysis of variance (MANOVA) for repeated measures. For each sampling time, viable counts and pHs of both batches were compared according to Student's *t*-test ( $\alpha = 0.05$ ). All statistical analyses were performed using JMP statistical software v. 11.0.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## Results

### pH measurement and viable counting of fungi

Results from MANOVA demonstrated a significant effect of the cheese batch, Cf or C ( $p < 0.0001$ ) and ripening time ( $p < 0.0001$ ) on fungal viable counts. A significant effect of both cheese batches ( $p = 0.0410$ ) and ripening time ( $p = 0.0319$ ) on pH was also seen, although for the latter parameter the variation during ripening was not consistent over time ( $p = 0.0295$ ) (Table 1).

The results of pH measurement and viable counting are reported in Table 2. With regard to pH, a drop was seen throughout the two cheese-making processes, with significant differences occurring between curds and cheeses from batches Cf and C, until day 10 of ripening. By contrast, after 20 days of maturation, Caciofiore della Sibilla and the control ewes' milk cheeses reached comparable pH values. Regarding the aqueous extract from carline thistle, a very low pH value (3.79), feasibly due to the high concentration of acetic acid, was recorded.

Regarding the microbiological analyses, in both cheese manufactures the fungi progressively

**Table 1.** Multivariate analysis of variation (MANOVA) on repeated measures for fungal viable counts and pH values testing the effect of cheese batch, ripening time and their interaction

| Effect                       | DF | F       | Fungal viable counts | F      | pH      |
|------------------------------|----|---------|----------------------|--------|---------|
| Cheese batch                 | 1  | 61592.9 | <0.0001*             | 8.85   | 0.0410* |
| Ripening time                | 4  | 1088.8  | <0.0001*             | 550.73 | 0.0319* |
| Cheese batch × ripening time | 4  | 84.2    | 0.0815               | 647.17 | 0.0295* |

DF, Degree of freedom F, F-Value of the test.

**Table 2.** pH and viable counts of fungi, expressed as mean values of samples collected during cheese-making and ripening of Caciofiore della Sibilla and control ewes' milk cheese

| Sample                                           | pH                                         |                    | p        |
|--------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------|----------|
|                                                  | Caciofiore della Sibilla (Cf)              | Control cheese (C) |          |
| Raw milk                                         | 6.39                                       |                    |          |
| Carline thistle rennet                           | 3.79                                       | n.a.               |          |
| Curd                                             | 5.14                                       | 6.43               | <0.0001* |
| 1-day ripened cheese                             | 5.22 <sup>c</sup>                          | 5.84 <sup>a</sup>  | <0.0001* |
| 3-day ripened cheese                             | 5.31 <sup>b</sup>                          | 5.04 <sup>b</sup>  | <0.0001* |
| 6-day ripened cheese                             | 5.38 <sup>a</sup>                          | 5.08 <sup>b</sup>  | <0.0001* |
| 10-day ripened cheese                            | 5.23 <sup>c</sup>                          | 4.97 <sup>b</sup>  | 0.0002*  |
| 20-day ripened cheese                            | 5.02 <sup>d</sup>                          | 4.94 <sup>b</sup>  | 0.4169   |
| LSD                                              | 0.048                                      | 0.177              |          |
|                                                  | Fungal viable counts (log CFU/g or CFU/ml) |                    |          |
|                                                  | Caciofiore della Sibilla (Cf)              | Control cheese (C) |          |
| Raw milk                                         | 2.42                                       |                    |          |
| Phyllosphere of <i>Carlina acanthifolia</i> All. | 5.35                                       | n.a.               |          |
| Carline thistle rennet                           | 3.54                                       | n.a.               |          |
| Curd                                             | 3.50                                       | 3.51               | 0.8026   |
| 1-day ripened cheese                             | 5.13 <sup>d</sup>                          | 4.65 <sup>e</sup>  | <0.0001* |
| 3-day ripened cheese                             | 7.12 <sup>c</sup>                          | 6.03 <sup>c</sup>  | <0.0001* |
| 6-day ripened cheese                             | 7.41 <sup>b</sup>                          | 6.71 <sup>b</sup>  | 0.0003*  |
| 10-day ripened cheese                            | 7.89 <sup>a</sup>                          | 6.83 <sup>a</sup>  | <0.0001* |
| 20-day ripened cheese                            | 7.43 <sup>b</sup>                          | 5.42 <sup>d</sup>  | <0.0001* |
| LSD                                              | 0.156                                      | 0.098              |          |

Least significant differences (LSDs) are also reported. Mean separation test of pH and viable counts of fungi throughout ripening; different letters on the same column indicate significant differences over time according to Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ).

\*Occurrence of significant differences due to cheese batch (C or Cf) according to Student's *t*-test ( $\alpha = 0.05$ ).

n.a., not applicable.

increased from the raw milk (2.42 log CFU/ml) to cheese until day 10 of maturation, whereas after 20 days the load of this microbial group decreased

in both cheese manufactures. Fungal viable counts were consistently higher on Cf compared to C throughout the whole process. Relatively high fungal loads were also found in the phyllosphere of *C. acanthifolia* All. (5.35 log CFU/g) and in the crude extract from crushed fresh young leaves (3.54 log CFU/g) (Table 2).

### PCR–DGGE analyses

The results of the alignments of selected DGGE bands are reported in the supporting information (Table S1), while the overall taxa identified are listed in Table 3. The DGGE profiles obtained from analysis of the fungal DNA extracted from the samples and the bulk cells are shown in Figures 1 and 2. The analysis of the fungal microbiota characterizing the phyllosphere of *C. acanthifolia* All. and the vegetable coagulant revealed the occurrence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida zeylanoides*, respectively. Other yeast species were also detected in these samples: *Candida parapsilosis* plus *Galactomyces candidus*, which is better known by the anamorphic name *Geotrichum candidum*, in the vegetable coagulant; and *Rhodotorula mucilaginosa* plus *Cladosporium coraloides* on the phyllosphere of *C. acanthifolia* All., respectively; in the latter sample, the mould species *Fusarium oxysporium* was also found.

As regards the raw milk, curds and cheeses sampled during ripening, a higher biodiversity of fungi was seen with respect to milk, with numerous yeasts and moulds detected. A few taxa were exclusively found in the raw milk (*Saccharomyces cerevisiae*) or in the curd obtained by milk coagulation with commercial animal rennet (*Cladosporium cladosporioides*, *Cryptococcus wieringae*), whereas others occurred in different samples, as was the case for *Candida membranifaciens*, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *G. candidum*, *Kluyveromyces marxianus*,

**Table 3.** Yeasts and moulds identified by PCR–DGGE analysis during the manufacture and ripening of Caciofiore della Sibilla and control ewes' milk cheeses

|                                       |                                                         | <i>Candida<br/>inconspicua</i> | <i>Candida<br/>membranifaciens</i> | <i>Candida<br/>parapsilosis</i> | <i>Candida<br/>zeylanoides</i> | <i>Cladosporium<br/>coralloides</i> | <i>Cladosporium<br/>cladosporioides</i> | <i>Cryptococcus<br/>wieringae</i> | <i>Debaryomyces<br/>hansenii</i> | <i>Fusarium<br/>oxysporium</i> | <i>Geotrichum<br/>candidum</i> |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Caciofiore<br>della Sibilla<br>cheese | Raw milk                                                |                                |                                    | •                               | •                              |                                     |                                         |                                   | •                                |                                |                                |
|                                       | Phyllosphere<br>of <i>Carlina<br/>acanthifolia</i> All. |                                |                                    |                                 | ◦                              | ■                                   |                                         |                                   | •                                | ■                              |                                |
|                                       | Carlina thistle<br>rennet                               |                                |                                    | •                               | ◦□                             |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                | ■                              |
|                                       | Curd                                                    | •                              |                                    | •                               | ◦                              |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                | ■                              |
|                                       | Cheese t1                                               | •                              | •                                  |                                 | •                              |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                |                                |
|                                       | Cheese t3                                               | •                              |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                | ■                              |
|                                       | Cheese t6                                               |                                |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                |                                |
|                                       | Cheese t10                                              |                                |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                |                                |
|                                       | Cheese t20                                              | •                              |                                    |                                 | ■                              |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                | ■                              |
|                                       | Curd                                                    |                                | •                                  | •                               | •                              | ■                                   | •                                       |                                   | •                                |                                |                                |
|                                       | Cheese t1                                               |                                | •                                  |                                 | •                              |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                |                                |
|                                       | Cheese t3                                               | •                              |                                    |                                 | •                              |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                |                                |
|                                       | Cheese t6                                               |                                |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                | •                              |
|                                       | Cheese t10                                              |                                | •                                  |                                 | ■                              |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                | •                              |
|                                       | Cheese t20                                              |                                |                                    |                                 | •                              |                                     |                                         |                                   | ■                                |                                | •                              |
| Control<br>cheese                     |                                                         |                                |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   |                                  |                                |                                |
|                                       |                                                         |                                |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   |                                  |                                |                                |
|                                       |                                                         |                                |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   |                                  |                                |                                |
|                                       |                                                         |                                |                                    |                                 |                                |                                     |                                         |                                   |                                  |                                |                                |

• DGGE bands resulting from analysis of the DNA extracted from the bulk of colonies harvested from selected Rose Bengal chloramphenicol agar (RBA) plates, showing > 97% of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in GenBank.

◦ DGGE bands resulting from analysis of the DNA extracted from the bulk of colonies harvested from selected RBA plates, showing < 97% of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in GenBank.

■ DGGE bands resulting from analysis of the DNA extracted directly from samples collected during cheese making, showing ≥ 97% of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in GenBank.

□ DGGE bands resulting from analysis of the DNA extracted directly from samples collected during cheese making, showing < 97% of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in GenBank.

t1, cheese sampled after 1 day of maturation; t3, cheese sampled after 3 days of maturation; t6, cheese sampled after 6 days of maturation; t10, cheese sampled after 10 days of maturation; t20, cheese sampled after 20 days of maturation.

**Table 3.** Yeasts and moulds identified by PCR–DGGE analysis during the manufacture and ripening of Caciofiore della Sibilla and control ewes' milk cheeses

|  |                                                               | <i>Kluyveromyces<br/>marxianus</i> | <i>Meyerozyma<br/>guilliermondii</i> | <i>Penicillium<br/>sp.</i> | <i>Candida<br/>inconspicua</i> | <i>Pichia<br/>kluyveri</i> | <i>Pichia<br/>kudriavzevii</i> | <i>Rhizophus<br/>stolonifer</i> | <i>Rhodotorula<br/>mucilaginosa</i> | <i>Yarrowia<br/>lipolytica</i> | <i>Saccharomyces<br/>cerevisiae</i> |
|--|---------------------------------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|--------------------------------|----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
|  | Raw milk                                                      | •                                  |                                      |                            |                                |                            |                                |                                 | •                                   |                                | □                                   |
|  | Phyllosphere<br>of <i>Carlina</i><br><i>acanthifolia</i> All. |                                    |                                      |                            |                                |                            |                                |                                 | •                                   |                                |                                     |
|  | Carlina thistle<br>rennet                                     |                                    |                                      |                            |                                |                            |                                |                                 |                                     |                                |                                     |
|  | Curd                                                          |                                    | •                                    |                            | •                              |                            |                                |                                 | •                                   |                                |                                     |
|  | Cheese t1                                                     |                                    |                                      |                            | •                              | •                          | •                              | ■                               | •                                   |                                |                                     |
|  | Cheese t3                                                     |                                    | •                                    | ■                          | •                              | •                          | •                              | ■                               |                                     | •                              |                                     |
|  | Cheese t6                                                     |                                    |                                      | ■                          |                                |                            | •                              | ■                               |                                     |                                |                                     |
|  | Cheese t10                                                    |                                    |                                      | ■                          |                                |                            |                                | ■                               |                                     |                                |                                     |
|  | Cheese t20                                                    |                                    | •                                    |                            | •                              | •                          | •                              | ■                               |                                     | •                              |                                     |
|  | Curd                                                          | •                                  |                                      |                            |                                |                            |                                |                                 | •                                   |                                |                                     |
|  | Cheese t1                                                     | •                                  |                                      |                            |                                | •                          | •                              | ■                               | •                                   | •                              |                                     |
|  | Cheese t3                                                     | •                                  |                                      | ■                          | •                              |                            | •                              | ■                               |                                     |                                |                                     |
|  | Cheese t6                                                     |                                    |                                      | •                          |                                |                            | •                              |                                 |                                     |                                |                                     |
|  | Cheese t10                                                    |                                    |                                      | ■                          |                                |                            |                                | ■                               |                                     |                                |                                     |
|  | Cheese t20                                                    | •                                  |                                      | ■                          |                                |                            | •                              | ■                               |                                     |                                |                                     |

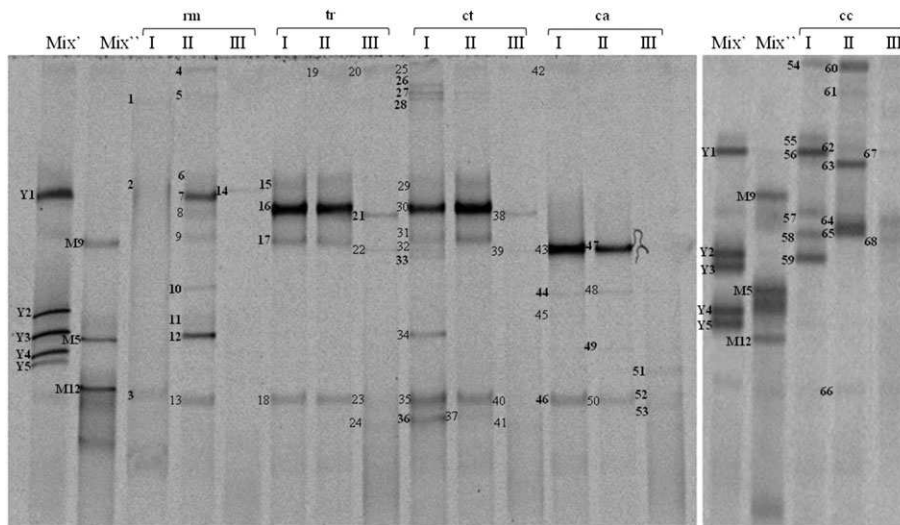


**Figure 1.** Fungal DGGE profiles of DNA extracted directly from the bulk of colonies harvested from Rose Bengal chloramphenicol agar (RBA) plates spiked with the highest and lowest dilutions (lanes I and II) and of DNA extracted directly from samples (lane III) of raw ewes' milk (rm), carline thistle rennet (tr), curd obtained by milk coagulation with carline thistle rennet (ct), fresh young leaves of *Carlina acanthifolia* All. (ca) and curd obtained by milk coagulation with commercial animal rennet (cc). Ladder (Mix'): *Wickerhamomyces anomalus* DBVPG 6613 (Y1), *Starmerella bombicola* DBVPG 3827 (Y2), *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171<sup>T</sup> (Y3), *Kazachstania exigua* DBVPG 6481 (Y4) and *Candida humilis* CBS 6897<sup>T</sup> (Y5). Ladder (Mix''): *Alternaria alternata* (M9), *Cladosporium* spp. (M5) and *Mucor racemosus* (M12)

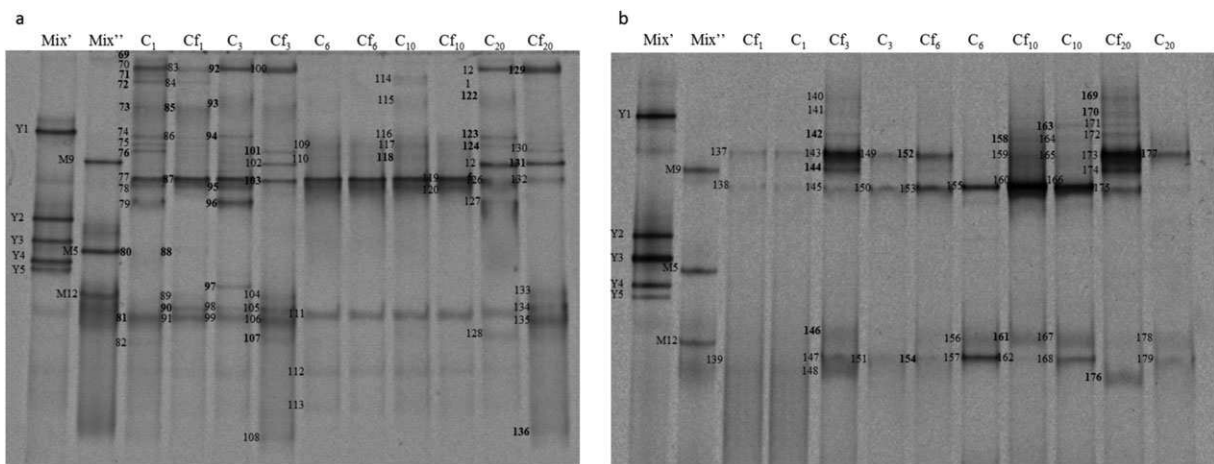


**Figure 2.** Fungal DGGE profiles of the DNA extracted from (a) the bulk of colonies harvested from selected RBA plates and (b) samples of Caciofiore della Sibilla cheese (batch Cf) and control raw ewes' milk cheese (batch C) collected at days 1, 3, 6, 10 and 20 of ripening (Cf<sub>1</sub>, Cf<sub>3</sub>, Cf<sub>6</sub>, Cf<sub>10</sub>, Cf<sub>20</sub> and C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>20</sub>, respectively). Ladder (Mix'): *Wickerhamomyces anomalus* DBVPG 6613 (Y1), *Starmerella bombicola* DBVPG 3827 (Y2), *Saccharomyces cerevisiae* CBS 1171<sup>T</sup> (Y3), *Kazachstania exigua* DBVPG 6481 (Y4) and *Candida humilis* CBS 6897<sup>T</sup> (Y5). Ladder (Mix''): *Alternaria alternata* (M9), *Cladosporium* spp. (M5), *Mucor racemosus* (M12)

*Meyerozyma guilliermondii*, *Penicillium* sp., *C. inospicua* (teleomorph *Pichia cactophila*), *Pichia kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *Rhizopus stolonifer*, *R. mucilaginosa* and *Yarrowia lypolitica*. Among

these, some taxa could be detected exclusively in the raw milk and during the early stage of maturation (*C. parapsilosis*, *R. mucilaginosa*), whereas others occurred occasionally (e.g. *C. zelanoydes*,

*G. candidum*) or stably (*D. hansenii*, *P. kudriavzevii*, *R. stolonifer*) throughout the cheese-making and ripening period. Furthermore, species apparently associated to one cheese manufacture rather than the other were also encountered, such as *M. guilliermondii* and *K. marxianus*, which were found exclusively in the Caciofiore della Sibilla and control ewes' milk cheese, respectively.

## Discussion

Numerous studies have previously been focused on the effect of thistle coagulants, especially made from *C. cardunculus*, *C. scolymus* or *C. humilis*, on the microbiological properties of traditional cheeses (Vioque *et al.*, 2000; Roseiro *et al.*, 2003; Fernández-Salguero *et al.*, 2002) but, to the author's knowledge, this is the first attempt to shed light on the contribution of thistle coagulants to the fungal diversity and dynamics of the cheese. Furthermore, this is the first report describing the exploitation of the botanical species *C. acanthifolia* All. in cheese-making. This research also contributes to the assessment of the fungal load and diversity in thistle phyllosphere and raw ewes' milk, which are two poorly investigated ecosystems.

Concerning the latter ecosystem, comparable or slightly lower viable counts were seen compared with those reported by other authors for raw milk (Vioque *et al.*, 2000; Roseiro *et al.*, 2003; Pangallo *et al.*, 2014; Gardini *et al.*, 2006; Tejada and Fernández-Salguero, 2003). As has previously been elucidated, the relatively low contamination of raw milk with fungi can be mainly ascribed to the competitive interaction for growth substrates by psychrotrophic bacteria or the excretion of inhibiting metabolites by these microorganisms (Viljoen, 2001).

By contrast, the phyllosphere of *C. acanthifolia* All. was found to be colonized by a relatively high load of yeasts and moulds, thus supporting the assumption of an effective role of the vegetable coagulant in the contamination of the cheese milk with these microorganisms. However, no significant differences ( $p = 0.8026$ ) were observed in the curds made with vegetable and animal rennet, respectively, thus denying such an assumption.

As regards cheeses in the early stage of maturation, after 1 day of ripening, viable counts were almost 3 and 2 Log units higher than those initially found in the raw milk, respectively; in both cheese manufactures (batches Cf and C), yeasts and moulds reached the highest load after 10 days of maturation. However, a significantly higher evolution of the fungal community was seen throughout the ripening of Caciofiore della Sibilla compared with the control ewes' milk cheese. In other studies, carried out on traditional Iberian cheeses manufactured with vegetable coagulants from thistle flowers, a relatively poorer occurrence of fungi was seen in cheeses after 15 days of maturation, with viable counts approximately two or three orders of magnitude lower (Gómez *et al.*, 2001; Vioque *et al.*, 2000; Tejada and Fernández-Salguero, 2003). Although this represents interesting evidence, is not possible to determine whether it was associated with the specific cheese batch or to this type of cheese.

The PCR–DGGE fingerprinting of samples collected during cheese-making and ripening allowed the evolution of the fungal microbiota to be traced and the potential sources of curd and cheese contamination with yeasts and moulds to be identified. These microorganisms can grow either in the cheese core or on the rind, being favoured by the peculiar physicochemical properties characterizing the cheese environment, such as the low pH, the reduced water activity, the high salt concentration and the low storage temperature (Padilla *et al.*, 2014; Cheong *et al.*, 2014). The composition of the cheese fungal biota has been found to change among cheeses of different varieties, cheeses of the same variety from different producers and even cheese batches of the same variety from the same producer (Banjara *et al.*, 2015).

In the present study, a wide range of yeast species was identified with the double PCR–DGGE approach; most of these taxa had previously been found in raw milk, curd or cheese, including *K. marxianus* (Macedo *et al.*, 1995; Lavoie *et al.*, 2012; Quigley *et al.*, 2013), *D. hansenii*, *S. cerevisiae* and *Rhodotorula* spp. (Capece and Romano, 2009; Cosentino *et al.*, 2001; Fadda *et al.*, 2001). Of these, *K. marxianus* is known to have a positive impact on cheese quality, either as a result of the development of

flavour compounds during maturation or because of partial de-acidification due to lactate/lactose consumption, the latter enhancing the growth of acid-sensitive bacteria (Corsetti *et al.*, 2001). *D. hansenii* has also been reported to play a key role during cheese ripening, for the ability of this yeast, growing in high salt concentrations and low pH (Beresford *et al.*, 2001; Büchl and Seiler, 2011; Padilla *et al.*, 2014), to utilize several carbon and nitrogen sources and to produce proteolytic and lipolytic enzymes capable of metabolizing milk proteins and fat (Banjara *et al.*, 2015; Cardoso *et al.*, 2015). A high proteolytic and lipolytic activity also characterizes the majority of strains ascribed to *R. mucilaginosa* (Fadda *et al.*, 2010; Cardoso *et al.*, 2015), a further yeast species frequently occurring in raw milk and cheese (Fadda *et al.*, 2010; Pereira-Dias *et al.*, 2000; Corbo *et al.*, 2001; Cocolin *et al.*, 2002; Borelli *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2013; Lavoie *et al.*, 2012).

Other species, such as *C. membranifaciens*, *G. candidum* and *P. inconspicua* have been more rarely identified in milk-based products, whereas, to the authors' knowledge, this is the first report of *M. guilliermondii* in raw ewes' milk cheese. To date, this yeast, which is commonly isolated from fruit surfaces (Pelliccia *et al.*, 2011), where it shows a great potential for the postharvest control of spoilage fungi (Corte *et al.*, 2015), has been detected in goats' and cows' milk cheeses, as well as in butter milk, yogurt and the dairy environment (Büchl and Seiler, 2011; Giannino *et al.*, 2011; Callon *et al.*, 2006). Its capacity to produce flavour compounds in fermented food products is acknowledged (Wah *et al.*, 2013).

Other interesting evidence emerged by comparing the fungal dynamics in the Caciofiore della Sibilla and the control ewes' milk cheeses. First, the fingerprinting of the fungal biota occurring in samples collected at different steps during the two cheese-making processes allowed a microbial succession to be observed in both cheese manufactures, with some taxa occurring in the sole raw milk (*S. cerevisiae*), others in the early (*C. parapsilopsis* and *R. mucilaginosa*) or late (*Penicillium* sp.) stages of fermentation and maturation, and further species occurring throughout the whole process (*C. zeylanoides* and *D. hansenii*). In addition to the species that are well adapted to the cheese environment

and stably detected in cheeses during maturation, such as *C. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *R. stolonifer* and *Y. lipolytica*, other species occurring as occasional contaminants were also sporadically found, such as *C. cladosporioides* and *C. wieringae*.

Among the overall taxa identified, only *M. guilliermondii* and *K. marxianus* were exclusively found in the Caciofiore della Sibilla and control ewes' milk cheese, respectively.

As regards cheese contamination, multiple sources, such as the vegetable coagulant, the raw milk and the dairy environment, can be assumed to have played a role; in more detail, *C. parapsilosis*, *C. zeylanoides*, *K. marxianus* and *R. mucilaginosa* feasibly originated from the raw milk, whereas for *C. membranifaciens*, *C. inconspicua*, *P. kluyveri*, *P. kudriavzevii*, *R. stolonifera* and *Y. lipolytica*, cheese contamination from the dairy environment can be hypothesized.

Although no species occurring in the vegetable coagulant were found to distinctively characterize the Caciofiore della Sibilla cheese, the joint contribution of thistle rennet together with the raw milk and the dairy environment to the fungal diversity of this speciality cheese cannot be denied.

## Acknowledgements

This study was financially supported by the Regione Marche in the context of the project 'Valorizzazione di prodotti alimentari della tradizione marchigiana'. The authors wish to thank 'Caseificio degli Angeli' (Pievotorina, MC, Italy) for conducting the cheese-making trials and for supplying the samples.

## References

- Altschul SF, Gish W, Miller W, *et al.* 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3): 403–410.
- Aquilanti L, Babini V, Santarelli S, *et al.* 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Lett Appl Microbiol* **52**: 651–9.
- Banjara N, Suhr MJ, Hallen-Adams HE. 2015. Diversity of yeast and mold species from a variety of cheese types. *Curr Microbiol* **70**: 792–800.
- Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. 2001. Recent advance in cheese microbiology. *Int Dairy J* **11**: 259–74.
- Borelli B, Ferreira E, Lacerda I, *et al.* 2006. Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World J Microbiol Biotechnol* **22**: 1115–1119.

- Büchl NR, Seiler H. 2011. Yeasts and molds—yeasts in milk and dairy products. In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Roginski H, Fuquay JW, Fox PF (eds), 2nd edn. Elsevier: New York; 744–753.
- Callon C, Delbès C, Duthoit F, Montel MC. 2006. Application of SSCP-PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. *Syst Appl Microbiol* **29**: 172–180.
- Capece A, Romano P. 2009. 'Pecorino di Filiano' cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. *Int J Food Microbiol* **132**: 180–184.
- Cardoso VM, Borelli BM, Lara CA, *et al.* 2015. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Res Int* **69**: 331–340.
- Carreira A, Paloma L, Loureiro V. 1998. Pigment producing yeasts involved in the brown surface discoloration of ewes' cheese. *Int J Food Microbiol* **41**: 223–230.
- Cheong EYL, Sandhu A, Jayabalan J, *et al.* 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control* **46**: 91–97.
- Cocolin L, Aggio D, Manzano M, *et al.* 2002. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *Int Dairy J* **12**: 407–411.
- Cocolin L, Bisson LF, Mills DA. 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 81–87.
- Corbo MR, Lanciotti R, Albenzio M, Sinigaglia M. 2001. Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int J Food Microbiol* **69**: 147–152.
- Corsetti A, Rossi J, Gobbetti M. 2001. Interactions between yeasts and bacteria in the smear surface ripened cheeses. *Int J Food Microbiol* **69**: 1–10.
- Corte L, di Cagno R, Groenewald M, *et al.* 2015. Phenotypic and molecular diversity of *Meyerozyma guilliermondii* strains isolated from food and other environmental niches, hints for an incipient speciation. *Food Microbiol* **48**: 206–215.
- Cosentino S, Fadda ME, Deplano M, *et al.* 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *Int J Food Microbiol* **69**: 53–58.
- Creppy EE. 2002. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* **127**: 19–28.
- Ercolini D, Moschetti G, Blaiotta G, Coppola S. 2001. The potential of a polyphasic PCR-DGGE approach in evaluating microbial diversity of natural whey cultures for water-buffalo mozzarella cheese production: bias of culture-dependent and culture-independent analyses. *Syst Appl Microbiol* **24**: 610–617.
- Fadda ME, Cosentino S, Deplano M, Palmas F. 2001. Yeast populations in Sardinian Feta cheese. *Int J Food Microbiol* **69**: 153–156.
- Fadda ME, Viale S, Deplano M, *et al.* 2010. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goat's milk collected in Sardinia. *Int J Food Microbiol* **136**: 376–380.
- Fernández-Salguero J, Tejada L, Gómez R. 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *J Sci Food Agric* **82**: 464–468.
- Fleet GH. 1990. Yeasts in dairy products. *J Appl Bacteriol* **68**: 199–211.
- Fox PF (ed). 1999. *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology*, vol. 2. Aspen: Gaithersburg, MD.
- Galán E, Cabezas L, Fernández-Salguero J. 2012. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *Int Dairy J* **25**: 92–96.
- García V, Rovira S, Teruel R, *et al.* 2012. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats' cheese. *Dairy Sci Technol* **92**: 691–707.
- Gardini F, Tofalo R, Belletti N, *et al.* 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol* **23**: 641–648.
- Garofalo C, Zannini E, Aquilanti L, *et al.* 2012. Selection of sourdough lactobacilli with antifungal activity for use as biopreservatives in bakery products. *J Agr Food Chem* **60**: 7719–7728.
- Garofalo C, Osimani A, Milanović V, *et al.* 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiol* **49**: 123–133.
- Giannino ML, Buffoni JN, Massone E, Feligini M. 2011. Internal transcribed spacer as a target to assess yeast biodiversity in Italian Taleggio PDO cheese. *J Food Sci* **76**: 511–514.
- Gómez R, Sánchez E, Vioque M, *et al.* 2001. Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara L.* *Milchwissenschaft* **56**: 16–19.
- Jacques N, Casaregola S. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the hemiascomycetous yeasts. *Int J Food Microbiol* **126**: 321–326.
- Jakobsen M, Narvhus J. 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int Dairy J* **6**: 755–768.
- Lavoie K, Touchette M, St-Gelais D, Labrie S. 2012. Characterization of the fungal microflora in raw milk and specialty cheeses of the province of Quebec. *Dairy Sci Technol* **92**: 455–468.
- Llorente BE, David W, Avilés FX, *et al.* 2014. Use of artichoke (*Cynara scolymus*) flower extract as a substitute for bovine rennet in the manufacture of Gouda-type cheese: characterization of aspartic proteases. *Food Chem* **159**: 55–63.
- Macedo AC, Malcata FX, Hogg TA. 1995. Microbiological profile of Serra ewes' cheese during ripening. *J Appl Bacteriol* **79**: 1–11.
- Makimura K, Tamura Y, Mochizuki T, *et al.* 1999. Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *J Clin Microbiol* **37**: 920–924.
- Ordiales E, Benito MJ, Martín A, *et al.* 2013. Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese 'Torta del Casar' made without the addition of a starter. *Food Control* **33**: 448–454.
- Ordiales E, Martín A, Benito MJ, *et al.* 2014. Influence of the technological properties of vegetable rennet (*Cynara cardunculus*) on the physicochemical, sensory and rheological characteristics of 'Torta del Casar' cheese. *Int J Dairy Technol* **67**: 402–409.
- Osimani A, Zannini E, Aquilanti L, *et al.* 2009. Lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of the Marche Region. *Ital J Food Sci* **21**: 269–286.
- Osimani A, Garofalo C, Aquilanti L, *et al.* 2015. Unpasteurized commercial boza as a source of microbial diversity. *Int J Food Microbiol* **194**: 62–70.

- Padilla B, Manzanares P, Belloch C. 2014. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes' and goats' cheeses. *Food Microbiol* **38**: 160–166.
- Panelli S, Brambati E, Bonacina C, Feligini M. 2013. Diversity of fungal flora in raw milk from the Italian Alps in relation to pasture altitude. *Springerplus* **2**: 405.
- Pangallo D, Saková N, Koreňová J, et al. 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *Int J Food Microbiol* **170**: 38–43.
- Pelliccia C, Antonielli L, Corte L, et al. 2011. Preliminary prospection of the yeast biodiversity on apple and pear surfaces from Northern Italy orchards. *Ann Microbiol* **61**: 965–972.
- Pereira-Dias S, Potes ME, Marinho A, et al. 2000. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *Int J Food Microbiol* **60**: 55–63.
- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, et al. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* **37**: 664–698.
- Roseiro LB, Barbosa M, Ames JM, Wilbey RA. 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants – the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *Int J Dairy Technol* **56**: 76–85.
- Sanjuán E, Millán R, Saavedra P, et al. 2002. Influence of animal and vegetable rennet on the physicochemical characteristics of Los Pedroches cheese during ripening. *Food Chem* **78**: 281–289.
- Sengun IY, Yaman DB, Gonul SA. 2008. Mycotoxins and mould contamination in cheese: a review. *World Mycotoxin J* **1**: 291–298.
- Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. 1989. Attachment of a 40-base pairs G + C-rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 297–303.
- Sousa MJ, Malcata FX. 1997. Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese. *J Agric Food Chem* **45**: 74–81.
- Tejada L, Fernández-Salguero J. 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Ital J Food Sci* **15**: 125–131.
- Tejada L, Gómez R, Fernández-Salguero J. 2007. Sensory characteristics of ewes' milk cheese made with three types of coagulant: calf rennet, powdered vegetable coagulant and crude aqueous extract from *Cynara cardunculus*. *J Food Qual* **30**: 91–103.
- Viljoen BC. 2001. The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *Int J Food Microbiol* **69**: 37–44.
- Vioque M, Gómez R, Sánchez E, et al. 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J Agric Food Chem* **48**: 451–456.
- Wah TT, Walaisri S, Assavanig A, et al. 2013. Co-culturing of *Pichia guilliermondii* enhanced volatile flavor compound formation by *Zygosaccharomyces rouxii* in the model system of Thai soy sauce fermentation. *Int J Food Microbiol* **160**: 282–289.
- Wyder MT, Bachmann HP, Puhani Z. 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in foil-wrapped Raclette cheese. *Lebensm Wiss Technol* **32**: 333–343.

## Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web site:

**Figure S1.** Flow chart of the traditional manufacturing process of Caciofiore della Sibilla cheese

**Table S1.** Results from the sequencing of bands cut from the DGGE gels



## Short Communication

Impact of thistle rennet from *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* on bacterial diversity and dynamics of a specialty Italian raw ewes' milk cheese

Federica Cardinali<sup>a</sup>, Andrea Osimani<sup>a</sup>, Manuela Taccari<sup>a</sup>, Vesna Milanović<sup>a</sup>, Cristiana Garofalo<sup>a</sup>, Francesca Clementi<sup>a</sup>, Serena Polverigiani<sup>a</sup>, Silvia Zitti<sup>a</sup>, Nadia Raffaelli<sup>a</sup>, Massimo Mozzon<sup>a</sup>, Roberta Foligni<sup>a</sup>, Elena Franciosi<sup>b</sup>, Kieran Tuohy<sup>b</sup>, Lucia Aquilanti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari, ed Ambientali (D3A), Università Politecnica delle Marche, via Brecce Bianche, 60131 Ancona, Italy

<sup>b</sup> Food Quality and Nutrition Department (DQAN), Research and Innovation Center, Fondazione Edmund Mach (FEM), via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige, Italy

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Sopravissana raw ewes' milk cheese  
Vegetable milk coagulant  
Bacterial biota  
Culture  
PCR-DGGE  
High-throughput sequencing

## ABSTRACT

*Caciofiore della Sibilla* is an Italian specialty soft cheese manufactured with *Sopravissana* raw ewes' milk and thistle rennet prepared with young fresh leaves and stems of *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*, according to an ancient tradition deeply rooted in the territory of origin (mountainous hinterland of the Marche region, Central Italy). In this study, the impact of thistle rennet on the bacterial dynamics and diversity of *Caciofiore della Sibilla* cheese was investigated by applying a polyphasic approach based on culture and DNA-based techniques (Illumina sequencing and PCR-DGGE). A control cheese manufactured with the same batch of ewes' raw milk and commercial animal rennet was analyzed in parallel. Overall, a large number of bacterial taxa were identified, including spoilage, environmental and pro-technological bacteria, primarily ascribed to *Lactobacillales*. Thistle rennet was observed clearly to affect the early bacterial dynamics of *Caciofiore della Sibilla* cheese with *Lactobacillus alimentarius/paralimentarius* and *Lactobacillus plantarum/paraplantarum/pentosus* being detected in the phyllosphere of *C. acanthifolia* All., thistle rennet and curd obtained with thistle rennet. Other bacterial taxa, hypothetically originating from the vegetable coagulant (*Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Leuconostoc mesenteroides/pseudomesenteroides*), were exclusively found in *Caciofiore della Sibilla* cheese by PCR-DGGE. At the end of the maturation period, Illumina sequencing demonstrated that both cheeses were dominated by *Lactobacillales*; however curd and cheese produced with thistle rennet were co-dominated by *Lactobacillus* and *Leuconostoc*, whereas *Lactococcus* prevailed in curd and cheese produced with commercial animal rennet followed by *Lactobacillus*. Differences in the bacterial composition between the two cheeses at the end of their maturation period were confirmed by PCR-DGGE analysis.

## 1. Introduction

*Caciofiore della Sibilla* is a specialty soft cheese manufactured in a restricted central Italian geographical area using *Sopravissana* raw ewes' milk and thistle rennet obtained from young fresh leaves and stems of *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* according to an ancient local tradition.

The term “thistle” refers to plants belonging to the tribe Cardueae Cass. = Cynareae Less. (Cassini, 1819) especially ascribed to the genera *Carduus*, *Cirsium*, *Onopordum*, *Cynara*, *Scolymus*, *Silybum*, *Onopordum*, and *Carlina*. In the Mediterranean area, the exploitation of thistle rennet, especially that obtained from *Cynara* spp., is particularly widespread in western Africa (Cardinali et al., 2016; García et al.,

2012), Italy, and the Iberian peninsula, the latter boasting a large number of Protected Designation of Origin (PDO) cheeses manufactured with this peculiar coagulant (Aquilanti et al., 2011; Cardinali et al., 2016). Cheeses coagulated with thistle rennet are generally manufactured at family-run or artisan dairy farms, most often located in marginal areas (e.g., high altitude pastures, dry lands or islands) using raw ewes' or goats' milk, or a mixture of both. Though these cheeses are greatly appreciated by consumers for their unique, distinctive flavor, their manufacturing is generally seasonal, mainly due to limitations on the availability of young leaves or flowers from spontaneously growing thistles.

*Caciofiore della Sibilla* cheese undoubtedly falls within this cheese category. The manufacturing technology of this cheese, which had been

\* Corresponding author.

E-mail address: [l.aquilanti@univpm.it](mailto:l.aquilanti@univpm.it) (L. Aquilanti).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.018>

Received 2 February 2017; Received in revised form 26 April 2017; Accepted 21 May 2017

Available online 22 May 2017

0168-1605/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

lost for > 50 years in the original area of production, has very recently been revived by two local family-run dairies located in Pieve Torina and Belforte del Chienti (Macerata district), respectively. The cheese produced by these local dairies from late spring to early summer is 3–4 cm tall, has an average weight of 0.2 to 0.8 kg and is characterized by a very thin straw-white outer rind and a cream-white soft core, with a sweetish buttery smell, a delicate but incisive flavor with a scent of wild herbs, and a slightly acidulous, pleasant taste.

To date, few studies have been conducted to identify the bacterial biota harboured by thistle-rennet cheeses (Aquilanti et al., 2011; Fernández-Salguero et al., 2002; Galán et al., 2012; Gómez et al., 2001; Ordiales et al., 2013; Roseiro et al., 2003; Sousa and Malcata, 1997; Tejada and Fernández-Salguero, 2003; Vioque et al., 2000) and almost all of these investigations have been focused on Protected Designation of Origin (PDO) or specialty cheeses manufactured with thistle coagulants obtained from *Cynara* spp.

Based on these premises, this study uses a polyphasic molecular approach based on culture and DNA-based techniques to assess the impact of an unexplored milk coagulant obtained from *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* on the bacterial dynamics and diversity of *Caciofiore della Sibilla* cheese. To this end, two cheese manufactures produced with the same batch of *Sopravissana* raw ewes' milk and coagulated with either thistle rennet or commercial powdered animal rennet were analyzed in parallel and the results comparatively evaluated.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cheese-making process and sampling

*Caciofiore della Sibilla* cheese was made in a family-run dairy farm located in Pieve Torina (Italy) following an ancient local manufacturing method without any addition of starter cultures.

The sole *Caciofiore della Sibilla* cheese manufacture produced by the dairy farm during spring and summer 2015 was sampled and analyzed. Raw milk obtained from *Sopravissana* ewes during one milking day was filtered and separated into two batches; three cheese wheels were produced from each batch. The first batch (labelled “C”) was coagulated with commercial powdered calf rennet (Caglifacio Clerici, Cadorago, CO, Italy; 1:10,000), whereas the second batch (labelled “Cf”) was coagulated with a crude aqueous extract prepared from *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*. The traditional preparation of the crude aqueous extract based on the use of fresh young leaves and stems - containing a considerable quantity of latex - of plants spontaneously growing in the high altitude pastures (> 1000 m a.s.l.) of Monti Sibillini National Park has previously been detailed by Cardinali et al. (2016). Milk coagulants were added to raw milk pre-heated at 35 °C and gently stirred. After clotting (ca. 30'), the curds were manually broken into rice-sized grains, transferred into plastic perforated molds (8 × 8 cm) and manually pressed to remove the whey. Molded cheeses were held at 12–13 °C for 4 h, dry salted and ripened for 20 days under controlled conditions (12–13 °C and 70% relative humidity).

Ewes' raw milk, fresh young leaves and stems of *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*, thistle rennet, curds and cheeses (after 1, 3, 6, 10 and 20 days of ripening) were collected in triplicate. Samples were transported to the laboratory under controlled temperature (4 °C) and processed within 24 h. Triplicate samples were pooled before viable counting and molecular analysis.

### 2.2. pH measurements

The pH of samples collected during cheese-making was measured using the pH meter 300 (Hanna Instruments, Padova, Italy), equipped with a solid electrode (HI2031, Hanna Instruments). Three independent measurements were performed for each sample, and the mean values ± standard deviations were calculated.

### 2.3. Microbial counts and bulk formation

For the microbial counts, 10 g of each solid sample were accurately homogenized in 90 mL of sterile aqueous citrate (2% w / v) for 2 min at 260 rpm using a Stomacher apparatus (400 Circulator, VWR International PBI, Milan, Italy) (Osimani et al., 2009). Aliquots of decimal dilutions of raw milk, thistle rennet and the homogenates were inoculated in duplicate on opportune solid media to determine the load of (i) presumptive lactococci, thermophilic cocci and lactobacilli; (ii) coagulase-negative cocci; (iii) total mesophilic aerobes; (iv) enterococci; (v) and finally *Enterobacteriaceae* (Garofalo et al., 2017). Viable counts were expressed as log colony forming units (log cfu) per gram or mL of sample ± standard deviations. For all samples but cheeses, to evaluate the profile of the cultivable bacterial community, bulk cells were prepared by harvesting confluent colonies from both the lowest MRSA and M17 dilution plates and the countable plates with a number of colonies ranging from 30 to 300 (Garofalo et al., 2015). For cheeses, the sole colonies grown on the countable plates were harvested. Harvested cells were suspended in 2 mL of sterile saline solution added with glycerol, and stored at – 20 °C prior to DNA extraction (Garofalo et al., 2015).

### 2.4. DNA extraction from cheese samples and bulks

For raw milk, thistle rennet, curd and cheese homogenates, total microbial DNA was extracted using a commercial kit (PowerFood™ Microbial DNA Isolation Kit, Mo Bio Laboratories, Carlsbad, USA), as previously elucidated (Cardinali et al., 2016). For bulk cells, DNA extraction was performed using the method proposed by Hynes et al. (1992) with some modifications as reported by Osimani et al. (2015). Assessment of quantity and purity of DNA extract was carried out as described by Osimani et al. (2016).

### 2.5. PCR amplification and DGGE analysis

The universal primers 338F (5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGC AG-3'), added with the GC clamp at the 5' end (Ampe et al., 1999), and 518R (5'-ATTACC GCG GCT GCT GG-3') were used to amplify the V3 region of the 16S rRNA gene (Alessandria et al., 2010).

Approximately 100 ng of bacterial DNA were amplified as previously reported by Osimani et al. (2015) using the thermal cycler MyCycler (Bio-Rad Laboratories, Segrate, Italy). DGGE runs were performed as reported by the same authors. Sequencing of DNA eluted from selected DGGE bands was performed in accordance to Taccari et al. (2016). Sequences were compared with those deposited in the GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). A sequence identity ≥ 97% was chosen as a threshold for unambiguous assignment into species.

### 2.6. DNA amplification and Illumina sequencing

The extracted DNA was used to study the bacterial diversity of the samples (raw milk, thistle rennet, curds and cheeses) by 16S rRNA amplicon Illumina sequencing. A 464-nucleotide sequence of the V3-V4 region of the 16S rRNA gene was analyzed as previously described by Alfonzo et al. (2017).

### 2.7. Illumina data analysis and sequence identification by QIIME

Sequences obtained from Illumina sequencing were processed using Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) software package version 1.9 (Caporaso et al., 2010) as previously detailed by Alfonzo et al. (2017). The data generated by Illumina sequencing were deposited in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) and are available under Ac. No. PRJNA340351.

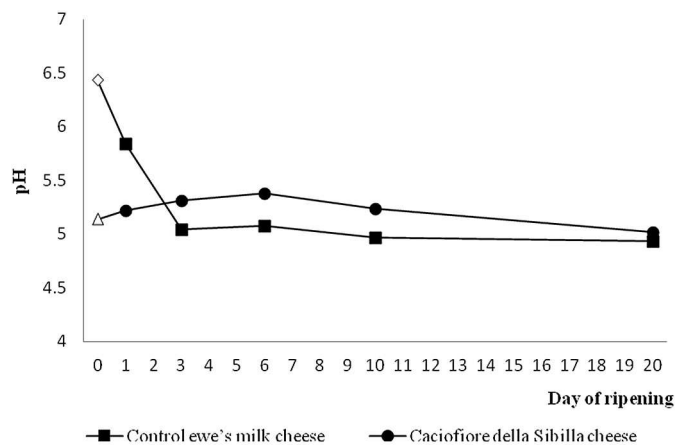


Fig. 1. Results of pH measurements of curd obtained from milk coagulation with commercial rennet, curd obtained from milk coagulation with thistle rennet, *Caciofiore della Sibilla* and control ewes' milk cheese during cheese-making and ripening.

\* pH values of curd obtained from milk coagulation with commercial rennet (◇) and from milk coagulation with thistle rennet (Δ).

## 2.8. Statistical analysis

For each cheese batch, viable counts recorded after 1, 3, 6, 10 and 20 days of maturation were analyzed by an ANOVA and a Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ) for means separation. At each sampling time, data from the two batches "C" and Cf" were compared using the Student's *t*-test ( $\alpha = 0.05$ ). A principal component analysis (PCA) with a correlation matrix was carried out on standardized data to visually identify bacterial dynamics over time. All the statistical analyses were performed using JMP statistical software v. 11.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

## 3. Results

### 3.1. pH measurement and viable counting

Raw ewes' milk and thistle rennet were characterized by pH mean values of  $6.39 \pm 0.10$  and  $3.79 \pm 0.05$ , respectively; the results of pH measurements carried out in curds and cheeses sampled at different time points are reported in Fig. 1. As revealed by ANOVA, curds and cheeses coagulated with thistle and animal rennet significantly differed in their pH values up until the 10<sup>th</sup> day of ripening, whereas after 20 days of maturation, both cheeses reached similar pH values.

The results of viable counting are shown in Table 1. The phyllosphere of *C. acanthifolia* All. was characterized by high levels of total mesophilic aerobes, lactococci, *Enterobacteriaceae* and coagulase-negative cocci and, conversely, by low levels of presumptive thermophilic cocci, enterococci and lactobacilli. Low bacterial loads were seen in thistle rennet.

No significant differences were observed between raw ewes' milk and curds in the viable counts of presumptive lactobacilli, total mesophilic aerobes and enterococci, whereas significant differences were observed in the loads of presumptive lactococci, thermophilic cocci and coagulase-negative cocci.

Viable counts of lactobacilli, total mesophilic aerobes, enterococci and *Enterobacteriaceae* increased progressively during the ripening of *Caciofiore della Sibilla* cheese; moreover, at the end of the maturation period (20 days), the two cheeses differed significantly in the load of all the bacterial groups assayed, except for lactobacilli and *Enterobacteriaceae*.

When PCA was computed, the first component accounted for 85.7% of total variability whereas the second component accounted for an additional 5.3% (Fig. 2). As clearly evidenced by the plot, the *Caciofiore della Sibilla* cheese had a greater range of variation in the bacterial loads

than the control cheese, especially up until the 3<sup>rd</sup> day of maturation.

### 3.2. PCR-DGGE analyses

The DGGE profiles obtained by analyzing the DNA extracted from both the samples and the bulk cells harvested from selected dilution plates are shown in Fig. S1 and S2, whereas the results of multiple alignments of DNA sequences from selected DGGE bands are shown in Table S1. These results are summarized in Tables 2 and 3. In the phyllosphere of *C. acanthifolia* All., the closest relatives to *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas alcaliphila*, *Acinetobacter baumannii*, the *Lact. alimentarius/paralimentarius* group, the *Lactobacillus graminis/curvatus* group, *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., and *Bacillus* spp. were found. Members of the latter genus were also detected in thistle rennet, along with members of the *Lact. plantarum/paraplantarum/pentosus* group.

In raw ewes' milk, the following taxa were detected: *Acinetobacter johnsonii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Pseudomonas* spp. and *Lactococcus lactis*. The latter species was detected at both the lowest and highest dilution.

Completely different bacterial compositions were seen in the two curds: curd obtained with commercial animal rennet was dominated by *Enterobacteriaceae*, while curd obtained from thistle rennet was dominated by lactic acid bacteria. In general, the bacterial diversity of cheeses during ripening was higher than that of raw milk, thistle rennet and curds. Furthermore, if the two cheeses were comparatively evaluated, a few taxa, such as *E. faecium*, *Lact. brevis*, *Leuc. mesenteroides*, *Lact. delbrueckii* and *Weissella* spp., were exclusively found in *Caciofiore della Sibilla* cheese, whereas other taxa, such as *Bifidobacterium dentium*, *Citrobacter* spp., *E. hormaechei*, *Erwinia chrysanthemi* and the *Lact. alimentarius/paralimentarius* group, were found only in the control cheese. By contrast, the following bacteria were identified in both cheeses, namely, *Enterococcus faecalis*, *L. lactis*, the *Lactobacillus casei/paracasei/rhamnosus* group, the *Lact. plantarum/paraplantarum/pentosus* group and *Staphylococcus sciuri*. With the exception of *Bacillus subtilis*, *A. johnsonii* and *P. alcaliphila*, all of the remaining taxa were detected in the highest dilution plates, thereby suggesting a load of at least  $10^5$ – $10^8$  cfu/g.

### 3.3. Illumina sequencing

The DNA extracted from ewes' raw milk, curds and cheeses was successfully amplified in the bacterial V3-V4 16S rRNA gene region. After splitting and quality trimming of raw data, 62,772 reads remained for subsequent analysis. After alignment, Operational Taxonomic Units (OTUs) were clustered at a 3% distance and the doubles and singletons (OTUs counting only two or one reads, respectively) were discarded by a filter script implemented in QIIME. Chao1 estimator predicted an average of 688 and  $231 \pm 43$  OTUs in milk and cheese samples, respectively, and the average observed counts were 661 and  $176 \pm 40$  OTUs, respectively, suggesting that we were able to capture approximately 96% and 76% of the OTUs estimated as present in the milk and cheese bacterial populations, respectively.

In most samples, a number of OTUs belonged to chloroplasts. These OTUs were not very abundant in raw milk, curd produced with animal rennet, and *Caciofiore della Sibilla* cheese at 3 and 20 days of ripening, accounting for < 1.2% of total reads number, with the exception of *Caciofiore della Sibilla* cheese at 3 days of ripening, where they constituted 10.6% of the total reads number. Conversely, chloroplast OTUs constituted the majority of the reads number in curd obtained with thistle rennet and *Caciofiore della Sibilla* cheese collected after 1 day of ripening, accounting for 81.9% and 78.5% of the total reads number, respectively. The relative abundance (%) of the different bacterial groups identified in raw milk, curds and cheeses are reported in Fig. 3. Only the groups with an incidence of 0.1% were considered. The majority of milk OTUs belonged to three different groups: *Lactobacillales*, *Enterobacteriaceae* and *Clostridiales*, which together

**Table 1**Results of viable counting of bacteria (log cfu per gram or mL) in *Caciofiore della Sibilla* and control ewes' milk cheese.

| Sample                           | <i>Caciofiore della Sibilla</i> cheese<br>Lactococci (M17 22 °C) | Control cheese           |           | <i>Caciofiore della Sibilla</i> cheese<br>Thermophilic cocci (M17 45 °C) | Control cheese            |         | <i>Caciofiore della Sibilla</i> cheese<br>Lactobacilli (MRSA) | Control cheese            |          |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------------|---------|---------------------------------------------------------------|---------------------------|----------|
| Raw milk                         | 5.00 ± 0.06                                                      |                          |           | 4.08 ± 0.06                                                              |                           |         | 4.78 ± 0.02                                                   |                           |          |
| <i>Carlina acanthifolia</i> All. | 6.68 ± 0.03                                                      |                          |           | 4.88 ± 0.04                                                              |                           |         | 3.54 ± 0.10                                                   |                           |          |
| Thistle rennet                   | 3.13 ± 0.14                                                      |                          |           | 2.10 ± 0.28                                                              |                           |         | 4.01 ± 0.00                                                   |                           |          |
| Curd                             | 4.11 ± 0.00                                                      | 4.82 ± 0.12              |           | 4.67 ± 0.00                                                              | 4.28 ± 0.02               |         | 4.90 ± 0.06                                                   | 4.74 ± 0.11               |          |
| 1 day of ripening                | 5.56 ± 0.02 <sup>d</sup>                                         | 8.57 ± 0.01 <sup>c</sup> | < 0.0001* | 4.68 ± 0.00 <sup>c</sup>                                                 | 7.50 ± 0.06 <sup>b</sup>  | 0.0002* | 5.06 ± 0.05 <sup>d</sup>                                      | 8.57 ± 0.00 <sup>b</sup>  | 0.0001   |
| 3 days of ripening               | 7.30 ± 0.00 <sup>c</sup>                                         | 7.98 ± 0.04 <sup>d</sup> | 0.0016*   | 6.32 ± 0.01 <sup>d</sup>                                                 | 7.37 ± 0.08 <sup>bc</sup> | 0.0028* | 8.08 ± 0.00 <sup>c</sup>                                      | 8.89 ± 0.01 <sup>ab</sup> | < 0.0001 |
| 6 days of ripening               | 8.62 ± 0.13 <sup>b</sup>                                         | 9.00 ± 0.14 <sup>b</sup> | 0.1098    | 8.26 ± 0.00 <sup>b</sup>                                                 | 8.18 ± 0.08 <sup>a</sup>  | 0.3251  | 8.66 ± 0.09 <sup>b</sup>                                      | 9.03 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.0312*  |
| 10 days of ripening              | 9.12 ± 0.18 <sup>a</sup>                                         | 9.14 ± 0.06 <sup>b</sup> | 0.9113    | 8.31 ± 0.00 <sup>a</sup>                                                 | 8.00 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 0.0012* | 8.68 ± 0.01 <sup>b</sup>                                      | 8.96 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.0009*  |
| 20 days of ripening              | 8.90 ± 0.05 <sup>ab</sup>                                        | 9.52 ± 0.06 <sup>a</sup> | 0.0079*   | 7.42 ± 0.03 <sup>c</sup>                                                 | 7.24 ± 0.05 <sup>c</sup>  | 0.0450* | 9.05 ± 0.03 <sup>a</sup>                                      | 8.87 ± 0.22 <sup>ab</sup> | 0.3557   |

| Sample                           | <i>Caciofiore della Sibilla</i> cheese<br>Coagulase-negative cocci (MSA) | Control cheese           |         | <i>Caciofiore della Sibilla</i> cheese<br>Total mesophilic aerobes (PCA) | Control cheese           |           | <i>Caciofiore della Sibilla</i> cheese<br>Enterococci (Slanetz-Bartley Agar) | Control cheese           |         | <i>Caciofiore della Sibilla</i> cheese<br>Enterobacteriaceae (VRBGA) | Control cheese           |           |
|----------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------|-----------|
| Raw milk                         | 4.01 ± 0.03                                                              |                          |         | 5.14 ± 0.16                                                              |                          |           | 4.30 ± 0.06                                                                  |                          |         | 3.93 ± 0.06                                                          |                          |           |
| <i>Carlina acanthifolia</i> All. | 5.24 ± 0.01                                                              |                          |         | 7.27 ± 0.04                                                              |                          |           | 3.97 ± 0.16                                                                  |                          |         | 5.34 ± 0.03                                                          |                          |           |
| Thistle rennet                   | 3.06 ± 0.03                                                              |                          |         | 4.07 ± 0.04                                                              |                          |           | 3.60 ± 0.01                                                                  |                          |         | 1.00 ± 0.00                                                          |                          |           |
| Curd                             | 5.06 ± 0.08                                                              | 4.52 ± 0.04              |         | 4.99 ± 0.01                                                              | 5.13 ± 0.07              |           | 4.37 ± 0.01                                                                  | 4.23 ± 0.05              |         | 1.10 ± 0.00                                                          | 3.39 ± 0.16              |           |
| 1 day of ripening                | 5.16 ± 0.02 <sup>d</sup>                                                 | 6.75 ± 0.10 <sup>c</sup> | 0.0022* | 5.37 ± 0.02 <sup>c</sup>                                                 | 8.45 ± 0.03 <sup>a</sup> | < 0.0001* | 4.60 ± 0.05 <sup>c</sup>                                                     | 6.09 ± 0.05 <sup>c</sup> | 0.0011* | 1.74 ± 0.06 <sup>c</sup>                                             | 7.55 ± 0.05 <sup>a</sup> | < 0.0001* |
| 3 days of ripening               | 6.34 ± 0.02 <sup>c</sup>                                                 | 7.97 ± 0.04 <sup>d</sup> | 0.0003* | 8.15 ± 0.08 <sup>d</sup>                                                 | 8.87 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.0056*   | 5.14 ± 0.08 <sup>d</sup>                                                     | 7.12 ± 0.02 <sup>c</sup> | 0.0099* | 2.19 ± 0.02 <sup>d</sup>                                             | 7.30 ± 0.01 <sup>b</sup> | < 0.0001* |
| 6 days of ripening               | 7.47 ± 0.04 <sup>b</sup>                                                 | 8.91 ± 0.19 <sup>a</sup> | 0.0086* | 8.58 ± 0.00 <sup>c</sup>                                                 | 8.71 ± 0.73 <sup>a</sup> | 0.8181    | 7.78 ± 0.00 <sup>c</sup>                                                     | 7.55 ± 0.01 <sup>b</sup> | 0.0007* | 5.41 ± 0.02 <sup>c</sup>                                             | 7.13 ± 0.07 <sup>b</sup> | 0.0009*   |
| 10 days of ripening              | 8.72 ± 0.02 <sup>a</sup>                                                 | 8.40 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.0059* | 8.82 ± 0.01 <sup>b</sup>                                                 | 9.10 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.0073*   | 8.26 ± 0.01 <sup>b</sup>                                                     | 7.90 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.0004* | 6.17 ± 0.05 <sup>b</sup>                                             | 7.07 ± 0.09 <sup>b</sup> | 0.0073*   |
| 20 days of ripening              | 7.44 ± 0.01 <sup>b</sup>                                                 | 7.34 ± 0.01 <sup>d</sup> | 0.0074* | 9.20 ± 0.02 <sup>a</sup>                                                 | 8.87 ± 0.00 <sup>a</sup> | 0.0017*   | 8.51 ± 0.07 <sup>a</sup>                                                     | 6.94 ± 0.04 <sup>d</sup> | 0.0012* | 6.40 ± 0.00 <sup>a</sup>                                             | 6.32 ± 0.03 <sup>c</sup> | 0.0597    |

cfu colony forming units.

Viable counts of lactococci, thermophilic cocci, lactobacilli, coagulase-negative cocci, total mesophilic aerobes, enterococci and *Enterobacteriaceae* expressed as mean values ± st. dev. of samples collected during ripening of *Caciofiore della Sibilla* and control ewes' milk cheese. Mean separation test throughout ripening: different letters on the same column indicate significant differences over time according to Tukey's test ( $\alpha = 0.05$ ). Least significant difference (LSD) is reported.

\* Occurrence of significant differences due to cheese batch (C or Cf) according to Student's *t*-test ( $\alpha = 0.05$ ).

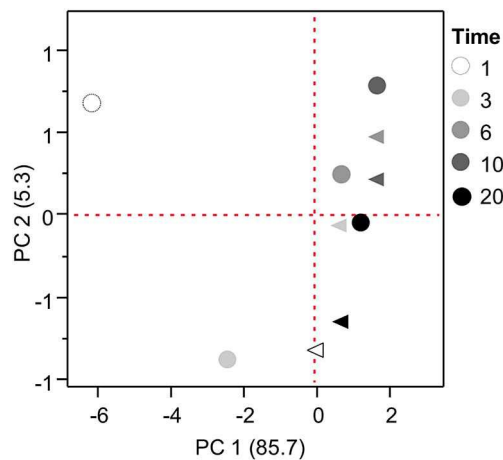


Fig. 2. Loading and score plot of principal components analysis (PCA) based on viable counts evolution over time of *Caciopfiore della Sibilla* (dots) and control ewes' milk cheese (triangles).

accounted for 60% of the total number of bacterial OTUs in raw milk. Various minority taxa were also identified, including *Staphylococcus*, *Planococcaceae* and *Bacteroidales*.

As the bacterial dynamics were comparatively evaluated along with the two cheese-making processes, the following evidence emerged. In curd obtained with commercial animal rennet, *Planococcaceae* and *Enterobacteriaceae* prevailed, followed by *Lactobacillales*, *Staphylococcus* and *Macroccoccus*. *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillales* and *Staphylococcus* were also found in curd obtained with thistle rennet. At the end of the maturation period, both cheeses were dominated by *Lactobacillales*, which accounted for approximately 65% of the total number of bacterial OTUs; however, different minority taxa were found, namely, *Enterobacteriaceae* in control ewes' milk cheese, and both *Macroccoccus* and *Acidobacteria* in *Caciopfiore della Sibilla* cheese.

In Fig. 4, a finer taxonomic composition within the order *Lactobacillales* is shown. In raw ewes' milk, OTUs corresponding to *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc* and *Weissella* were found, though for the latter two taxa, a relative abundance lower than 0.1% was seen. In curd and cheese obtained with thistle rennet, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* co-dominated, whereas *Lactococcus* prevailed in curd and cheese produced with commercial animal rennet, followed by *Lactobacillus*. The two cheese manufactures also differed in the composition of minority taxa, with *Leuconostoc* and *Pediococcus* occurring at low levels in both the control and *Caciopfiore della Sibilla* cheese, respectively.

#### 4. Discussion

To the best of the authors' knowledge, this report is the first to describe the contribution of thistle rennet obtained from *C. acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia* to cheese bacterial composition and dynamics. Moreover, no previous investigations have been conducted on *Caciopfiore della Sibilla* cheese, a Mediterranean soft ewes' raw milk cheese manufactured according to a revived local ancient technology.

As far as raw *Sopravissana* ewes' milk was analyzed, viable counts of presumptive lactobacilli, lactococci, thermophilic cocci, total mesophilic aerobes, *Enterobacteriaceae* and coagulase-negative cocci were within the range reported by other authors for raw ewes' milk (Quigley et al., 2013; Pangallo et al., 2014).

Regarding thistle rennet, viable counts of total mesophilic aerobes and presumptive lactobacilli were comparable to those found by other authors (Aquilanti et al., 2011; Barbosa et al., 1981) in thistle rennets obtained from *Cynara* spp. dried flowers; by contrast, slightly lower counts of presumptive lactococci and thermophilic cocci were found compared to those reported by the same authors (Aquilanti et al., 2011;

Barbosa et al., 1981).

At the end of ripening (20 days) *Caciopfiore della Sibilla* cheese showed viable counts of total mesophilic aerobes and presumptive lactobacilli comparable with those reported by Aquilanti et al. (2013) in a raw cow's milk *Caciotta* cheese manufactured with an aqueous extract of *C. cardunculus*, whereas the counts of coagulase-negative cocci and *Enterobacteriaceae* were higher. High counts of *Enterobacteriaceae* in cheeses at the end of their ripening might suggest a lack of hygiene during milking and cheese-making. However, the metabolic activity of members of this bacterial family has been positively correlated to high proteolysis and lipolysis in artisanal cheeses, resulting in the production of volatile aroma compounds (Tabla et al., 2016).

OTUs obtained by Illumina sequencing are derived from clustering 16S rRNA gene rDNA sequences. Each of these clusters is intended to represent a taxonomic unit of bacterial species or genus depending on the sequence similarity threshold, thus providing relative but not absolute abundances of single microbial taxa. PCR-DGGE method is capable of separating unrelated DNAs based on the differences in their sequences and GC contents allowing a qualitative or, at most semi-quantitative, overview of heterogeneous microbial communities.

When DNA-based techniques were applied to the profiling of the bacterial biota, numerous taxa were identified, including the starter lactic acid bacteria (LAB) species *L. lactis*, which is known to lower the pH and control fermentation rapidly, and a wide variety of adventitious microorganisms, such as environmental, spoilage and non-starter lactic acid bacteria (NSLAB), which gain access to the cheese at any stage of the manufacturing process. NSLAB are mainly responsible for key physico-chemical transformations, e.g., proteolysis and lipolysis, which greatly impact basic cheese characteristics, such as flavor, appearance and texture (Gobbetti et al., 2015). Illumina sequencing allowed both the majority and minority taxa to be identified, whereas single bacterial species were unambiguously recognized by PCR-DGGE. When the latter technique was applied, discrepancies were seen in the fingerprints obtained by the bulk and the direct approach, in terms of both the number of taxa identified and their relative abundance; this finding was in agreement with a recent finding by the same authors on semi-hard cheese models (Aquilanti et al., 2016).

In *Sopravissana* raw ewes' milk, PCR-DGGE allowed the sole species *L. lactis* to be identified among LAB. Illumina sequencing confirmed the occurrence of *Lactococcus* spp. in raw ewes' milk, though as a minority taxon with respect to the members of the genus *Lactobacillus*. The presence of both lactococci and lactobacilli in raw ewes' milk has previously been documented, as reviewed by Aquilanti et al. (2007), Quigley et al. (2013) and Pangallo et al. (2014). The presence of *L. lactis* was also evidenced in two previous studies (Aquilanti et al., 2011, 2013) carried out onto raw cow's milk *Caciotta* cheeses manufactured with aqueous extract of *C. cardunculus* dried flowers. The occurrence of additional genera, including *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* and *Enterococcus*, has previously been found in raw ewes' milk by next-generation sequencing (Quigley et al., 2013).

In both the phyllosphere of *C. acanthifolia* All. and thistle rennet, culture-dependent PCR-DGGE identified various LAB and NSLAB species, as well as both spoilage and environmental microorganisms. To date, there is a paucity of data on the bacterial biota colonizing the aerial surfaces of thistles and thistle rennets. In 1968, Mundt and Hammer (1968) first enumerated and identified lactobacilli on plant surfaces; in such a pioneering systematic study, *Lact. plantarum*, *Lactobacillus fermenti* and *Lact. brevis* were the species most frequently isolated, whereas *Lact. casei*, *Lactobacillus viridescens*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus salivarius*, and *Lactobacillus buchneri* occurred at lower frequencies. A widespread but sporadic distribution of low counts of lactobacilli in the phyllosphere of higher plants was also highlighted by the same authors. In accordance with data collected in the present study, Widnyana and Javandira (2016) recently reported the presence of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. on plant surfaces, where these microorganisms exert a plant-growth stimulating activity

**Table 2**  
Bacterial species identified by PCR-DGGE analysis in raw ewe's milk, *Carlina acanthifolia* All. subsp. *acanthifolia*, thistle rennet, curd obtained from milk coagulation with thistle rennet and curd obtained from milk coagulation with commercial rennet.

| Bacterial species                                            | Raw ewes' milk |   |   |           |   |   | Carlina acanthifolia All. |   |   |   |     |   | Thistle rennet |           |   |   |           |   | Curd obtained from milk coagulation with thistle rennet |   |     |   |   |           | Curd obtained from milk coagulation with commercial rennet |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
|--------------------------------------------------------------|----------------|---|---|-----------|---|---|---------------------------|---|---|---|-----|---|----------------|-----------|---|---|-----------|---|---------------------------------------------------------|---|-----|---|---|-----------|------------------------------------------------------------|---|-----------|---|---|---|-----|---|---|-----------|--|--|-----------|--|--|---|
|                                                              | MRS            |   |   | M17 22 °C |   |   | M17 45 °C                 |   |   | M | MRS |   |                | M17 22 °C |   |   | M17 45 °C |   |                                                         | M | MRS |   |   | M17 22 °C |                                                            |   | M17 45 °C |   |   | M | MRS |   |   | M17 22 °C |  |  | M17 45 °C |  |  | M |
|                                                              |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
|                                                              | H              | L | H | L         | H | L | H                         | L | H | L | H   | L | H              | L         | H | L | H         | L | H                                                       | L | H   | L | H | L         | H                                                          | L | H         | L | H | L | H   | L | H | L         |  |  |           |  |  |   |
| Acinetobacter baumannii                                      |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Acinetobacter johnsonii                                      |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Bacillus cereus                                              |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Bacillus sp.                                                 |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Bacillus subtilis                                            |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Enterobacter cloacae                                         |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Enterobacter hormaechei                                      |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Enterobacter sp.                                             |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Escherichia coli                                             |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Kurthia gibsonii                                             |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Lactobacillus                                                |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| alimentarius/<br>paralimentarius<br>group                    |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Lactobacillus graminis/<br>curvatus group                    |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Lactobacillus plantarum/<br>paraplantarum/<br>pentosus group |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Lactococcus lactis                                           |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Pantoea agglomerans                                          |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Pediococcus acidilactici                                     |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Pseudomonas alcaliphila                                      |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Pseudomonas sp.                                              |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |
| Staphylococcus<br>chromogenes                                |                |   |   |           |   |   |                           |   |   |   |     |   |                |           |   |   |           |   |                                                         |   |     |   |   |           |                                                            |   |           |   |   |   |     |   |   |           |  |  |           |  |  |   |

• DGGE bands resulting from the analysis of the DNA extracted from the bulk of colonies harvested from high (H) and low (L) dilution agar plates used for viable counting from selected plates or the DNA extracted directly from samples showing  $\geq 97\%$  of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in the GenBank. M indicate the DNA extracted directly from a cheese samples matrix.

**Table 3**Bacterial species identified during the manufacture and ripening of control ewe's milk cheeses and *Caciofiore della Sibilla* by PCR-DGGE analysis.

| Bacterial species                                                          | t <sub>1</sub> |              |              |   | t <sub>3</sub> |              |              |   | t <sub>6</sub> |              |              |   | t <sub>10</sub> |              |              |   | t <sub>20</sub> |              |              |   |
|----------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------|--------------|---|----------------|--------------|--------------|---|----------------|--------------|--------------|---|-----------------|--------------|--------------|---|-----------------|--------------|--------------|---|
|                                                                            | MRS            | M17<br>22 °C | M17<br>45 °C | M | MRS            | M17<br>22 °C | M17<br>45 °C | M | MRS            | M17<br>22 °C | M17<br>45 °C | M | MRS             | M17<br>22 °C | M17<br>45 °C | M | MRS             | M17<br>22 °C | M17<br>45 °C | M |
| <i>Bifidobacterium dentium</i>                                             |                |              |              | ■ |                |              |              | ■ |                |              |              | ■ |                 |              |              | ■ |                 |              |              | ■ |
| <i>Citrobacter</i> sp.                                                     |                |              |              |   |                |              | ■            |   |                |              | ■            |   |                 |              | ■            |   |                 |              | ■            |   |
| <i>Enterobacter hormaechei</i>                                             |                |              |              | ■ |                |              |              | ■ |                |              |              |   |                 |              |              |   |                 |              |              |   |
| <i>Enterobacter</i> sp.                                                    |                |              | ■            |   |                |              | ■            |   |                |              |              |   |                 |              |              |   |                 |              |              |   |
| <i>Enterococcus faecalis</i>                                               | •              |              | ■            |   |                |              |              |   | ■              | ■            | ■            |   | ■               | ■            | ■            |   |                 |              | ■            |   |
| <i>Enterococcus faecium</i>                                                | •              | •            | •            |   |                |              | •            |   |                | •            | •            |   | •               | •            | •            |   | •               | •            | •            | • |
| <i>Erwinia chrysanthemi</i>                                                |                |              |              | □ |                |              |              | □ |                |              |              | □ |                 |              |              | □ |                 |              |              | □ |
| <i>Lactobacillus alimentarius</i> /<br><i>paralimentarius</i> group        |                |              |              | ■ |                |              |              | ■ |                |              |              |   | ■               |              |              | ■ |                 |              |              | ■ |
| <i>Lactobacillus brevis</i>                                                | •              |              |              |   | •              | •            |              |   |                |              |              |   |                 |              |              |   | •               |              |              |   |
| <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> /<br><i>rhamnosus</i> group           |                |              |              | • |                |              |              | • |                |              |              |   |                 |              |              | ■ |                 |              |              | • |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i>                                           | •              | •            | •            |   |                | •            |              |   | •              | •            |              |   | •               | •            |              |   |                 |              | •            |   |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> /<br><i>pentosus/paraplantarum</i><br>group |                |              |              |   |                |              |              |   |                |              |              |   |                 |              |              |   | ■               | •            |              |   |
| <i>Lactococcus lactis</i>                                                  | ■              | ■            | ■            | ■ | ■              | ■            | ■            | ■ | ■              | ■            | ■            | ■ | ■               | ■            | ■            | ■ | ■               | ■            | ■            | ■ |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> /<br><i>pseudomesenteroides</i>           |                |              |              |   |                |              |              | • |                |              |              |   |                 |              |              |   | •               |              |              | • |
| <i>Staphylococcus sciuri</i>                                               |                | •            | ■            |   |                |              | ■            |   | ■              | ■            | ■            |   | ■               | ■            | ■            |   | ■               |              |              |   |
| <i>Weissella</i> sp.                                                       |                |              |              |   | •              |              |              |   |                |              |              |   |                 |              |              |   |                 |              |              |   |

• DGGE bands resulting from the analysis of the DNA extracted from the bulk of colonies harvested from selected plates or the DNA extracted directly from *Caciofiore della Sibilla* cheese samples showing  $\geq 97\%$  of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in the GenBank; ■ DGGE bands resulting from the analysis of the DNA extracted from the bulk of colonies harvested from selected plates or the DNA extracted directly from control ewe's milk cheese samples showing  $\geq 97\%$  of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in the GenBank; □ DGGE bands resulting from the analysis of the DNA extracted from the bulk of colonies harvested from selected plates or the DNA extracted directly from control ewe's milk cheese samples showing  $\leq 97\%$  of similarity with the sequences of the closest relatives found by a BLAST search in the GenBank; t1: cheese sampled after 1 day of maturation; t3: cheese sampled after 3 days of maturation; t6: cheese sampled after 6 days of maturation; t10: cheese sampled after 10 days of maturation; t20: cheese sampled after 20 days of maturation.

M: DNA extracted directly from a cheese samples matrix.

as well as an inhibitory activity towards plant pathogens.

Lactobacilli ascribed to the *Lact. alimentarius/paralimentarius* group and the *Lact. plantarum/paraplantarum/pentosus* found by PCR-DGGE in both the phyllosphere of *C. acanthifolia* All. and thistle rennet were also detected in curd obtained by milk coagulation with thistle rennet, thus strongly suggesting a role of the coagulating agent in the early bacterial dynamics of *Caciofiore della Sibilla* cheese. By contrast, the occurrence of *Pseudomonas acidilactici* in the sole curd obtained by milk coagulation with thistle rennet is more likely related to an environmental contamination, since this species was apparently absent in ewes' raw milk, thistle phyllosphere and thistle rennet.

A different picture emerged in curd obtained by milk coagulation with commercial animal rennet. In this case, LAB and NSLAB were found to be the minority by Illumina sequencing; among these microorganisms, *Lactococcus*, likely derived from raw ewes' milk, was predominant. PCR-DGGE confirmed the occurrence of *L. lactis* as the sole pro-technological species, along with various spoilage and pathogenic bacteria.

As far as the bacterial dynamics are considered, the stable presence of *L. lactis* in both the *Caciofiore della Sibilla* and control cheeses suggested by the results of PCR-DGGE might be, at least in part, ascribed to the contribution of raw ewes' milk, where lactococci and *L. lactis* have been revealed by Illumina sequencing and culture-dependent PCR-DGGE, respectively. It is worth noting that when this latter technique was applied, closest relatives to *L. lactis* were found in the bulk cells harvested from both the lowest and the highest dilution plates, thus suggesting a load of this species  $\geq 10^5$  ufc/mL. *L. lactis* has a wide ecological distribution and is mostly associated with the milk environment and dairy products (Cavanagh et al., 2015; Šaková et al., 2015; Sáděcká et al., 2016). As recently elucidated by Ruggirello et al. (2016), this species can persist in late ripening of cheese in both the viable and the viable but nonculturable (VNC) states, shifting its catabolism to peptide and amino acid consumption.

Besides *Lactococcus*, bacteria ascribed to *Leuconostoc* and *Lactobacillus* dominated during ripening of *Caciofiore della Sibilla* cheese; both genera have been detected from t1 to t20 by both Illumina sequencing and PCR-DGGE analysis.

The dominance of *Leuconostoc* during the maturation of *Caciofiore della Sibilla* cheese might be explained by the higher initial pH of the curd obtained with thistle rennet compared to that produced with commercial animal rennet. Indeed, as reported by Hemme and Foucaud-Scheunemann (2004), *Leuconostoc* can be affected by the acidification of the growth medium. Interestingly, *Leuconostoc* was indicated by Illumina sequencing as a minority bacterial taxon in control ewes' milk cheese; however, no closest relatives to this genus were identified by PCR-DGGE in this cheese manufacture in either of the two approaches, thus strongly emphasizing the usefulness of a combined analytical strategy. Moreover, since apparently neither raw ewes' milk nor thistle and thistle rennet harboured leuconostocs, as revealed by PCR-DGGE, the occurrence of these microorganisms in *Caciofiore della Sibilla* cheese might be tentatively ascribed to a contamination from the dairy environment. However, members of the genus *Leuconostoc* have previously been detected in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with thistle rennet from *C. cardunculus* dried flowers (Aquilanti et al., 2011), as well as in other cheeses produced with vegetable coagulants, such as *Serra da Estrela* PDO cheese and *La Serena* PDO cheese (Macedo et al., 2004). Based on these latter evidences, it might be also hypothesized that in thistle, thistle rennet and curd obtained with thistle rennet, leuconostocs occurred at levels below the limit of detection of the PCR-DGGE technique.

In addition, *Lact. delbrueckii*, *Lact. brevis*, and *E. faecium* were retrieved by PCR-DGGE exclusively in *Caciofiore della Sibilla* cheese throughout its maturation. Since these species could not be detected by PCR-DGGE before t1, again it might be hypothesized that they originate from the vegetable coagulant, where they occur at very low levels. *Lact. delbrueckii* includes a subspecies that can be positively affected by the

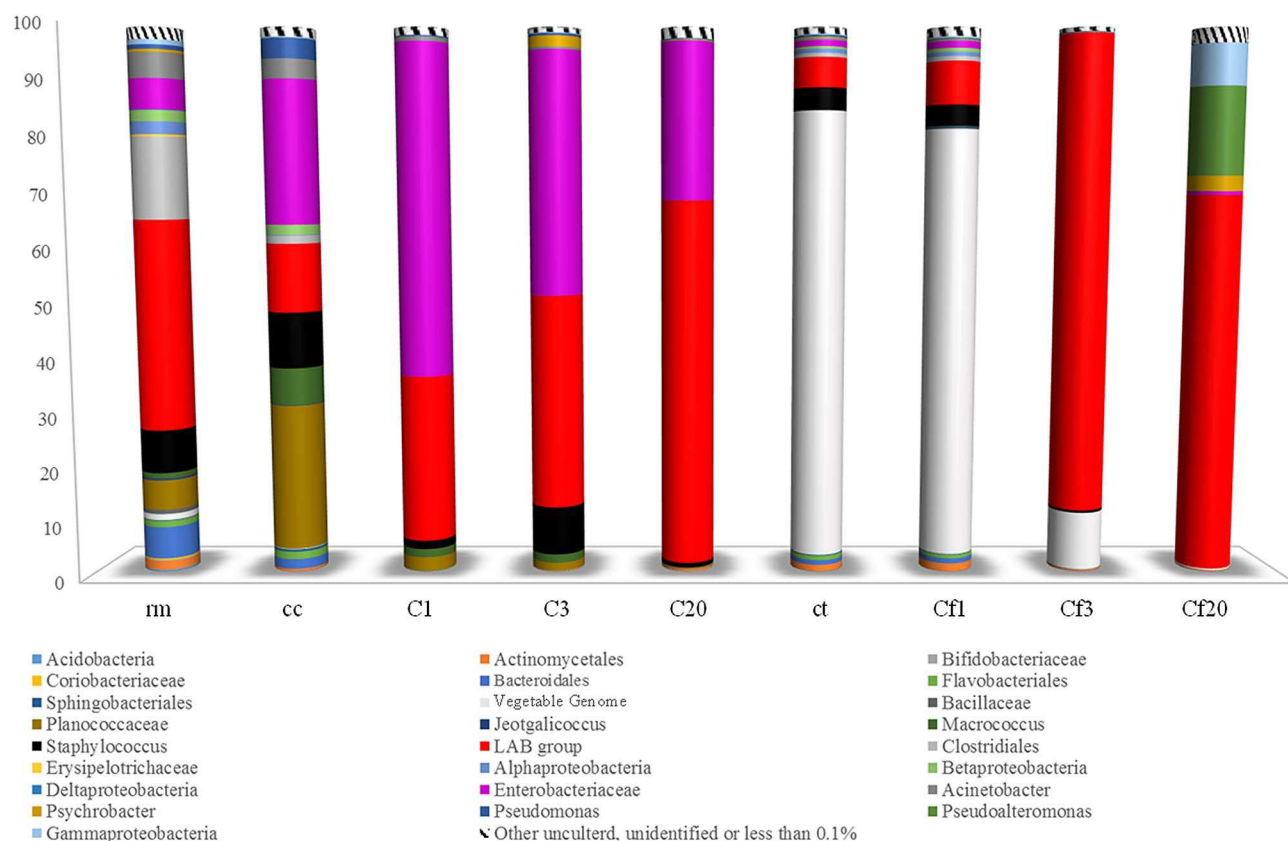


**Fig. 3.** Relative abundances (%) of bacterial groups and vegetable genome identified by MySeq Illumina in raw ewes' milk (rm); curd obtained by milk coagulation with commercial animal rennet (cc); curd obtained by milk coagulation with carline thistle rennet (ct); control raw ewe's milk cheese and *Caciofiore della Sibilla* cheese collected at 1, 3, and 20 days of ripening (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>20</sub> and Cf<sub>1</sub>, Cf<sub>3</sub>, Cf<sub>20</sub> respectively).

"Other" represents all genera that were uncultured, belonged to uncultured or whose abundance was less than 0.1 %.

addition of vegetable extracts to the dairy matrix (Joung et al., 2016); even *Lact. brevis* has been retrieved in vegetable-based matrices (Ruiz Rodríguez et al., 2016). Finally, enterococci are NSLAB that are naturally present in the gastrointestinal tract of humans and animals;

they can enter the dairy environment via cross-contaminations, where they play a crucial role during cheese ripening, due to their high adaptation to the cheese environment (e.g., high salt concentration and low pH) (Giraffa, 2003) and to acknowledged technological traits, such

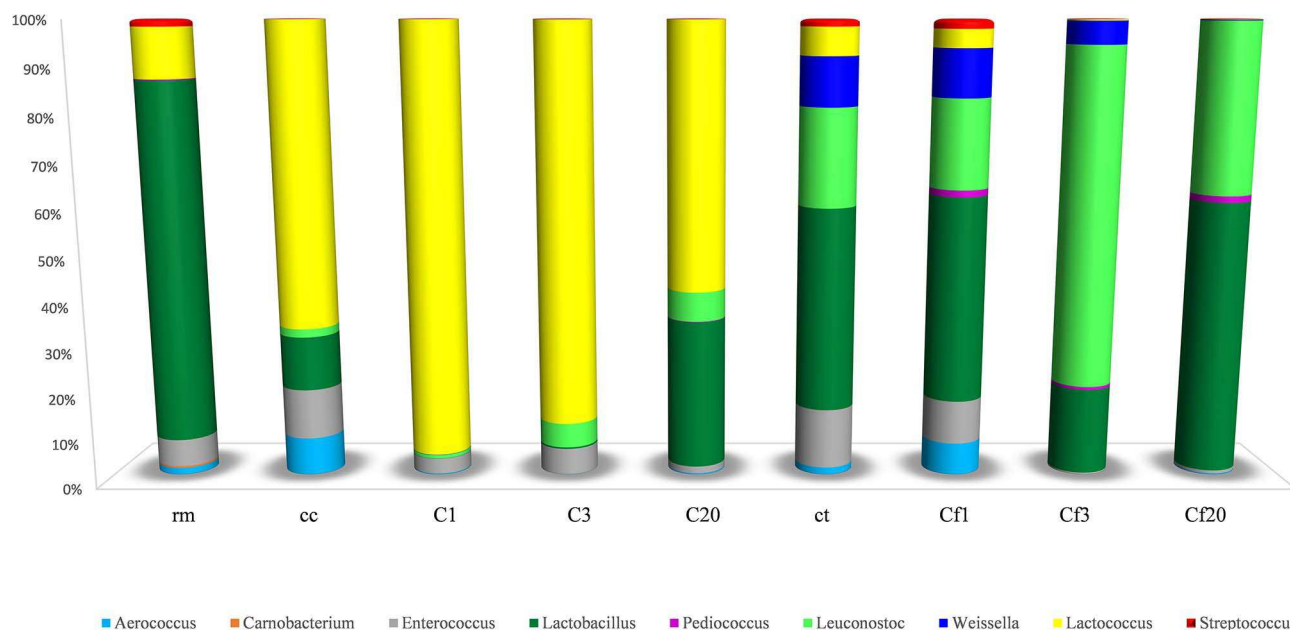


**Fig. 4.** Relative abundances (%) of the different LAB genera identified by MySeq Illumina in raw ewes' milk (rm); curd obtained by milk coagulation with commercial animal rennet (cc); curd obtained by milk coagulation with carline thistle rennet (ct); control raw ewe's milk cheese and *Caciofiore della Sibilla* cheese collected at 1, 3, and 20 days of ripening (C<sub>1</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>20</sub> and Cf<sub>1</sub>, Cf<sub>3</sub>, Cf<sub>20</sub> respectively).

Each percentage is related to the total amount of LAB found in each sample.

as the production of bacteriocins (İspirli et al., 2017).

Finally, members of two additional bacterial groups, namely, *Lact. casei/paracasei/rhannosus* and *Lact. plantarum/pentosus/paraplantarum*, were identified by PCR-DGGE in both cheese-manufactures; since these microorganisms could not be detected in either raw ewes' milk or thistle rennet, once again, a contamination from the dairy environment might be hypothesized.

An important piece of evidence addresses the presence of *Enterobacteriaceae*, with a higher occurrence of this microbial group in control ewes' milk cheese, as revealed by both DNA-based techniques. However, this finding was not supported by viable counts; indeed, at the end of the ripening period, comparable loads of *Enterobacteriaceae* were found in the two cheeses by culturing in selective VRBA medium, thus suggesting the need for an integration between culture-dependent and different culture-independent techniques.

## 5. Conclusions

Overall, the combined analytical approach enabled differences and similarities in the bacterial biota and dynamics of the two cheeses under study to be defined. The integration of data from viable counting, Illumina sequencing and PCR-DGGE provided the detection of major and minor bacterial components (Illumina sequencing and viable counting), as well as the identification of single bacterial species (PCR-DGGE) that could not be revealed with the first two techniques. The primary result confirmed the association of lactobacilli, lactococci and leuconostocs with cheese and the dairy environment; moreover, the vegetable coagulant was demonstrated to affect the early bacterial dynamics of *Caciopire della Sibilla* cheese, whose bacterial biota significantly differed from the control ewes' milk cheese, at the end of the maturation period.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.018>.

## Acknowledgments

The authors thank “Caseificio degli Angeli” (Pievotorina, MC, Italy) for supplying raw milk, curds and cheeses. This study was financially supported by the Regione Marche within the project: “EXPO2015 Iniziative - Strategie di internazionalizzazione delle PMI, nell'ambito del progetto Expo2015”.

## References

- Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., Pattono, D., Dalmasso, A., Civera, T., Coccolin, L., 2010. Microbiota of the Planalto de Bolona: an artisanal cheese produced in uncommon environmental conditions in the Cape Verde Islands. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 2211–2221.
- Alfonzo, A., Miceli, C., Nasca, A., Franciosi, E., Ventimiglia, G., Di Gerlando, R., Tuohy, K., Francesca, N., Moschetti, G., Settanni, L., 2017. Monitoring of wheat lactic acid bacteria from the field until the first step of dough fermentation. *Food Microbiol.* 62, 256–269.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5464–5473.
- Aquilanti, L., Zannini, E., Zocchetti, A., Osmani, A., Clementi, F., 2007. Polyphasic characterization of indigenous lactobacilli and lactococci from PDO Canestrato Pugliese cheese. *LWT Food Sci. Technol.* 40, 1146–1155.
- Aquilanti, L., Babini, V., Santarelli, S., Osmani, A., Petruzzelli, A., Clementi, F., 2011. Bacterial dynamics in a raw cow's milk Caciotta cheese manufactured with aqueous extract of *Cynara cardunculus* dried flowers. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 651–659.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Babini, V., Osmani, A., Clementi, F., 2013. Quality evaluation and discrimination of semi-hard and hard cheeses from the Marche region (Central Italy) using chemometric tools. *Int. Dairy J.* 29, 42–52.
- Aquilanti, L., Santarelli, S., Babini, V., Osmani, A., Garofalo, C., Polverigiani, S., Clementi, F., 2016. PCR-DGGE for the profiling of cheese bacterial communities: strengths and weaknesses of a poorly explored combined approach. *Dairy Sci. Technol.* 96, 747–761.
- Barbosa, M., Corradini, C., Battistoni, B., 1981. Cheesemaking experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from cardo (*Cynara cardunculus* L.). *Sci. Tecn. Latt. Cas.* 32, 203–221.
- Caporaso, J.G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F.D., Costello, E.K., Fierer, N., Peña, A.G., Goodrich, J.K., Gordon, J.I., Huttley, G.A., Kelley, S.T., Knights, D., Koenig, J.E., Ley, R.E., Lozupone, C.A., McDonald, D., Muegge, B.D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J.R., Turnbaugh, P.J., Walters, W.A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R., 2010. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
- Cardinali, F., Taccari, M., Milanović, V., Osmani, A., Polverigiani, S., Garofalo, C., Foligni, R., Mozzon, M., Zitti, S., Raffaelli, N., Clementi, F., Aquilanti, L., 2016. Yeast and mold dynamics in Caciopire della Sibilla cheese coagulated with an aqueous extract of *Carlina acanthifolia* All. *Yeast* 33, 403–414.
- Cassini, H., 1819. Suite du sixième mémoire sur la famille des synanthérées. *J. Phys. Chim. Hist. Nat. Arts* 88, 189–204.
- Cavanagh, D., Fitzgerald, G.F., McAuliffe, O., 2015. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiol.* 47, 45–61.
- Fernández-Salguero, J., Tejada, L., Gómez, R., 2002. Use of powdered vegetable coagulant in the manufacture of ewe's milk cheeses. *J. Sci. Food Agric.* 82, 464–468.
- Galán, E., Cabezas, L., Fernández-salguero, J., 2012. Proteolysis, microbiology and sensory properties of ewes' milk cheese produced with plant coagulant from cardoon *Cynara cardunculus*, calf rennet or a mixture thereof. *Int. Dairy J.* 25, 92–96.
- García, V., Rovira, S., Teruel, R., Bouteau, K., Rodríguez, J., Roa, I., López, M.B., 2012. Effect of vegetable coagulant, microbial coagulant and calf rennet on physicochemical, proteolysis, sensory and texture profiles of fresh goats cheese. *Dairy Sci. Technol.* 92, 691–707.
- Garofalo, C., Osmani, A., Milanović, V., Aquilanti, L., De Filippis, F., Stellato, G., Di Mauro, S., Turchetti, B., Buzzini, P., Ercolini, D., Clementi, F., 2015. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiol.* 49, 123–133.
- Garofalo, C., Bancalari, E., Milanović, V., Cardinali, F., Osmani, A., Savo Sardaro, M.L., Bottari, B., Bernini, V., Aquilanti, L., Clementi, F., Neviani, E., Gatti, M., 2017. Study of the bacterial diversity of foods: PCR-DGGE versus LH-PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 242, 24–36.
- Giraffa, G., 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88, 215–222.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Mancini, L., Fox, P.F., 2015. Pros and cons for using non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) as secondary/adjunct starters for cheese ripening. *Trends Food Sci. Technol.* 45, 167–178.
- Gómez, R., Sánchez, E., Vioque, M., Ferreira, J., Tejada, L., Fernández-Salguero, J., 2001. Microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured using aqueous extracts of flowers from various species of cardoon *Cynara* L. *Milchwissenschaft* 56, 16–19.
- Hemme, D., Foucaud-Scheunemann, C., 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* 14, 467–494.
- Hynes, W.L., Ferretti, J.J., Gilmore, M.S., Segarra, R.A., 1992. PCR amplification of streptococcal DNA using crude cell lysates. *FEMS Microbiol. Lett.* 73, 139–142.
- İspirli, H., Demirbaş, F., Dertli, E., 2017. Characterization of functional properties of *Enterococcus* spp. isolated from Turkish white cheese. *LWT Food Sci. Technol.* 75, 358–365.
- Joung, J.Y., Lee, J.Y., Ha, Y.S., Shin, Y.K., Kim, Y., Kim, S.H., Oh, N.S., 2016. Enhanced microbial, functional and sensory properties of herbal yogurt fermented with korean traditional plant extracts. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* 36, 90–99.
- Macedo, A.C., Tavares, T.G., Malcata, F.X., 2004. Influence of native lactic acid bacteria on the microbiological, biochemical and sensory profiles of Serra da Estrela cheese. *Food Microbiol.* 21, 233–240.
- Mundt, J.O., Hammer, J.L., 1968. Lactobacilli on plants. *Appl. Microbiol.* 16, 1326–1330.
- Ordiales, E., Benito, M.J., Martín, A., Casquete, R., Serradilla, M.J., Córdoba, M.G., 2013. Bacterial communities of the traditional raw ewe's milk cheese “Torta del Casar” made without the addition of a starter. *Food Control* 33, 448–454.
- Osmani, Zannini, E., Aquilanti, L., Mannazzu, I., Comitini, F., Clementi, F., 2009. Lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdoughs of the Marche region. *Ital. J. Food Sci.* 21, 269–286.
- Osmani, A., Garofalo, C., Aquilanti, L., Milanović, V., Clementi, F., 2015. Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *Int. J. Food Microbiol.* 194, 62–70.
- Osmani, A., Garofalo, C., Milanović, V., Taccari, M., Aquilanti, L., Polverigiani, S., Clementi, F., 2016. Indoor air quality in mass catering plants: Occurrence of airborne eumycetes in a university canteen. *Int. J. Hosp. Manag.* 59, 1–10.
- Pangallo, D., Šaková, N., Koreňová, J., Puškárová, A., Kraková, L., Valík, L., Kuchta, T., 2014. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 170, 38–43.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T.P., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Cotter, P.D., 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 664–698.
- Roseiro, L.B., Barbosa, M., Ames, J.M., Wilbey, R.A., 2003. Cheesemaking with vegetable coagulants: the use of *Cynara* L. for the production of ovine milk cheeses. *Int. J. Dairy Technol.* 56, 76–85.
- Ruggirello, M., Coccolin, L., Dolci, P., 2016. Fate of *Lactococcus lactis* starter cultures during late ripening in cheese models. *Food Microbiol.* 59, 112–118.
- Ruiz Rodríguez, L., Vera Pingitore, E., Rollan, G., Cocconcelli, P.S., Fontana, C., Saavedra, L., Vignolo, G., Hebert, E.M., 2016. Biodiversity and technological-functional potential of lactic acid bacteria isolated from spontaneously fermented quinoa sourdoughs. *J. Appl. Microbiol.* 2016, 1289–1301.
- Sádecká, J., Šaková, N., Pangallo, D., Koreňová, J., Kolek, E., Puškárová, A., Bučková, M., Valík, L., Kuchta, T., 2016. Microbial diversity and volatile odour-active compounds of barreled ewes' cheese as an intermediate product that determines the quality of winter bryndza cheese. *LWT Food Sci. Technol.* 70, 237–244.

- Šaková, N., Sádecká, J., Lejková, J., Puškárová, A., Koreňová, J., Kolek, E., Valík, L., Kuchta, T., Pangallo, D., 2015. Characterization of May bryndza cheese from various regions in Slovakia based on microbiological, molecular and principal volatile odorants examination. *J. Food Nutr. Res.* 54, 239–251.
- Sousa, M.J., Malcata, F.X., 1997. Comparison of plant and animal rennets in terms of microbiological, chemical and proteolysis characteristics of ovine cheese. *J. Agric. Food Chem.* 45, 74–81.
- Tabla, R., Gómez, A., Simancas, A., Rebollo, J.E., Molina, F., Roa, I., 2016. Enterobacteriaceae species during manufacturing and ripening of semi-hard and soft raw ewe's milk cheese: Gas production capacity. *Small Rumin. Res.* 145, 123–129.
- Taccari, M., Aquilanti, L., Polverigiani, S., Osimani, A., Garofalo, C., Milanovic, V., Clementi, F., 2016. Microbial diversity of type I sourdoughs prepared and back-slopped with wholemeal and refined soft (*Triticum aestivum*) wheat flours. *J. Food Sci.* 81, 1996–2005.
- Tejada, L., Fernández-Salguero, J., 2003. Chemical and microbiological characteristics of ewe milk cheese (Los Pedroches) made with a powdered vegetable coagulant or calf rennet. *Ital. J. Food Sci.* 15, 125–131.
- Vioque, M., Gómez, R., Sánchez, E., Mata, C., Tejada, L., Fernández-Salguero, J., 2000. Chemical and microbiological characteristics of ewes' milk cheese manufactured with extracts from flowers of *Cynara cardunculus* and *Cynara humilis* as coagulants. *J. Agric. Food Chem.* 48, 451–456.
- Widnyana, I.K., Javandira, C., 2016. Activities *Pseudomonas* spp. and *Bacillus* sp. to stimulate germination and seedling growth of tomato plants. *Agric. Agric. Sci. Procedia* 9, 419–423.