

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL MOLISE

## FACOLTÀ DI AGRARIA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE ANIMALI, VEGETALI E DELL'AMBIENTE

---

---

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN

“DIFESA E QUALITÀ DELLE PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI  
E FORESTALI”

XX CICLO

SETTORE MUR: AGR/12- Patologia vegetale

**Miglioramento della qualità di pani tipici pugliesi.  
Identificazione di batteri lattici con proprietà  
antimicrobiche e di *Bacillus* sporigeni isolati da semole  
di grano duro**

**Tutor:**

Dott.ssa Paola Lavermicocca

Dott. Angelo Visconti

**Coordinatore:**

Prof. Pasquale Trematerra

**Dottoranda:**

Dott.ssa Mara Favilla

---

---



*a Fabio*

## INDICE

<b>Riassunto</b>	5
<b>Abstract</b>	6
<b>INTRODUZIONE</b>	
<b>1.1 Contesto della ricerca</b>	8
<b>1.2 Il pane</b>	9
<b>1.3 I pani tipici</b>	10
<b>1.4 Le semole rimacinate di grano duro: aspetti microbiologici</b>	10
<b>1.5 Tecniche di biologia molecolare per l'identificazione e la caratterizzazione dei microrganismi negli alimenti</b>	13
<b>1.6 I batteri lattici</b>	15
<b>1.7 Attività antimicrobica dei batteri lattici</b>	17
1.7.1 Attività antifungina	18
1.7.2 Attività antibatterica	20
<b>1.8 Contaminazioni microbiche dei prodotti lievitati da forno</b>	21
1.8.1 Fattori che influenzano la crescita microbica	21
1.8.2 Alterazioni fungine	22
1.8.3 Alterazioni batteriche	23
<b>1.9 Strategie per estendere la conservabilità dei prodotti lievitati da forno</b>	24
1.9.1 Sistemi di prevenzione	25
1.9.2 Conservanti chimici e loro meccanismo d'azione	26
1.9.3 Bioconservanti	27
<b>1.10 Tabelle</b>	30
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	
<b>2. Selezione di batteri lattici con attività antimicrobica da semole rimacinate di grano duro e applicazione dei loro prodotti di fermentazione come bioconservanti nel pane</b>	34
<b>2.1 Introduzione</b>	35

<b>2.2 Materiali e Metodi</b>	38
2.2.1 Campioni di semola	38
2.2.2 Analisi microbiologiche	38
2.2.3 Amplificazione mediante rep-PCR	38
2.2.4 Identificazione genetica mediante sequenziamento del gene 16S - rRNA	39
2.2.5 Identificazione molecolare di <i>Lactobacillus plantarum</i>	40
2.2.6 Prodotti di fermentazione (PF) dei batteri lattici	41
2.2.7 Composti chimici	41
2.2.8 Determinazione della produzione di acidi organici nei prodotti di fermentazione	41
2.2.9 Attività antifungina <i>in vitro</i> dei prodotti di fermentazione	42
2.2.10 Inibizione di <i>Bacillus subtilis</i>	43
2.2.11 Stabilità chimico-fisica dei PF	43
2.2.12 Prove di panificazione in laboratorio	44
2.2.13 Analisi statistiche	44
<b>2.3 Risultati</b>	45
2.3.1 Isolamento di batteri lattici	45
2.3.2 Caratterizzazione e identificazione dei batteri lattici	45
2.3.3 Attività antifungina	47
2.3.4 Inibizione della germinazione delle spore di <i>B. subtilis</i> ATCC 8473	47
2.3.5 Effetto della temperatura, del pH e degli enzimi proteolitici	48
2.3.6 Produzione degli acidi organici nei prodotti di fermentazione	48
2.3.7 Relazione tra attività antifungina e acidi organici	48
2.3.6 Prove di panificazione in laboratorio	49
<b>2.4 Discussione</b>	50
<b>2.5 Conclusioni</b>	55
<b>2.6 Tabelle e figure</b>	56
<b>3. Studio e caratterizzazione della popolazione di <i>Bacillus</i> spp.</b>	

contaminante le semole rimacinate di grano duro	66
<b>3.1 Introduzione</b>	67
<b>3.2 Materiali e metodi</b>	69
3.2.1 Campioni di semole ed analisi microbiologica	69
3.2.2 Estrazione DNA genomico	69
3.2.3 Amplificazione mediante rep-PCR Caratterizzazione genotipica mediante rep-PCR	70
3.2.3 Identificazione molecolare di <i>Bacillus</i> spp	71
<b>3.3 Risultati</b>	74
3.3.1 Isolamento e caratterizzazione di <i>Bacillus</i> spp.	74
<b>3.4 Discussione</b>	76
<b>3.5 Tabelle e figure</b>	78
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	88
<b>Sinopsi</b>	102
<b>Ringraziamenti</b>	104

## Riassunto

Il lavoro di ricerca ha avuto come obiettivo il miglioramento della qualità microbiologica di pani tipici pugliesi attraverso la selezione di batteri lattici con attività antimicrobica e la caratterizzazione di contaminanti batterici (*Bacillus* spp.), da semole rimacinate di grano duro. I batteri lattici sono microrganismi da sempre utilizzati nella preparazione di alimenti fermentati tra cui alcuni tipi di pane ottenuti dalla fermentazione del *lievito naturale*. I prodotti del metabolismo dei batteri lattici favoriscono una prolungata conservabilità microbiologica del pane grazie alle loro proprietà antimicrobiche. Lo studio dei batteri lattici presenti nelle semole rimacinate di grano duro impiegate nella produzione di pani tipici pugliesi può consentire l'individuazione di ceppi con particolari caratteristiche pro-tecnologiche per il miglioramento della qualità dei prodotti da forno. Inoltre l'uso di i metaboliti antimicrobici, in alternativa all'impiego di *lievito naturale*, che richiede tempi di fermentazione lunghi, può rappresentare un nuovo strumento di controllo delle contaminazioni microbiche dei prodotti da forno.

In questo studio, le popolazioni lattiche isolate da 30 campioni di semole rimacinate di grano duro utilizzate per la produzione di pani tipici pugliesi sono state analizzate per individuare ceppi con proprietà antimicrobiche. L'analisi ha portato all'isolamento di 250 isolati distinti in 17 ceppi mediante rep-PCR. Un ceppo rappresentativo di ciascun profilo rep-PCR è stato utilizzato per la successiva identificazione della specie. Il sequenziamento del gene 16S rRNA ha permesso di identificare le seguenti specie: *Weissella cibaria*, *W. confusa*, *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *L. rossiae* e *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. Tra queste, le specie *W. cibaria* e *W. confusa* hanno mostrato la variabilità genotipica più ampia e sono risultate le più comuni poiché isolate dal 75% dei campioni. La presenza di attività antimicrobica nei prodotti di fermentazione (PF) ottenuti inoculando i 17 ceppi rappresentativi dei profili rep in un substrato a base di farina, è stata valutata *in vitro* contro 3 funghi contaminanti i prodotti da forno (*Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti* e *Endomyces fibuliger*) e *Bacillus subtilis* responsabile dell'alterazione batterica nota come "pane filante". Le analisi hanno portato all'individuazione di 6 ceppi appartenenti alle specie *Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus rossiae*, *L. plantarum* e *Lactococcus lactis*. Tra questi è stato selezionato il ceppo *L. citreum* C2-27 il cui prodotto di fermentazione ha dimostrato un'attività paragonabile a quella del propionato di calcio (0,3% p/vol) verso i tre funghi, ha inibito la germinazione delle spore di *B. subtilis*, ed infine è risultato efficace nel ritardare lo sviluppo di *A. niger* ITEM5132 direttamente sul pane. Indagini biochimiche condotte sui PF hanno indicato negli acidi lattico (28,26 mM) e acetico (14,62 mM) prodotti e nel valore di pH acido (3,42) i principali responsabili dell'attività antimicrobica.

Il contenimento delle alterazioni del pane può essere raggiunto non solo mediante l'uso di conservanti naturali, ma anche con il controllo della qualità microbiologica delle materie prime. Recentemente diverse aziende del Meridione d'Italia hanno segnalato problemi di deterioramento delle produzioni panarie attribuiti alla presenza di spore di *Bacillus* spp nelle materie prime. Nell'ambito dell'attività di ricerca sono stati esaminati 59 campioni di semole rimacinate di grano duro provenienti da alcune zone della provincia di Bari e Foggia al fine di valutare l'eventuale contaminazione di *Bacillus* spp. Lo studio ha dimostrato che ca. il 90% dei campioni presentavano un livello di contaminazione compreso tra  $10^0$ - $10^3$  spore/g e che il 60% degli isolati ottenuti sono stati identificati come *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* e *B. licheniformis*, le due specie più comunemente associate all'alterazione del pane filante.

## Abstract

The aim of this research work was to obtain the improvement of microbiological quality of traditional Apulian breads through the selection of lactic acid bacteria with antimicrobial activity and the characterization of bacterial contaminants (*Bacillus* spp.) from wheat semolina. Lactic acid bacteria are microorganisms used since ancient times for preparation of fermented foods such as some types of bread made with sourdough. The products of metabolism of lactic acid bacteria can extend the shelf life of bread due to their antimicrobial properties. The study of lactic acid bacteria in the wheat semolina used in the production of traditional Apulian breads may lead to the selection of strains with peculiar pro-technological characteristics for improvement of bakery product shelf life. Moreover, the use of antimicrobial metabolites as an alternative to sourdough that need a long fermentation time, may represent a new tool for control microbial contamination of bakery products.

In this study, 30 samples of durum wheat semolina were subjected to microbiological analysis in order to explore their lactic acid bacteria diversity and to find strains with antifungal activity. The analysis led to the isolation of 250 isolates that were differentiated into 17 strains by rep-PCR. A representative strain of each rep-PCR pattern was used to identify the species. The sequencing of 16S rRNA gene allowed to identify the following species: *Weissella cibaria*, *W. confusa*, *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *L. rossiae* and *Lactococcus lactis* subsp *lactis*. In particular, *W. cibaria* and *W. confusa* showed the greatest genotypic variability and were the most widely diffused, since occurring in the 75% of the semolina samples. The antimicrobial activity of the fermentation products (FP) obtained by growing the 17 strains representative of the rep-PCR profiles in a flour-based medium, was evaluated in *in vitro* experiments against 3 fungal contaminants of bakery products (*Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti* and *Endomyces fibuliger*) as well as against *Bacillus subtilis*, the causal agent of "bread rope". The analysis led to the selection of 6 LAB strains belonging to the species *Weissella cibaria*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus rossiae*, *L. plantarum* e *Lactococcus lactis* showing antimicrobial properties. Among these strains, the fermentation product of *L. citreum* C2-27 showed a strong inhibitory activity towards the three above fungi, which was comparable to that of calcium propionate (0.3%, wt/vol), and also inhibited *B. subtilis* spore germination and delayed the development of *A. niger* ITEM5132 directly on bread. Biochemical investigations carried out on the FPs suggested that antimicrobial activity was mainly related to lactic acid (26.28 mM) and acetic acid (14.62 mM) production, and to the low pH (pH = 3.42).

Along with the use of natural preservatives, prevention and reduction of bread spoilage may be achieved also through the control of microbiological quality of raw materials. Recently, several companies in Southern Italy have reported problems of deterioration of bakery products due to the presence of spores of *Bacillus* spp. in raw materials. As part of this research, 59 samples of wheat semolina from different localities in the areas of Bari and Foggia were examined in order to assess the possible contamination by *Bacillus* spp. The study showed that approximately the 90% of samples were contaminated by  $10^0$ - $10^3$  spores/g. Sixty percent of isolates were identified as *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* and *B. licheniformis*, the two species most commonly associated with ropy bread spoilage.



## **INTRODUZIONE**

## 1.1 Contesto della ricerca

La domanda di innovazione da parte delle imprese che operano nell'industria della panificazione e dei prodotti da forno ha origine dalle problematiche derivanti dall'ampliamento dei mercati alimentari e dallo sviluppo della grande distribuzione che hanno reso la conservabilità degli alimenti uno dei parametri indispensabili per qualificare gli stessi prodotti. Questo è vero a livello di realtà produttive industriali ma è anche particolarmente rilevante per quei prodotti tradizionali che hanno perso la propria connotazione territoriale.

L'aumento della produzione e dell'esportazione di questi prodotti a vocazione territoriale, e la conseguente necessità di assicurare una elevata qualità di prodotti in termini di conservabilità reologica, organolettica e microbiologica ha determinato l'urgenza da parte di produttori locali di affrontare problematiche tecnologiche in sinergia con Enti di ricerca al fine di attuare processi innovativi per il miglioramento della qualità.

Dalla recente indagine dell'Agenzia Regionale per la Tecnologia e Innovazione (ARTI-Puglia, 2008) "La domanda di innovazione della filiera agroalimentare in Puglia" risulta che nel contesto regionale, le esigenze prioritarie di intervento sul prodotto sono essenzialmente mirate al prolungamento della shelf-life oltre che alla realizzazione di prodotti dal profilo sensoriale e salutistico ben definito. La produzione del pane in Puglia è caratterizzata dalla "tipicità" come nel caso del "pane di Altamura" che ha ottenuto la denominazione DOP (Denominazione di Origine Protetta) e che viene prodotto secondo un sistema tradizionale di lavorazione che utilizza semole rimacinate e lievito naturale.

L'indagine dell'ARTI segnala inoltre che un problema rilevante per il miglioramento della qualità dei prodotti riguarda la mancanza di risorse umane in grado di colmare lacune che l'imprenditore ha in materia di tecnologie e procedure innovative. Per questo la ricerca svolta a livello istituzionale può, occupandosi delle problematiche che emergono dal settore produttivo, offrire delle opportunità di sviluppo e innovazione anche ad aziende come quelle del settore della panificazione pugliese fortemente legate alle tradizioni locali e alla conservazione del carattere distintivo di tipicità.

L'interesse delle imprese che operano nel settore della panificazione ha determinato lo sviluppo di biotecnologie, orientate alla selezione di lieviti starter per standardizzare gli impasti e all'individuazione di metodi innovativi di biocontrollo per

prolungare la shelf-life dei prodotti, salvaguardando nello stesso tempo gli attributi sensoriali.

La microbiologia alimentare può offrire tecniche per migliorare i processi alimentari attraverso lo studio dell'ecologia dei microrganismi autoctoni per la selezione di ceppi protecnologici e dei contaminanti microbici per limitare le fonti di contaminazione (Lavermicocca *et al.*, 2010). La caratterizzazione molecolare e fisiologica di questi ceppi è determinante per la loro applicazione e per lo svolgimento del loro ruolo nel miglioramento della qualità dei prodotti sia a livello industriale che artigianale.

Al fine di ridurre l'incidenza delle contaminazioni e migliorare la conservabilità dei prodotti finiti è necessario intervenire mediante un sistema integrato che comprenda il controllo delle materie prime e delle diverse fasi del processo produttivo e l'utilizzo di strategie innovative.

## **1.2 Il pane**

Il pane è un alimento tradizionale tra i più diffusi al mondo e interessato da una costante e crescente innovazione. La sua storia appare strettamente correlata allo sviluppo delle moderne civiltà. Il pane nella sua forma più semplice è prodotto con l'impiego di farina, acqua, sale e lievito (*Saccharomyces cerevisiae* o lievito naturale), mediante un procedimento che comprende tre fasi: impasto, lievitazione e cottura. Durante la prima fase gli ingredienti vengono miscelati fino ad ottenere un impasto ben strutturato ed elastico in cui l'acqua idrata i granuli d'amido e attiva le funzioni enzimatiche. Durante la lievitazione il volume dell'impasto aumenta grazie alla produzione di anidride carbonica da parte dei lieviti che degradano i carboidrati. La fase di cottura avviene a temperature comprese tra i 180 e 220°C per un tempo variabile secondo la dimensione del pane. Durante le fasi di raffreddamento e confezionamento l'aspetto più importante riguarda il mantenimento di standard igienici elevati, in quanto condizioni di umidità e temperatura non adeguate favoriscono lo sviluppo di muffe e batteri alterativi che possono compromettere irrimediabilmente le produzioni.

Il pane è generalmente prodotto utilizzando sfarinati di grano tenero e in base al tipo di farina utilizzata si identificano le seguenti tipologie di pane: pane di tipo 00, pane di tipo 0, pane di tipo 1, pane di tipo 2 e pane di tipo integrale. Nella maggior parte dei casi la panificazione viene effettuata a livello artigianale; tuttavia negli ultimi anni è aumentata la quota di panificazione industriale, anche in seguito

all'ampliamento dei mercati e dell'esportazione di prodotti tipici, rendendo necessario ottenere un prodotto con prolungata conservabilità microbiologica.

### **1.3 I pani tipici**

Nel corso degli anni, parallelamente al miglioramento dei sistemi di molitura e alla selezione genetica delle varietà di grano si sono sviluppate, nelle varie zone geografiche, diverse tipologie di panificazione che hanno determinato l'attuale variabilità di tipi e forme. In Italia un censimento condotto dall'Istituto Nazionale di Sociologia Rurale (Picchi, 2000) ha evidenziato la produzione di circa 200 tipi di pane. I pani con carattere di tipicità coprono solo una parte del fatturato annuo (pari a ca. 5 miliardi di euro) e sono prodotti principalmente nelle regioni meridionali; ad esempio solo in Puglia e Campania sono prodotti circa 30 tipologie di pani tipici. Nelle regioni del nord Italia il pane è prevalentemente prodotto con farine di grano tenero, mentre in alcune regioni del centro e soprattutto del Sud Italia viene utilizzata la semola rimacinata di grano duro. Negli ultimi anni si è assistito alla valorizzazione, recupero e in alcuni casi alla certificazione dei pani tipici. Un esempio è rappresentato dal "pane di Altamura" che ha ottenuto di recente il marchio DOP. Il pane di Altamura è un pane tradizionale, strettamente legato al territorio di produzione, che viene prodotto secondo un preciso protocollo e presenta due elementi di forte tipicità: l'uso di semole rimacinate di grano duro e del lievito naturale.

### **1.4 Le semole rimacinate di grano duro: aspetti microbiologici**

Nel contesto produttivo nazionale e regionale sono commercializzate varietà di grano duro per la panificazione (es. Appulo, Arcangelo, Duilio, Simeto) che non possono essere usate indifferentemente per la produzione di pani tipici e che comunque pongono, in rapporto ad altri grani italiani ed esteri, problematiche specifiche sia in relazione al loro eventuale grado di contaminazione biologica e sia in relazione al loro eventuale uso in miscela con semole non nazionali. La tipicità ed il valore aggiunto del pane nasce anche a partire dalla materia prima.

La trasformazione del grano duro (*Triticum durum*) in semole rimacinate prevede tre fasi principali: la pulitura del grano, il condizionamento e la macinazione vera e propria. La pulitura ha lo scopo di allontanare materiale estraneo di natura vegetale o minerale. Nella fase del condizionamento il grano viene bagnato con una quantità di acqua sufficiente a facilitare il distacco delle parti più esterne dalla

mandorla farinosa e ad agevolare la rottura della stessa. Tale fase ha lo scopo di ammorbidire l'involucro per evitarne la frammentazione e favorirne il distacco, e di ridurre la durezza dell'albume per facilitarne la trasformazione in sfarinati. Il condizionamento è influenzato dalla quantità d'acqua aggiunta, dalla temperatura del trattamento e dalla durata del riposo del grano. Nella fase successiva di macinazione si ha la frammentazione delle cariossidi e la separazione dei costituenti. La prima operazione, detta rottura, permette di dissociare la mandorla centrale e i rivestimenti esterni, di frazionare le semole vestite e di ridurre la mandorla in farina; la seconda assicura la separazione della crusca e dei rivestimenti sulla base della granulometria e delle loro proprietà fisiche.

La coltivazione del grano duro rappresenta un comparto di grande importanza per l'agricoltura dell'area mediterranea, in particolare per le regioni del Sud Italia. Sebbene la principale forma di utilizzazione del frumento duro sia ancora rappresentata dalla pastificazione, una quota sempre più elevata viene destinata alla produzione di una vasta gamma di prodotti da forno. La panificazione con frumento duro, nata come operazione casalinga, si è trasformata in produzione artigianale, acquisendo una connotazione di tipicità e di genuinità che ha trovato un grande favore da parte del consumatore anche di zone lontane dalla produzione. L'elevato contenuto in proteine e in antiossidanti conferiscono alle semole rimacinate di grano duro caratteristiche peculiari di ordine tecnologico e nutrizionale rispetto agli sfarinati ottenibili da altri cereali (Miller *et al.*, 2000). In particolare, la qualità e la quantità di proteine presenti nel rimacinato consentono un maggior assorbimento di acqua ed una più lenta cessione della stessa dal prodotto finito, con conseguente maggiore resa produttiva ed un prolungamento della conservabilità duratura riferita al processo di raffermamento.

In genere, le farine di grano contengono una microflora eterogenea composta da una varietà di microrganismi che includono agenti alterativi (muffe, lieviti e batteri sporigeni) e non (batteri lattici). La maggior parte dei microrganismi si accumulano sulla superficie del grano e pertanto le farine integrali hanno generalmente una carica microbica più alta (Christensen, 1951; Berghofer *et al.*, 2003). In particolare, le materie prime possono contenere spore fungine e/o batteriche al momento del loro utilizzo e causare contaminazioni dei prodotti finiti. Infatti, sebbene il pane ed i prodotti lievitati da forno non siano classificati come alimenti ad alto rischio sanitario, essi possono essere contaminati da oltre 40 specie fungine e da spore termoresistenti di batteri del genere *Bacillus*. Questi ultimi sono responsabili di

un'alterazione del pane definita "pane filante" molto diffusa anche se sottovalutata da un punto di vista economico (Valerio *et al.*, 2008; Cook e Johnson, 2009; Kirschner e von Holy, 1989; Pepe *et al.*, 2003). Le specie generalmente associate a questo tipo di alterazione sono *B. subtilis* e *B. licheniformis* che originano dal suolo e contaminano il frumento già prima del raccolto (Smith *et al.*, 2004). Oltre a causare il "pane filante" o "incordatura del pane", *B. subtilis* se ingerito ad alte concentrazioni (per esempio  $10^8$  ufc/g di cibo) può provocare intossicazioni alimentari i cui sintomi includono vomito, diarrea ed emicrania (Kramer e Gilbert, 1989; Adams e Moss, 1995). Tra le specie di *Bacillus*, è stata riportata anche la presenza di *B. cereus* nelle materie prime (farina, lievito, etc.), una specie altamente tossigena (Kramer e Gilbert, 1989; Collins *et al.*, 1991; Pepe *et al.*, 2003).

Le farine possono essere contaminate anche da muffe: in genere questi microrganismi sono presenti con un valore medio di ca.  $10^3$  ufc/g (Potus e Suchet, 1989; Cicognani *et al.*, 1975; Ottogalli e Galli, 1979). Le muffe possono originare dal frumento prima del raccolto o durante il suo immagazzinamento, dai macchinari utilizzati per la molitura e/o dagli ambienti di lavorazione dei prodotti da forno (Christensen e Cohen, 1950; Eyles *et al.*, 1989; Berghofer *et al.*, 2003).

All'interno della microflora batterica presente nelle farine di frumento vi sono anche alcune specie appartenenti al gruppo dei batteri lattici (LAB). Tra queste sono state isolate specie di forma bacillare omo-fermentanti – *Lactobacillus casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. plantarum* e *L. salivarius* – etero-fermentanti di forma bacillare – *L. brevis* e *L. fermentum* – omofermentanti di forma coccica – *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *P. parvulus*, e *P. pentosaceus* – ed etero-fermentanti di forma coccica – *Leuconostoc* e *Weissella* (De Vuyst e Neysens, 2005).

L'umidità delle farine è un parametro che influenza in modo significativo lo sviluppo dei microrganismi contaminanti e di conseguenza la conservabilità della derrata (ICMSF 1998). Infatti Aydin *et al.* (2009) hanno osservato che campioni con valori medi di umidità del 14% mostravano una maggiore carica fungina. Il Codex Alimentarius Standard (1995) indica un livello massimo di umidità consentito per farine pari al 15,5%. Sebbene tale valore di umidità sia ritenuto troppo basso per supportare lo sviluppo microbico e/o la produzione di tossine da parte di contaminanti fungini (per esempio la crescita di specie micotossigene di *Penicillium* spp. e *Aspergillus* spp. richiede un contenuto minimo di umidità nel substrato del

16,5%), è stato visto che sono sufficienti aumenti del 1% - 2% dell'umidità per favorire lo sviluppo di tali microrganismi (Eyles *et al.*, 1989).

### **1.5 Tecniche di biologia molecolare per l'identificazione e la caratterizzazione dei microrganismi negli alimenti**

L'identificazione dei microrganismi presenti in matrici alimentari e lo studio della biodiversità microbica richiedono la disponibilità di adeguate tecniche di indagine.

In passato, la caratterizzazione e l'identificazione dei diversi isolati batterici erano eseguite solo in base a caratteristiche fenotipiche (ad es. morfologiche, immunologiche, patogenetiche, capacità di utilizzare determinate fonti di carbonio o di produrre alcuni metaboliti) la cui determinazione era lunga e laboriosa e non permetteva di accertare se i diversi isolati batterici appartenenti alla medesima specie fossero geneticamente distinguibili.

L'avvento della biologia molecolare ha reso più facile l'analisi genetica dei microrganismi, aumentando la possibilità di caratterizzarli, distinguerli e classificarli ed agevolando la valutazione della diversità genetica delle popolazioni soprattutto nel caso di specie strettamente correlate fra loro (Louws *et al.*, 1999). Le tecniche generalmente adottate sono relativamente semplici, rapide, hanno una elevata riproducibilità e sensibilità, e possono essere usate su tutti i microrganismi, compresi quelli non coltivabili (Busch e Nitschko, 1999). Tra di esse le tecniche basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) vengono ampiamente utilizzate per gli scopi suddetti. Infatti, una delle applicazioni più interessanti della PCR è la possibilità di ottenere un "fingerprinting" molecolare di un microrganismo che permette di distinguere su basi genetiche il microrganismo stesso da ceppi strettamente correlati anche appartenenti alla medesima specie.

Tra le tecniche basate sulla PCR la "rep-PCR" utilizza inneschi specifici nei confronti di sequenze ripetute e conservate (Versalovic *et al.*, 1991; George *et al.*, 1997). Queste sono rappresentate dalle sequenze palindrome extrageniche ripetute (REP), dalle sequenze intergeniche di consenso ripetute degli enterobatteri (ERIC), dagli elementi BOX e dalla sequenza politrinucleotidica (GTG)<sub>5</sub> (Versalovic *et al.*, 1994). I primer sono stati studiati per amplificare il DNA compreso tra due elementi ripetuti adiacenti (Gillings e Holley, 1997; Louws *et al.*, 1996). Il numero e la localizzazione delle sequenze ripetute può essere variabile tra i ceppi che, perciò, mostreranno dei profili diversi (Busch e Nitschko, 1999); inoltre la presenza o

l'assenza di un dato prodotto di amplificazione in differenti individui è un carattere altamente informativo per la valutazione della diversità o della somiglianza genetica (Nicholson e Rezanoor, 1994).

Nella rep-PCR l'uso di primer aventi sequenze definite di circa 20 bp permette di applicare condizioni di amplificazione sufficientemente stringenti da generare profili generalmente specifici per un dato ceppo e notevolmente riproducibili. Gli elementi ripetuti hanno la capacità di generare profili genomici complessi di 10 - 30 frammenti in un intervallo che va da meno di 200 bp a più di 6 kb per cui la rep-PCR è stata estesamente applicata per identificare e differenziare ceppi batterici (Louws *et al.*, 1999; Lavermicocca *et al.*, 2005). In particolare, la rep-PCR è stata impiegata per distinguere 105 ceppi di *Bacillus anthracis* da altre specie del gruppo del *Bacillus cereus* (Brumlik *et al.*, 2001) e per chiarire le relazioni genetiche tra le specie appartenenti al gruppo del *Bacillus cereus* (Cherif *et al.*, 2003). L'accertamento della posizione tassonomica di una determinata specie e la caratterizzazione dei biotipi costituisce un aspetto importante nel settore della microbiologia alimentare dove vi è la tendenza ad introdurre nuovi ceppi, selezionati in base a specifiche proprietà tecnologiche (probiotici, bioconservanti, starter) di cui però occorre avere una precisa conoscenza. Un importante vantaggio offerto dalle tecniche di biologia molecolare è quello di quantificare e monitorare nel tempo la biodiversità di una popolazione batterica a livello genetico. La diversità genetica riflette il potenziale genetico totale di una comunità e, in aggiunta, a causa della crescita selettiva e delle variazioni che inevitabilmente hanno luogo nel tempo, riflette i cambiamenti delle condizioni ambientali. Tecniche di biotipizzazione molecolare sono state infatti ampiamente utilizzate sia per studiare la biodiversità delle popolazioni di batteri lattici coinvolti nei processi fermentativi sia per analizzare come diversi fattori - composizione degli impasti, origine geografica, qualità delle farine - influenzino la comunità lattica presente (Scheirlinck *et al.*, 2007; Scheirlinck *et al.*, 2008; Van der Meulen *et al.*, 2007; De Vuyst *et al.*, 2002; Kostinek *et al.*, 2007).

Le tecniche di biotipizzazione non permettono generalmente l'identificazione delle specie, pertanto a tale scopo è necessario utilizzare altre tecniche che prevedono l'analisi delle sequenze nucleotidiche di particolari geni. Il gene del 16S rRNA (16S rDNA), che codifica per l'RNA ribosomiale della subunità 16S, è il gene più utilizzato per questo tipo di analisi. La dimensione del gene è di circa 1550 bp ed è costituito sia da regioni conservate che variabili. Per l'identificazione dei batteri



possono essere utilizzati inneschi universali disegnati sulle regioni conservate che permettono di amplificare una regione comprendente quelle variabili, consentendo di distinguere tra loro i batteri che appartengono a specie diverse (Chen *et al.*, 1989; Relman, 1999). Molte altre regioni genomiche sono state utilizzate per studiare le relazioni filogenetiche tra i batteri, ma quando l'obiettivo è quello di identificare un batterio sconosciuto l'analisi della sequenza del 16S rDNA è un metodo eccellente ed ampiamente impiegato. La diffusione di questa tecnica è anche dovuta al numero elevatissimo di sequenze appartenenti alle più diverse specie batteriche disponibili in banche dati (GenBank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Ribosomal Database Project, RDP-II, <http://rdp.cme.msu.edu/html/>) e con cui è possibile confrontare le sequenze del batterio da identificare.

## 1.6 I batteri lattici

I batteri lattici (LAB) rappresentano, insieme ai lieviti, i microrganismi con il maggiore numero di applicazioni nella preparazione degli alimenti. I LAB sono stati descritti per la prima volta come agenti di acidificazione del latte, in quanto causano tale alterazione per effetto della produzione di acido lattico. Sono batteri Gram-positivi, cocchi o bacilli, non sporigeni, catalasi negativi e sprovvisti di citocromi (con alcune eccezioni), dalle abitudini anaerobiche ma aerotolleranti, che normalmente generano acido lattico come principale prodotto metabolico della fermentazione dei carboidrati (Axelsson, 2004). Storicamente, il gruppo comprende i generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, ma tra i generi di LAB di maggiore importanza nelle tecnologie alimentari, vi sono anche *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella* (Axelsson, 2004; Stiles e Holzapfel, 1997).

I LAB possono essere distinti in omo- o etero-fermentanti, a seconda del modo in cui fermentano gli zuccheri esosi in condizioni di crescita non limitanti. I LAB omofermentanti utilizzano il pathway della glicolisi (ciclo di Embden-Meyerhof-Parnas), che genera acido lattico come prodotto finale principale. I LAB eterofermentanti utilizzano invece il pathway del 6-fosfogluconato/fosfochetolasi (6-PG/PK), che porta principalmente alla produzione di acido lattico, anidride carbonica ed etanolo (o acido acetico) come prodotti finali. Tuttavia, i LAB omo- e eterofermentanti non possono essere distinti esclusivamente in base al tipo di prodotti di fermentazione che generano, poiché alcune specie si comportano come eterofermentanti facoltative. Per quanto riguarda la fermentazione degli esosi,

queste specie sono omofermentanti, ma in particolari condizioni (ad esempio, se la fonte di carbonio disponibile è un pentoso), viene attivato il pathway 6-PG/PK, con conseguente fermentazione eterolattica (Axelsson, 2004). I LAB producono anche altri composti, oltre agli acidi lattico e acetico, che influenzano positivamente l'aroma ed il sapore degli alimenti fermentati, come il diacetile che proviene dal metabolismo del citrato. I LAB hanno complesse esigenze nutritive soprattutto per quanto riguarda i carboidrati fermentescibili, aminoacidi, acidi grassi, sali e vitamine (Björkroth e Holzapfel, 2006; Hammes e Hertel, 2003). I batteri lattici sono la componente microbiologica fondamentale del *lievito naturale*.

Il lievito naturale è costituito principalmente da una miscela di farina e acqua fermentata da batteri lattici (LAB) e lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida krusei*, *Hansenula anomala*) in un rapporto di 100:1 (Ottogalli *et al.*, 1996). Per lievito naturale (impasto acido o lievito acido) si intende un impasto formato da acqua, farina ed eventualmente sale, che, lasciato fermentare spontaneamente senza l'intervento di microrganismi deliberatamente aggiunti, contiene un complesso sistema biologico costituito da batteri lattici e lieviti. Tali microrganismi originano direttamente dalla farina o dall'ambiente di lavorazione e sono responsabili del processo fermentativo. La propagazione del lievito naturale ed il mantenimento della sua attività fermentativa sono realizzati mediante la tecnica del "rinfresco" che consiste nell'aggiunta periodica di acqua e farina, prima di ogni ciclo di fermentazione, allo scopo di garantire un adeguato rifornimento di nutrienti e di realizzare condizioni ambientali selettive per i microrganismi di interesse (Onno e Roussel, 1994; Quaglia, 1984).

La microflora del lievito naturale è caratterizzata da una grande variabilità di specie e di ceppi che origina dalle numerose tradizioni panarie di diversa origine geografica. L'ecologia microbica del lievito naturale è influenzata da fattori endogeni (composizione chimica e microbiologica dell'impasto) e esogeni (temperatura, attività d'acqua, potenziale redox) (Hammes e Gänzle, 1998; Hammes *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1996). In particolare, i parametri del processo quali attività dell'acqua, quantità e composizione degli starter, numero dei rinfreschi, durata della fermentazione agiscono in modo rilevante sulla ecologia microbica del lievito naturale, favorendo la selezione e lo sviluppo della microflora lattica e dei lieviti rispetto a quello di altri microrganismi che naturalmente contaminano le farine o gli ambienti dove avviene la lavorazione dell'impasto. Nei lieviti naturali tradizionali i batteri lattici etero-fermentanti rappresentano le specie dominanti del processo

fermentativo (Corsetti *et al.*, 2003; Corsetti *et al.*, 2001; De Vuyst *et al.*, 2002; Meroth *et al.*, 2003). Nelle prime fasi dei processi fermentativi si sviluppano alcune specie appartenenti ai generi *Leuconostoc* e *Weissella* che sembrano avere un ruolo nel favorire la crescita dei lattobacilli (*L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. farciminis*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*) che successivamente diventeranno le specie dominanti in relazione alla loro capacità di adattamento (Tabella 1.1).

L'attività fermentativa dei batteri lattici porta all'attivazione di una serie di processi metabolici ed enzimatici che influenzano in modo determinate le proprietà tecnologiche (per esempio migliora la lavorabilità dell'impasto), nutrizionali, organolettiche e di conservabilità del prodotto finito (Hammes e Gänzle, 1998). Questi processi comprendono: l'attivazione delle fitasi presenti nella farina con il conseguente aumento della disponibilità dei nutrienti (Fretzdorff e Brümmer, 1992), l'azione di enzimi proteolitici (Di Cagno *et al.*, 2002; Gobbetti *et al.*, 1996), la produzione di composti volatili aromatici (Gobbetti *et al.*, 1995), la produzione di composti con proprietà antibatteriche e antifungine, la produzione di EPS che migliorano la struttura, il volume, la sofficità e la conservazione (Lavermicocca *et al.*, 2000; Lavermicocca *et al.*, 2003; Katina *et al.*, 2002; Corsetti *et al.*, 1998a; Tieking *et al.*, 2003). La selezione di ceppi lattici che compongono il *lievito naturale* ha determinato l'individuazione di ceppi con peculiari caratteristiche biotecnologiche tali da poter essere utilizzati per migliorare le qualità reologiche, sensoriali e di conservabilità delle produzioni panarie.

Come accennato in precedenza, i LAB hanno fatto parte della dieta umana sin da tempi antichissimi, pertanto si potrebbe ritenere che il loro uso per la bioconservazione e la loro assunzione con alimenti e mangimi siano completamente privi di rischi. I LAB sono pertanto classificati come GRAS (Generally Recognized as Safe). Tuttavia i regolamenti concernenti l'utilizzo di questi microrganismi in prodotti alimentari variano nei diversi Paesi (Feord, 2002; Wessels *et al.*, 2004), ma comunque la specifica applicazione dei LAB come additivi, ingredienti, coadiuvanti nei processi di trasformazione, probiotici, etc. deve soddisfare precisi requisiti (Wessels *et al.*, 2004).

### **1.7 Attività antimicrobica dei batteri lattici**

Come accennato in precedenza, i LAB possono produrre un certo numero di sostanze antimicrobiche. Alcune di loro (ad esempio acidi organici e reuterina), inibiscono batteri, lieviti e funghi filamentosi, mentre altre, come le batteriocine sono

dotate di attività inibitoria selettiva nei confronti di batteri strettamente correlati ai ceppi produttori (Messens e De Vuyst, 2002; Schnürer e Magnusson, 2005).

### 1.7.1 Attività antifungina

Studi sul potenziale antifungino dei LAB hanno permesso di identificare composti con effetti inibitori nei confronti di diverse specie di muffe e di lieviti (Tabella 1.2) (Corsetti *et al.*, 1998b; Lavermicocca *et al.*, 2000; Niku-Paavola *et al.*, 1999; Magnusson, 2003; Sjögren *et al.*, 2003; Sjögren, 2005). Lavermicocca *et al.* (2000) hanno identificato gli acidi fenilattico e 4-idrossi fenilattico come i metaboliti principalmente responsabili dell'attività antifungina di un ceppo di *L. plantarum* isolato da impasto acido. Utilizzando questo ceppo come starter nell'impasto è stato ottenuto un notevole ritardo nello sviluppo fungino rispetto al pane di controllo ottenuto dalla fermentazione di un ceppo non produttore. Precedentemente, Corsetti *et al.* (1998b) hanno riportato l'effetto antifungino di un altro batterio lattico isolato da impasti acidi, *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1, in grado di produrre una miscela di acidi organici con azione sinergica (acido acetico, caproico, formico, butirrico, n-valerico) responsabile dell'effetto inibitorio. Sono stati riportati anche batteri lattici produttori di molecole proteiche e/o di sostanze non ancora caratterizzate con attività antifungina (Gourama e Bullerman, 1997; Magnusson e Schnurer, 2001; Okkers *et al.*, 1999; De Muyck *et al.*, 2004; Florianowicz, 2001; Laitila *et al.*, 2002; Mankanjuola *et al.*, 1992; Roy *et al.*, 1996; Schwenninger *et al.*, 2005).

Attualmente vi è un grande interesse scientifico riguardo ai LAB con proprietà antifungine. La maggior parte delle specie dotate di attività antifungina appartengono al genere *Lactobacillus*. Il possibile uso di questi batteri come bioconservanti è stato recentemente riportato dal Schnürer e Magnusson (2005). Alla luce dei risultati mostrati in questi studi esistono interessanti prospettive di impiego dei LAB con attività antifungina nella preparazione di alimenti al fine di migliorare la loro qualità, per esempio riducendo l'uso di additivi chimici, e per prevenire la crescita dei lieviti e funghi agenti di deterioramento o di funghi micotossigeni.

Tra le sostanze prodotte dai LAB e principalmente coinvolte nell'attività antifungina gli acidi organici rivestono un ruolo importante. I principali acidi organici deboli prodotti dai LAB e attualmente ammessi come additivi acidificanti o conservanti includono l'acido acetico (pKa 4,76), benzoico (pKa 4.19), lattico (pKa

3,86), propionico (pKa 4,87) e sorbico (pKa 4.76) (Direttiva 1995/2/CE; Decreto n. 312, 13 luglio 1998).

Il meccanismo generale dell'inibizione prodotta dagli acidi organici si pensa sia legato alla penetrazione attraverso la membrana cellulare di molecole di acido in forma indissociata. Una volta all'interno della cellula, il pH più elevato del citoplasma determina la dissociazione dell'acido. Questo genera un accumulo degli anioni e dei protoni dell'acido e di conseguenza una diminuzione del pH intracellulare (pHint). È stato dimostrato che nei lieviti l'abbassamento del pHint inibisce la glicolisi (Krebs *et al.*, 1983). In questo modo, l'acidificazione intracellulare è in grado di influenzare direttamente la produzione di energia e la crescita dell'organismo bersaglio. Oltre alla riduzione dei pHint, altri effetti, come l'accumulo di anioni e disordini strutturali e funzionali della membrana cellulare sono ritenuti responsabili dell'attività inibente degli acidi deboli (Piper *et al.*, 2001). Il confronto dell'attività antifungina di diversi acidi organici ha evidenziato che la risposta inibitoria è diversa a seconda dell'acido debole utilizzato (Narendranath *et al.*, 2001a; 2001b; Stratford e Anslow, 1996). Secondo Stratford e Anslow (1996), l'inibizione di *S. cerevisiae* causata dal sorbato non è solo il risultato dell'acidificazione intracellulare, ma è soprattutto dovuta ad una interferenza con la membrana cellulare. Il meccanismo d'azione degli acidi organici deboli nei confronti dei funghi filamentosi non è stato ancora del tutto chiarito. Tuttavia, Plumridge *et al.* (2004) hanno dimostrato che l'acido sorbico determina l'inibizione della germinazione conidica e della crescita miceliare in *Aspergillus niger* attraverso l'acidificazione intracellulare e il disturbo del bilancio energetico che si realizza per effetto della riduzione del contenuto cellulare di ATP. In generale, è il pH ambientale che influisce sulla quantità di acido presente in forma indissociata e in grado di diffondere attraverso la membrana cellulare. Tuttavia, le possibili modalità d'azione sembrano essere diverse, in relazione sia al tipo di acido organico, sia allo specifico organismo target.

*S. cerevisiae* può sviluppare una resistenza agli acidi organici deboli attraverso l'induzione di proteine di membrana plasmatica (Piper *et al.*, 1998). Al contrario, il lievito *Zygosaccharomyces bailii* risulta essere resistente all'azione degli acidi grazie alla sua capacità di degradare gli acidi e di limitare la loro diffusione modificando la composizione e la struttura della parete cellulare.

### 1.7.2 Attività antibatterica

Le sostanze con attività antimicrobica prodotte dai batteri lattici sono molteplici. Oltre agli acidi organici, vi sono altre sostanze con effetto battericida e/o batteriostatico, soprattutto verso specie batteriche affini (De Vuyst e Vandamme, 1994). Queste sostanze comprendono: le batteriocine, una classe eterogenea di composti di natura proteica e/o peptidica, antibiotici e sostanze note come BLIS (sostanze inibenti batteriocine-simili). Di queste ultime ricordiamo la Bavaricin A, prodotta da *Lactobacillus sakei* MI401, Plantaricina ST31 prodotta da *L. plantarum* ST31 e Reutericyclina ottenuta da *L. reuteri* LTH2584 (Corsetti *et al.*, 1996; Ganzle 1998; Todorov *et al.*, 1999).

Le batteriocine prodotte dai LAB hanno ricevuto particolare attenzione, negli ultimi anni, per via di un loro potenziale impiego come conservanti naturali nell'industria alimentare (Ennahar *et al.*, 1999). Le batteriocine sono piccoli peptidi o proteine con attività antimicrobica verso i batteri Gram-positivi strettamente correlati. Lo spettro di attività antibatterica frequentemente include organismi che causano alterazioni dei prodotti alimentari o batteri patogeni come *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. Oltre ad avere attività antimicrobica contro batteri indesiderati, si ritiene che le batteriocine possano contribuire alla competitività dell'organismo che le produce. Attività nei confronti di batteri Gram-negativi come *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. sono state riportate, ma generalmente si verificano solo quando l'integrità della membrana esterna è stata compromessa, per esempio da uno shock osmotico o abbassamento del pH in presenza di sostanze detergenti o agenti chelanti (Stevens *et al.*, 1991). Le batteriocine prodotte dai LAB si distinguono in diverse classi: I) lantibiotici, piccole molecole termostabili, composte da uno o due peptidi e contenenti lantionina, che si originano da modifiche post-trascrizionali di prepeptidi inattivi; II) molecole peptidiche di piccole dimensioni, termostabili non contenenti lantionina; questa classe include le batteriocine pediocino-simile (classe II a), batteriocine bipeptidiche (classe IIb) e batteriocine cicliche (classe IIc); III) batterio-lisine, proteine di grandi dimensioni, termolabili con attività litica (Klaenhammer, 1988). La maggior parte delle batteriocine appartenenti alle classi I e II sono attive a concentrazioni nanomolari e causano permeabilizzazione della membrana cellulare che conduce alla perdita del potenziale di membrana e alla fuoriuscita di ioni, ATP e altre molecole vitali dalla cellula target (Klaenhammer, 1988).

Le batteriocine possono essere utilizzate come additivi alimentari. Per esempio la nisina è disponibile commercialmente in forma parzialmente purificata (De Vuyst e Vandamme, 1994; Twomey *et al.*, 2002). In alternativa all'aggiunta negli alimenti, le batteriocine possono essere prodotte dalla coltura starter direttamente nell'alimento fermentato. Diversi autori hanno infatti indicato che colture starter contenenti lattobacilli sono in grado di produrre le loro batteriocine in matrici alimentari tra cui impasti acidi (Leroy *et al.*, 2004; 2006; De Vuyst e Leroy, 2007).

## **1.8 Contaminazioni microbiche dei prodotti lievitati da forno**

Il pane e i prodotti da forno sono considerati alimenti piuttosto stabili anche se esistono condizioni che possono favorire lo sviluppo di specie alterative. La presenza di microrganismi alterativi nelle materie prime o sui macchinari impiegati durante le fasi di processo possono compromettere irreversibilmente le produzioni panarie. Le principali cause del deterioramento dei prodotti lievitati da forno sono rappresentate dallo sviluppo di muffe. Meno comune, ma comunque in grado di ridurre la resa panaria è il deterioramento batterico conosciuto come "pane filante" causato dalla crescita di specie di *Bacillus* spp. Infine il pane può essere contaminato anche se meno frequentemente da parte di lieviti.

La conoscenza delle specie microbiche coinvolte e dei fattori che ne influenzano la crescita può contribuire a individuare delle strategie innovative per contrastare il fenomeno alterativo.

### **1.8.1 Fattori che influenzano la crescita microbica**

Le materie prime e gli alimenti che ne derivano, sono soggetti a deterioramento da parte di microrganismi contaminanti comunemente presenti in natura. Le contaminazioni microbiologiche modificano la qualità di un alimento alterandone l'aspetto, l'odore o il sapore rendendolo inappetibile al consumatore e possono inoltre essere responsabili di importanti intossicazioni alimentari. Il grado di suscettibilità di un alimento all'attacco microbico è determinato dalle sue caratteristiche fisiche e chimiche. Da questo punto di vista, gli alimenti possono essere classificati in tre categorie principali: i) alimenti facilmente deperibili come carni, pesce, uova, latte frutta e verdura, ii) alimenti scarsamente deperibili come patate, mele frutta secca, pane, iii) alimenti stabili o pochissimo deperibili come zucchero, farina, riso, e legumi secchi. La deperibilità di queste tre categorie di alimenti è correlata soprattutto a fattori intrinseci quali, attività d'acqua ( $a_w$ ),

potenziale di ossidoriduzione (Eh), pH, proprietà chimiche dell'alimento; e fattori estrinseci quali, umidità relativa, temperatura e composizione dell'atmosfera (Jay, 1996). I cibi non deteriorabili sono quelli a bassa attività dell'acqua e possono essere quindi conservati per lunghi periodi di tempo.

### **1.8.2 Alterazioni fungine**

I funghi generalmente coinvolti nelle contaminazioni di prodotti a base di cereali possono essere distinti in funghi da campo, che contaminano i cereali prima del raccolto (*Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Cladosporium*), e funghi da magazzino che prevalgono nei sili (*Aspergillus*, *Penicillium*) e che possono crescere a valori di  $a_w$  al di sotto di 0,75 (Samson *et al.*, 1995). Queste ultime sono le più frequenti nei prodotti lievitati da forno (Tabella 1.3). Anche uno studio condotto su pane integrale ha dimostrato che le muffe più frequentemente riscontrate appartengono ai generi *Penicillium*, *Aspergillus* e *Cladosporium* (Viljoen and von Holy, 1997). In generale, i microrganismi presenti in farina e prodotti finiti riflettono il diverso comportamento delle specie fungine contaminanti e variano, principalmente, in relazione al valore di  $a_w$ .

La contaminazione del pane di parte dei funghi avviene generalmente dopo la cottura durante le successive fasi di lavorazione (raffreddamento, confezionamento, vendita). Infatti, la cottura garantisce la distruzione delle cellule vegetative e delle spore fungine (Ponte e Tsen, 1978) ma un aumento di umidità del prodotto in seguito ad un rapido raffreddamento può favorire lo sviluppo di microrganismi che contaminano gli ambienti di lavorazione. Per questo il pane affettato ed imbustato è soggetto ad un rischio di contaminazione maggiore perché le superfici di taglio sono un substrato ideale di crescita e il confezionamento impedisce la perdita di umidità. L'analisi della popolazione microbica relativa ad un ambiente di produzione di prodotti panari ha dimostrato che le materie prime sono le principali fonti di contaminazione batterica mentre le attrezzature, le superfici di lavoro e l'aria dell'ambiente di lavoro contengono un'elevata carica di funghi (Viljoen and von Holy, 1997). E' stato stimato che un grammo di farina può contenere fino a 8000 spore fungine. In alcuni panifici un simile numero di spore si deposita su un metro quadro di superficie ogni ora (Doerry, 1990). La concentrazione di spore nell'aria è incrementata anche dallo svolgimento delle normali operazioni che avvengono durante il processo produttivo come la pesatura e la miscelazione di ingredienti.



Attualmente l'applicazione di precise norme (vedi paragrafo 1.9.1) può contribuire a ridurre l'incidenza di tali fenomeni.

Un problema connesso con la contaminazione da parte dei funghi è la possibile presenza di micotossine i cui livelli massimi ammessi nei prodotti a base di cereali sono riportati nel Regolamento (CE) N. 1881/2006. Le micotossine sono metaboliti secondari, tossici per l'uomo e gli animali, prodotti da muffe che colonizzano gli alimenti. Le micotossine più note (ocratossine, aflatossine, fumonisine, tricoteceni, zearalenone, patulina, citrinina, etc.) sono prodotte da specie dei generi *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Uno studio condotto di recente per valutare la presenza di aflatossine, ocratossina A e deossinivalenolo in materie prime e prodotti alimentari tra cui il pane ha dimostrato che i livelli di micotossine nei campioni alimentari erano al di sotto dei limiti ammessi dalla normativa Europea sebbene sono stati riscontrati valori elevati delle tre micotossine soprattutto in nocciole, biscotti e pane (Soubra *et al.*, 2009).

Molte delle alterazioni del pane che causano una modificazione dell'aroma sono associate ai lieviti. I lieviti come le muffe non sopravvivono ai processi di cottura ma le principali fonti di contaminazione sono rappresentate dagli ingredienti ricchi di zuccheri (Legan e Voysey, 1991). Ci sono principalmente due tipi di lieviti coinvolti nella alterazione del pane: i) lieviti che determinano alterazioni di tipo fermentativo, attraverso la fermentazione degli zuccheri presenti nel prodotto; ii) lieviti filamentosi, che causano la formazione di macchie bianche o rosa sulla superficie del pane. L'alterazione fermentativa si manifesta con lo sviluppo di un odore alcolico o esterico a seconda della specie del lievito coinvolto. I lieviti filamentosi più comuni sono invece *Zygosaccharomyces baillii*, *Endomyces fibuliger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii*, *Candida guilliermondii* e *Pichia burtonii*. Quest'ultima specie si sviluppa rapidamente ed è più resistente ai conservanti e disinfettanti rispetto ad altri lieviti (Legan e Voysey, 1991).

### **1.8.3 Alterazioni batteriche**

L'alterazione batterica più comune nel pane è il "pane filante" o "incordamento del pane" causata da specie del genere *Bacillus*, tra cui *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. cereus*, *B. clausii* e *B. firmus* (Collins *et al.*, 1991; Pepe *et al.*, 2003). *B. subtilis* è la specie più frequentemente associata a questo tipo di alterazione; essa contamina le cariossidi del grano e le spore termoresistenti permangono durante la macinazione e la cottura del pane. Quasi tutti gli ingredienti usati nella preparazione del pane

possono essere contaminati, ma la farina e le apparecchiature che sono state precedentemente in contatto con gli impasti contaminati sono le fonti principali. Le spore, attivate dal processo di cottura, germinano e le cellule vegetative si sviluppano entro 36-48 ore all'interno del pane e formano la caratteristica massa filante con uno sgradevole odore dovuto al rilascio di composti volatili incluso il diacetile acetoina, acetaldeide e isovaleraldeide (Legan, 1994). I batteri avviano un processo degradativo dell'amido e delle proteine del pane che porta alla formazione di esopolisaccaridi (slime). Come conseguenza delle attività proteolitica ed amilolitica si verifica un rammollimento della struttura del pane e la conseguente filatura della mollica che da origine al nome dell'alterazione detta pane filante. Le condizioni che favoriscono lo sviluppo di tale alterazione sono una conservazione a temperature superiori a 25°C, valori di pH dell'impasto superiori a 5, e una elevata concentrazione di spore ( $>10^2$  spore/g di farina).

Al fine di ridurre l'incidenza di fenomeni alterativi, in particolare per quanto riguarda le contaminazioni da parte di spore termoresistenti di batteri è necessario accertare la buona qualità delle materie prime impiegate, assicurarsi che siano raggiunte temperature idonee all'inattivazione delle spore durante le fasi di cottura del pane e soprattutto garantire la conservazione del prodotto finito in ambienti a ridotta umidità e temperatura. L'alterazione spesso si riscontra su interi lotti di produzione e se le condizioni ambientali sono favorevoli alla germinazione delle spore essa diventa visibile prima che i prodotti vengano distribuiti. Il fenomeno si verifica soprattutto nei Paesi caldi come quelli del bacino del Mediterraneo, ma è riscontrabile anche in Nazioni come l'Australia e il Sud Africa, dove il clima è caldo-umido. Un'esatta quantificazione delle perdite economiche non è facile da ottenere poiché il fenomeno è spesso confuso con le modificazioni della struttura del prodotto causate dalla scarsa cottura o mancata lievitazione dell'impasto.

### **1.9 Strategie per estendere la conservabilità dei prodotti lievitati da forno**

Il controllo e il contenimento delle contaminazioni microbiologiche dei prodotti panari deve avvenire mediante una gestione integrata delle diverse fasi della catena produttiva, con il controllo della qualità delle materie prime per prevenire il rischio di contaminazione, e con la distruzione dei contaminanti e il controllo del loro sviluppo per ridurre l'alterazione.

### **1.9.1 Sistemi di prevenzione**

Ogni impresa nel settore della panificazione deve "individuare ogni fase che potrebbe rivelarsi critica per la sicurezza degli alimenti e garantire che siano individuate, mantenute e aggiornate le opportune procedure di sicurezza avvalendosi dei principi su cui è basato il sistema HACCP". Il metodo HACCP, come definito dalle "Guidelines for the application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System", adottate dalla 20° sessione del CODEX ALIMENTARIUS, prevede la conoscenza dei punti critici delle fasi di lavorazione dei prodotti lievitati da forno al fine di prevenire la contaminazione microbica. Il controllo della qualità delle materie prime è fondamentale ai fini della sicurezza e della qualità del prodotto finale. In particolare la farina ma anche lievito di birra, additivi, ingredienti, etc. possono essere già contaminate al momento dell'utilizzo e se disperse nell'ambiente di lavorazione possono contaminare il prodotto finito. Controlli microbiologici preventivi sono indispensabili per accertare il livello di contaminazione da parte di spore e/o cellule vegetative batteriche e fungine (Viljoen e von Holy, 1997).

Al fine di ridurre l'esposizione del prodotto finito a possibili fonti di contaminazione è necessario che gli ambienti di stoccaggio delle materie prime siano delocalizzati rispetto alle aree di trasformazione e che agli stessi vengano applicate condizioni climatiche e procedure di pulizia adatte alla idonea conservazione. L'accumulo di frammenti di impasto sui macchinari e sul vestiario degli operatori che può determinarsi nella fase di miscelazione degli ingredienti, di divisione e formatura del prodotto possono rappresentare un buon substrato per la germinazione di spore fungine presenti nell'aria che contaminano il prodotto nelle fasi successive. In particolare le fasi di raffreddamento e confezionamento presentano i maggiori rischi di contaminazione in quanto condizioni ambientali non adeguate possono favorire l'aumento del contenuto di umidità del prodotto confezionato determinando condizioni favorevoli allo sviluppo di spore fungine e batteriche.

Tuttavia, le strategie poste in essere per prevenire la contaminazione microbica possono non essere sufficienti: può essere infatti necessario adottare misure tecnologiche che riducano la presenza dei contaminanti nei prodotti limitando il rischio di contaminazioni degli stessi durante la conservazione.

### 1.9.2 Conservanti chimici e loro meccanismo d'azione

Per garantire la conservabilità del pane e dei prodotti da forno vengono utilizzati conservanti chimici. La direttiva europea (Direttiva 1995/2/CE; Decreto Ministeriale n. 312, 1998) sugli additivi alimentari indica che "I conservanti sono sostanze che prolungano la shelf-life delle derrate proteggendole dal deterioramento microbiologico". I conservanti oltre ad avere un ampio spettro di azione, non devono influire negativamente sul processo di lievitazione e sulle caratteristiche organolettiche del prodotto e devono essere privi di tossicità per l'uomo. La stessa direttiva ammette l'uso nei prodotti panari di additivi chimici quali acido sorbico, propionico, lattico, acetico ed etanolo.

E' da segnalare che la Direttiva Europea ha imposto una riduzione delle concentrazioni di alcuni degli acidi organici ammessi ma studi recenti hanno dimostrato che l'utilizzo di concentrazioni sub-ottimali di tali conservanti determina un maggiore rischio di contaminazione e di alterazione del prodotto (Marin *et al.*, 2002). Inoltre nonostante le direttive sui conservanti abbiano abbassato i livelli di concentrazione ammessi per il sorbato (0,2% p/p) e per il propionato (0,3% p/p), evidenze di tossicità in animali da laboratorio accertate per il propionato hanno determinato il divieto o posto severe limitazioni all'uso di questa tipologia di conservanti in alcuni paesi dell'Unione (Pattison *et al.*, 2004).

Inoltre limitazioni derivano dagli inconvenienti determinati dall'uso di questi conservanti acidi nella tecnologia di produzione. L'acido sorbico inibisce non solo le muffe contaminanti ma può limitare lo sviluppo dei lieviti provocando una riduzione del volume del pane fermentato con *Saccharomyces cerevisiae*, alterandone la consistenza e rendendo l'impasto colloso e poco lavorabile. Anche l'utilizzo del calcio propionato può determinare una riduzione del volume della forma di pane (Legan, 1993). Infine, l'uso di acido acetico presenta l'inconveniente di conferire al prodotto un odore poco gradevole.

L'inefficacia di alcuni conservanti nel controllo della crescita fungina sul prodotto può essere determinata sia da concentrazioni sub-ottimali sia da condizioni tecnologiche che non favoriscono l'azione inibitoria (Marin *et al.*, 2002).

Il meccanismo d'azione di questi conservanti è correlato alle proprietà lipofile di queste molecole acide che consentono alla loro forma indissociata di attraversare la membrana microbica neutralizzando il gradiente elettrochimico. Inoltre l'efficacia antimicrobica di queste molecole è potenziata dall'abbassamento dei valori di pH ed è dunque in relazione al pH del prodotto o dalla presenza di altre

molecole acide (Gould, 1996). L'elemento determinante per il meccanismo d'azione di queste molecole è la loro costante di dissociazione ( $pK$ ): essa insieme al valore di pH ambientale determina la proporzione di acido in forma indissociata. I valori di  $pK$  per i più comuni acidi organici deboli utilizzati come conservanti variano da 4,19 (acido benzoico) a 4,87 (acido propionico). Pertanto a valori di pH superiori l'attività di queste molecole si riduce. L'applicazione combinata di acidi deboli e bassi valori di pH associata a procedure di confezionamento in cui vengano limitate le condizioni che consentano un'efficiente generazione di energia – ad esempio carenza di ossigeno - possono migliorare la prevenzione dello sviluppo di microrganismi nei prodotti panari.

Tuttavia, l'utilizzo di conservanti chimici oltre a determinare un controllo parziale delle alterazioni, è sempre più avversato dalla crescente consapevolezza dei consumatori che richiedono prodotti di qualità e poco manipolati. Questa tendenza spinge le industrie di concerto con la ricerca all'individuazione di sistemi antimicrobici naturali per prevenire la contaminazione del pane. A questo riguardo, l'uso del lievito naturale, di batteri lattici e/o di loro prodotti di fermentazione potrebbero essere una valida alternativa ai conservanti chimici per migliorare la conservabilità, la reologia e l'aroma di numerosi prodotti tra i quali pane e prodotti da forno.

### **1.9.3 Bioconservanti**

I bioconservanti, intesi come microrganismi (es. batteri lattici) endogeni e/o loro prodotti di fermentazione, possono essere impiegati come sistemi di conservazione naturali nella produzione di alimenti (Stiles, 1996). L'impiego di batteri lattici nei processi di panificazione è da tempo ritenuta un'ottima strategia per migliorare le caratteristiche sensoriali e di conservabilità dei prodotti panari. In particolare il controllo delle contaminazioni fungine in pani fermentati con ceppi di batteri lattici selezionati è stato dimostrato in numerosi studi (Corsetti *et al.*, 1998a, Dal Bello *et al.*, 2007, Gerez *et al.*, 2009).

Cibi fermentati vengono prodotti sin dall'antichità, ma l'importante ruolo dei microrganismi in questi processi non è stato compreso fino alla metà del 19° secolo, quando la microbiologia si è sviluppata come scienza (Caplice e Fitzgerald, 1999). Per esempio, le fermentazioni operate dai LAB sono essenziali nella produzione di formaggio, yogurt, salumi fermentati e crauti. Oggi, lo scopo primario dell'uso dei LAB nella preparazione di alcuni prodotti non è soltanto il conferimento di

caratteristiche desiderabili, come il sapore o la struttura, ma anche la conservazione dell'alimento. I batteri possono proteggere gli alimenti dal deterioramento microbico per effetto della crescita competitiva, o grazie alla produzione di metaboliti antagonisti e di altri composti antimicrobici (Schillinger *et al.*, 1996; Stiles, 1996). L'effetto di conservazione dei LAB si realizza principalmente grazie alla produzione di acido lattico, che abbassa il pH ed esercita anche una diretta azione di inibizione della crescita di molti microrganismi (Brul e Coote, 1999). Oltre alla produzione di acido lattico, i LAB producono altre sostanze antimicrobiche, come acido acetico, perossido di idrogeno, diacetile, reuterina e batteriocine, che possono avere un ruolo importante nella biopreservazione (vedi paragrafo 1.7) (Caplice e Fitzgerald, 1999; Lindgren e Dobrogosz, 1990). Inoltre l'utilizzo dei LAB come bioconservanti può coadiuvare il ruolo dei tradizionali antimicrobici consentendone una riduzione delle loro concentrazioni.

Dimostrazione dell'utilizzo di batteri lattici come bioconservanti in prodotti da forno per estendere la loro conservabilità microbiologica e in particolare per inibire lo sviluppo di funghi appartenenti ai generi *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* è stata riportata da Gerez *et al* (2009). Il pane è stato fermentato con 4 ceppi di batteri lattici – *Lactobacillus reuteri*, *L. plantarum*, 2 ceppi di *L. brevis* - selezionati per le loro capacità antifungine in saggi *in vitro*. I ceppi hanno funzionato da starter in una formulazione di impasto in presenza del lievito *Saccharomyces cerevisiae*, in comparazione con l'impasto fermentato con solo lievito. La produzione degli acidi lattico, acetico e fenilattico nell'impasto fermentato con i LAB ha espletato un ruolo nel controllo della alterazione microbica in quanto pani realizzati aggiungendo agli ingredienti le corrispondenti concentrazioni rilevate nell'impasto hanno determinato un analogo ritardo nella colonizzazione fungina. Gli autori hanno attribuito il maggior ruolo all'attività sinergica degli acidi acetico e fenilattico, in quanto l'acido lattico sebbene presente in elevata concentrazione nell'impasto fermentato con i LAB, è presente quasi completamente in forma dissociata al pH finale dell'impasto (pH 5). E' interessante notare che l'utilizzo dei LAB come bioconservanti può coadiuvare il ruolo dei tradizionali antimicrobici consentendone una riduzione delle loro concentrazioni: il pane fermentato con i LAB e lievito e addizionato con 0,2% di calcio propionato ha mostrato la stessa conservabilità microbiologica del pane fermentato con solo lievito in presenza dello 0,4% di propionato.

E' stato anche osservato in prove di panificazione in laboratorio che la combinazione di metaboliti acidi (lattico, acetico, PLA, OH-PLA) e di molecole non

identificate prodotte dal ceppo *L. plantarum* 21B è efficace come il propionato di calcio (0,3% p/p di farina) nel prevenire l'alterazione del pane filante (Valerio *et al.*, 2008). Altri interessanti risultati sono stati ottenuti dall'applicazione di un estratto acquoso di piante di fagiolo nel processo di panificazione ottenuto mediante fermentazione con *Lactobacillus brevis* AM7 (Coda *et al.*, 2008). Il ceppo è risultato in grado di produrre peptidi antifungini e l'azione combinata dell'estratto di fagiolo e della fermentazione lattica mediante *lievito naturale* ha determinato un ritardo di 21 gg della crescita fungina. Recentemente, anche l'uso di estratto idrosolubile di amaranto come ingrediente nella produzione di pane con o senza glutine fermentato con *lievito naturale* ha consentito di ritardare lo sviluppo di *Penicillium roqueforti* (Rizzello *et al.*, 2009).

**Tabella 1.1.** Specie di batteri lattici isolati da lieviti naturali (adattata da DeVuyst e Neysens, 2005).

<b>Paese</b>	<b>Materia prima</b>	<b>Batteri lattici</b>
Belgio	Grano	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. paralimentarius</i>
Francia	Grano	<i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. mesenteroides</i>
Germania	Grano	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. buchneri</i>
	Segale	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. farciminis</i> , <i>L. alimentarius</i> <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. fructivorans</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. buchneri</i>
Italia	Grano	<i>L. brevis</i> , <i>L. plantarum</i> , , <i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citreum</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>W. confusa</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. fermentum</i>
Danimarca	Segale	<i>L. reuteri</i> , <i>L. panis</i> , <i>L. amylovorus</i> <i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. fermentum</i> ,
Grecia	Grano	<i>L. sanfranciscensis</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. paralimentarius</i> , <i>W. cibaria</i> ,
Messico	Mais	<i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. alimentarius</i> , <i>L. delbrueckii</i>
Sudan	Sorgo	<i>L. fermentum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. lactis</i> , <i>E. faecalis</i>



**Tabella 1.2.** Composti antifungini isolati da batteri lattici.

<b>Composto identificato</b>	<b>Ceppo produttore</b>	<b>Riferimento bibliografico</b>
Acido 4-idrossi-fenillattico Acido 3-fenillattico	<i>Lactobacillus plantarum</i> 21B	Lavermicocca <i>et al.</i> , 2000
Acido 3-idrossidecanoico Acido 3-idrossidodecanoico Acido 3-idrossitetradecanoico Acido 3-idrossi-5-cis- dodecenoico	<i>Lactobacillus plantarum</i> MiLAB14	Sjögren <i>et al.</i> , 2003
Ciclo (Gly-Leu) Metilidantoina Mevalonolactone	<i>Lactobacillus plantarum</i> VTT E-78076	Niku-Paavola <i>et al.</i> , 1999
Acidi caproico, propionico, buturico, acetico, formico e n-valerico	<i>Lactobacillus</i> <i>sanfranciscensis</i> CB1	Corsetti <i>et al.</i> , 1998b

**Tabella 1.3.** Principali muffe del pane (adattata da Lavermicocca *et al.*, 2010)

<b>Specie</b>	<b>Diffusione<sup>(a)</sup></b>
<i>Aspergillus candidus</i>	+
<i>A. clavatus</i>	+
<i>A. flavus</i>	++
<i>A. fumigatus</i>	+
<i>A. glaucus</i>	
<i>A. niger</i>	++
<i>A. ochraceus</i>	+
<i>A. penicilloides</i>	
<i>A. restrictus</i>	
<i>A. sidowii</i>	+
<i>A. terreus</i>	
<i>A. versicolor</i>	++
<i>Emericella nidulans</i>	+
<i>Eurotium amstelodami</i>	+
<i>E. chevalieri</i>	
<i>E. repens</i>	++
<i>E. rubrum</i>	+
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	++
<i>P. brevicompactum</i>	++
<i>P. carneum</i>	+
<i>P. chrysogenum</i>	++
<i>P. citrinum</i>	+
<i>P. commune</i>	++
<i>P. corylophilum</i>	+
<i>P. crustosum</i>	++
<i>P. cyclopium</i>	++
<i>P. echinulatum</i>	+
<i>P. expansum</i>	+
<i>P. hirsutum</i>	+
<i>P. italicum</i>	+
<i>P. olsonii</i>	+
<i>P. paneum</i>	+
<i>P. polonicum</i>	+
<i>P. roqueforti</i>	++
<i>P. solitum</i>	+
<i>Cladosporium cladosporoides</i>	+
<i>Monilia sitophila</i>	++
<i>M. pusillus</i>	+
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+
<i>Geotrichum candidum</i>	+
<i>Scopulariopsis spp.</i>	+
<i>Wallemia spp.</i>	+

<sup>(a)</sup> + = presente; ++ = frequentemente ritrovata

## **PARTE SPERIMENTALE**

**2. Selezione di batteri lattici con attività antimicrobica  
da semole rimacinate di grano duro  
e applicazione dei loro prodotti di fermentazione  
come bioconservanti nel pane**

## 2.1 Introduzione

Il frumento è il cereale più coltivato nel mondo con una superficie agricola di circa 220 milioni di ettari e una produzione mondiale che si aggira intorno a 686 milioni di tonnellate (fonte FAO, 2009). L'Italia possiede la più importante filiera del frumento duro coltivato principalmente nelle regioni meridionali (Puglia, Sicilia e Basilicata), dove il clima caldo umido ne favorisce la crescita. In queste regioni il frumento duro è utilizzato sia per la produzione di pasta che per la produzione di pani tipici locali come il Pane di Altamura ottenuto dalla fermentazione di batteri lattici. Semole rimacinate di grano duro usate per la produzione del pane tipico di Altamura comprendono le varietà quali Appulo, Arcangelo, Duilio e Siveto, coltivate nei comuni di Altamura, Gravina di Puglia, Poggiorsini, Spinazzola e Minervino Murge della provincia di Bari, come indicato dal disciplinare di produzione per il pane di Altamura, riportato nella G.U. Serie generale n. 69 del 23.03.2000. Questi elementi conferiscono al pane un'elevata qualità organolettica e reologica e una prolungata conservabilità.

In genere, i batteri lattici coinvolti nelle fermentazioni dei prodotti cerealicoli originano dai cereali da cui si ottengono le farine e dai macchinari impiegati nel processo di molitura e panificazione. I microrganismi che contaminano i cereali sono generalmente concentrati negli strati esterni e tendono a rimanere nelle frazioni ricche di crusca durante la macinazione. Di conseguenza le farine ottenute dalla macinazione dovrebbero avere una carica batterica inferiore a quella delle rispettive cariossidi, ma la fase di condizionamento può portare ad un incremento del contenuto di microrganismi (Berghofer *et al.*, 2003). I batteri lattici generalmente isolati da lievito naturale includono le seguenti specie: *Lactobacillus casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. salivarius*, *L. brevis*, *L. fermentum*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus acidilactici*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus*, e alcune specie appartenenti ai generi *Leuconostoc* e *Weissella* (De Vuyst e Neysens, 2005). Durante la fermentazione spontanea i lattobacilli dominano l'ecosistema dell'impasto acido, mentre nella prima fase della fermentazione subentrano i generi *Leuconostoc* e *Weissella* (De Vuyst *et al.* 2005). La complessa ecologia microbica del lievito naturale è influenzata da diversi fattori come qualità della farina, temperatura e tempo di fermentazione, e condizioni ambientali. Tra i lattobacilli isolati dal lievito naturale è presente un'elevata variabilità inter-specifica in cui prevalgono le specie etero-fermentanti, probabilmente a causa di una migliore capacità competitiva e di adattamento (De Vuyst *et al.* 2005). Negli ultimi anni sono

stati isolati anche batteri lattici appartenenti ai generi *Lactococcus* (*L. lactis*), *Weissella* (*W. cibaria*, *W. confusa*) e *Leuconostoc* (*L. citreum* e *L. mesenteroides*) da lieviti naturali prodotti in alcune zone della Grecia e dell'Italia (De Vuyst *et al.* 2002, Corsetti *et al.* 2001, Galli *et al.* 1988).

I batteri lattici possono anche essere selezionati in base alle loro caratteristiche tecnologiche ed aggiunti all'impasto per pilotare il processo fermentativo. Questi batteri grazie ai prodotti del loro metabolismo modificano positivamente le proprietà nutrizionali e tecnologiche del pane e ne influenzano l'aroma e la conservabilità. I batteri lattici sono in grado di prolungare la shelf-life microbiologica degli alimenti grazie alla produzione di diversi metaboliti con attività antimicrobica. Tra questi i più comuni sono: gli acidi organici, acidi grassi, dipeptidi ciclici, anidride carbonica, etanolo, perossido di idrogeno, di acetile, batteriocine e antibiotici (Corsetti *et al.* 1998b, De Vuyst *et al.* 1994, Hölzel *et al.* 2000, Lavermicocca *et al.* 2000, Ström *et al.* 2002). Recentemente è stato dimostrato il ruolo rilevante degli acidi lattico, acetico, fenillattico e idrossifenillattico nell'inibizione dello sviluppo di batteri e funghi isolati da prodotti da forno (Valerio *et al.* 2008; Lavermicocca *et al.* 2000; Lavermicocca *et al.* 2003; Gerez *et al.* 2009). L'uso di metaboliti antimicrobici prodotti da batteri lattici può rappresentare un valido strumento di controllo delle contaminazioni batteriche e fungine alternativo al lievito naturale. Infatti, il lievito naturale, sebbene trovi largo impiego nelle produzioni artigianali, non viene utilizzato nelle produzioni su scala industriale per problemi legati alle difficoltà di conservazione e propagazione.

Lo studio del microbiota delle farine impiegate nella produzione di lievitati da forno può portare all'individuazione di ceppi di batteri lattici con peculiari caratteristiche biotecnologiche, tali da poter essere utilizzati per migliorare la qualità microbiologica dei prodotti. Inoltre, l'impiego di metaboliti prodotti da batteri lattici può coadiuvare il ruolo dei tradizionali antimicrobici consentendone una riduzione delle concentrazioni, soprattutto nei prodotti lievitati con lievito di birra in cui il rischio di contaminazione microbiologica è maggiore.

Lo scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di selezionare batteri lattici con peculiari caratteristiche biotecnologiche tali da poter essere utilizzati per migliorare la conservabilità microbiologica del pane. La selezione è stata condotta all'interno della comunità di batteri lattici isolata da semole rimacinate di grano duro sulla base delle proprietà antimicrobiche. Gli isolati sono stati successivamente

caratterizzati mediante tecniche di biologia molecolare basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR).

## **2.2 Materiali e Metodi**

### **2.2.1 Campioni di semola**

Sono stati esaminati 30 campioni di semola rimacinata di grano duro (Tabella 2.1). Le semole derivano da 6 varietà di grano duro (Appulo, Simeto, Duilio, Arcangelo, Ciccio e Svevo) coltivate in provincia di Bari (zone di Minervino, Spinazzola e Gravina) e provenienti dallo stesso molino. I grani di ciascuna varietà, prima di essere macinati, sono stati sottoposti a due tipi di condizionamento: breve (7 - 8 ore) e lungo (15 -16 ore). Inoltre sono state preparate 12 miscele (rapporto 1:1). Dalle cariossidi delle varietà Svevo, Ciccio e Appulo sono stati ottenuti campioni di semola integrale, anch'essi sottoposti ai due diversi tipi di condizionamento.

### **2.2.2 Analisi microbiologiche**

Venti grammi di ciascun campione di semola sono stati diluiti in 180 ml di una soluzione sterile di Bacto-peptone (Difco Laboratory Inc, Detroit, MI, USA) 0,1% (p/vol) e omogeneizzati per 2 min mediante Stomacher Lab-Blender 400 (PBI International Milano, Italia). Da questa sospensione sono state preparate diluizioni seriali decimali in NaCl 0,85% (p/vol) - Tween 80 0,25% (vol/vol). Sono stati impiegati i seguenti substrati di crescita: Plate Count agar (PCA, Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) per valutare la carica batterica mesofila totale, e Sourdough Bacteria (SDB) agar (Kline *et al.*, 1971) per la conta di batteri lattici presunti. Allo scopo di isolare un sufficiente numero di colonie, sono stati inoculati in piastra 1 ml della diluizione  $10^0$  (per inclusione) e 100  $\mu$ l delle diluizioni  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$  (per piastramento). Le piastre sono state incubate in un termostato a 30°C per 48 h. Da ciascun campione di semola esaminato, sono state prelevate in modo casuale 10-20% delle colonie totali (LAB presunti) da piastre contabili di SDB. Batteri Gram-positivi, catalasi negativi (LAB) sono stati coltivati in SDB agar a 30°C per 48 h e strisciati nuovamente su SDB agar. Tutti gli isolati considerati per le successive analisi sono stati conservati a -80°C in SDB brodo contenente glicerolo al 20% (vol/vol).

### **2.2.3 Amplificazione mediante rep-PCR**

Il DNA genomico è stato estratto da 1,5 ml di coltura inoculata in MRS (Oxoid) ed incubata per 18 h a 30°C. L'estrazione è stata eseguita utilizzando il kit della Whatman (Clonsaver Card Starter Kit) e seguendo il protocollo allegato. Il DNA



genomico è stato amplificato utilizzando due oligonucleotidi REP-1R-Dt (5'-IIINCGNCGNCATNGGC-3') e REP-2R-Dt (5'- NCGNCTTATCNGGCCTAC-3') in cui la lettera N può indicare le basi A, T, C o G, mentre I corrisponde alla base inosina (Hyytia-Trees *et al.*, 1999; Versalovic *et al.*, 1991).

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume di 25 µl contenenti 23 µl di MegaMix (Microzone Ltd., United Kingdom), 2 µM di ciascun oligonucleotide e 1µl di DNA genomico. Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer-Applied Biosystems) programmato come segue: 95°C per 7 min, 35 cicli di 30 sec a 90°C, 1 min a 40°C, 8 min a 65 °C seguiti da 16 min a 65°C. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi a 80V per 3 h su gel al 1,5 % (p/vol) di agarosio in tampone TAE 1 x colorato con etidio bromuro (0,5 µg/ml). Come indicatore delle dimensioni dei frammenti di DNA è stato impiegato il GelPilot 200 bp ladder (Qiagen GmbH, Hilden, Germany).

I profili elettroforetici sono stati analizzati utilizzando il software Quantity One (Bio-Rad Laboratories). La riproducibilità dei profili è stata verificata ripetendo le analisi due volte. In ciascun isolato è stata valutata la presenza/assenza (1/0) di tutte le bande ottenute nell'intera popolazione batterica analizzata. La matrice binaria ottenuta è stata analizzata con il software BioNumerics v. 5.0 (Applied Maths), usando il coefficiente di similarità genetica di Dice ( $S_D$ ) e l'algoritmo UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) per l'ottenimento del dendrogramma.

#### **2.2.4 Identificazione genetica mediante sequenziamento del gene 16S - rRNA**

Gli isolati rappresentativi di ciascun profilo rep-PCR sono stati identificati mediante analisi delle sequenze del 16S rRNA. Il DNA genomico, estratto come descritto precedentemente è stato amplificato con gli oligonucleotidi universali P0 e P6 (Tabella 2.2) (Di Cello *et al.*, 1997). In un volume finale di 50 µl, sono stati aggiunti: 5 µl del tampone 10 x HotMaster™ Taq Buffer con  $Mg^{2+}$  (2,5 mM), 0,2 mM dNTP Mix, 1,25 U HotMaster™ Taq DNA Polymerase (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 0,3 µM di ciascun oligonucleotide e 1 µl di DNA totale. La reazione di amplificazione è avvenuta secondo il seguente protocollo "touch-down" (Di Cello *et al.* 1997): 94°C per 2 min, 35 cicli di 30 sec a 94°C, 30 sec a 60°C per i primi 5 cicli, 55°C per i successivi 5 cicli e 50 °C per gli ultimi 25 cicli, 4 min a 68 °C seguiti da 10

min a 68°C. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel all'1% (p/vol) di agarosio (Shelton Scientific) utilizzando il tampone TAE. Come indicatore delle dimensioni dei frammenti di DNA è stato usato il marker Gel Pilot 100 bp Plus Ladder (Qiagen). I prodotti di PCR sono stati purificati con il QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e poi quantificati tramite uno spettrofotometro ND 1000 (NanoDrop Technologies).

I prodotti di PCR del 16S rRNA sono stati sequenziati impiegando gli oligonucleotidi riportati in Tabella 2.2 ed utilizzando il BigDye™ Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Le reazioni di sequenza sono state condotte in un volume di 5 µl contenenti circa 15 ng di DNA purificato, l'oligonucleotide alla concentrazione 0,16 µM, 1 µl del tampone e 1 µl di mix del suddetto kit. La reazione di sequenza è stata eseguita in un termociclatore GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer-Applied Biosystems) programmato come segue: 25 cicli di 10 secondi a 96°C, 5 secondi a 50°C, 4 minuti a 60°C. I prodotti di reazione sono stati purificati utilizzando colonnine di Sephadex (5% p/vol, Sigma) ed analizzati con un sequenziatore automatico ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Le sequenze del gene 16S rRNA sono state confrontate con le sequenze depositate in banca dati (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) usando il programma BLAST N.

### **2.2.5 Identificazione molecolare di *Lactobacillus plantarum***

Per distinguere le specie *L. plantarum* e *L. pentosus* è stata condotta un'ulteriore analisi basata sul metodo proposto da Torriani *et al.* (2001). Tre inneschi pREV/planF/pentF sono stati usati per amplificare un frammento del gene *recA*. Venticinque microlitri della miscela di PCR contenevano 2,5 µl del tampone 10 x HotMaster™ Taq Buffer con Mg<sup>2+</sup> (2,5 mM), 0,2 mM dNTP Mix, 1,25 U HotMaster™ Taq DNA Polymerase (Eppendorf AG, Hamburg, Germany), 0,25 µM degli inneschi pREV e pentF, 0,12 µM dell'innesco planF e 1 µl di DNA totale rispettivamente dei ceppi C21-41, *L. pentosus* ATCC 8041, *L. plantarum* ATCC 10012. Il ciclo di amplificazione consisteva in: 94°C per 3 min, 30 cicli di 30 sec a 94°C, 10 sec a 56°C, 30 sec a 68 °C, seguiti da 5 min a 68°C. I frammenti amplificati sono stati visualizzati su gel di agarosio al 2% (p/vol) in presenza di uno standard (GelPilot 50 bp ladder Qiagen).

### **2.2.6 Prodotti di fermentazione (PF) dei batteri lattici**

I prodotti di fermentazione (PF) di 17 ceppi rappresentativi di ciascun profilo rep-PCR sono stati ottenuti come riportato in Valerio *et al.* (2008). Brevemente, 15 ml di un substrato di crescita a base di farina (Wheat Flour Hydrolysate – WHF) sono stati inoculati (0,2% vol/vol) con una precoltura di ogni ceppo in MRS (24h, 30 °C). Dopo incubazione per 72h a 30°C le cellule sono state allontanate mediante centrifugazione (10.000 rpm per 10 min a 4°C) e fil trazione (0,22 µm, Millipore).

### **2.2.7 Composti chimici**

Acido-DL-3-fenillattico (PLA), acido DL-p-idrossi-fenillattico (OH-PLA) e calcio propionato sono stati forniti da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA), acid lattico da Carlo Erba (Milan, Italy) e acid acetico da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Metanolo (HPLC grade), etile acetate, acido formico 88% (p/vol) e Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro sono stati forniti da Mallinckrodt Baker. Acqua ultra-pura è stata prodotta utilizzando il sistema Millipore Milli-Q (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). Anidride trifluoroacetica (TFA) 99% (p/vol) è stata fornita da Pierce Chemical Company (Rockford, IL, USA).

### **2.2.8 Determinazione della produzione di acidi organici nei prodotti di fermentazione**

La produzione degli acidi lattico, acetico, formico e citrico è stata valutata mediante un metodo enzimatico (Roche-Diagnostic-Mannheim, Basilea, Svizzera).

La produzione di acido fenillattico (PLA) e acido idrossi-fenillattico (OH-PLA) è stata analizzata mediante cromatografia liquida come descritto da Valerio *et al.* (2008) con alcune modifiche. In breve, 5 ml di ciascun PF sono stati acidificati a pH 2,0 con acido formico 10 M e sottoposti 4 volte a estrazione liquido-liquido con 15 ml di etile acetato. La fase organica è stata raccolta, disidratata con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e portata a secco (Büchi, Flawil, Svizzera). Il residuo secco è stato risospeso in acqua e 100 µl della soluzione filtrata (0,22 µm, Millipore) sono stati iniettati in un sistema di cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC, AKTA Basic 10, P-900 series pump, Amersham Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Per la separazione è stata utilizzata una colonna Luna Phenyl Hexyl (150×4,6 mm, 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) dotata di filtro precolonna (C18, 4,0×3,0 mm) (Phenomenex). La fase mobile era costituita da una miscela del solvente A (metanolo – 0,05% TFA) e del solvente B (acqua – 0,05% TFA). L'analisi è stata condotta con variazione

lineare del gradiente del solvente A dal 10% al 30% in 16 min, seguita da un'eluizione isocratica al 30% di A per 5 min., e infine da una variazione lineare del gradiente del solvente A dal 30% al 60% in 6 min. con una velocità di flusso di 1 ml/min. Il cromatografo è dotato di rivelatore UV a tre canali (Amersham Biosciences 900, Uppsala, Sweden) che ha consentito di misurare contemporaneamente PLA (210 nm) e OH-PLA (220 nm). I limiti di quantificazione per PLA e OH-PLA sono 1,49 e 0,27 µg. Le quantità di PLA e OH-PLA sono state calcolate integrando i picchi cromatografici in funzione delle curve di calibrazione ottenute con soluzioni standard dei composti puri.

### **2.2.9 Attività antifungina *in vitro* dei prodotti di fermentazione**

L'attività antifungina dei PF è stata valutata su due muffe, *Aspergillus niger* ITEM 5132, *Penicillium roqueforti* IBT 18687, e un lievito, *Endomyces fibuliger* IBT 605, isolati da prodotti da forno. I microrganismi ITEM provengono dalla collezione dell'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari CNR di Bari e quelli IBT dalla collezione dell'Università Tecnologica della Danimarca (IBT).

*Preparazione dell'inoculo di spore fungine.* I tre ceppi sono stati inoculati su Potato Dextrose Agar (PDA, Difco) e le piastre incubate per 7 giorni a 25°C. Le spore fungine e le cellule del lievito sono state sospese in Triton X-100 0,05% (vol/vol), la sospensione è stata centrifugata due volte (10.000 rpm per 7 min.) e il pellet è stato risospeso in 100 µl di acqua sterile. Un'aliquota di 50 µl della sospensione è stata inoculata mediante piastramento su PDA. Dopo incubazione delle piastre a 25 °C per 3 giorni le spore o le cellule sono state sospese in Triton-X-100 0,05% (vol/vol). La concentrazione delle sospensioni è stata determinata con un emocitometro (cella di Thoma) e portata al valore di  $5 \times 10^4$  spore o cellule per ml.

*Saggio di attività antifungina.* L'attività antifungina dei prodotti di fermentazione è stata determinata mediante il saggio in piastre a 96 pozzetti descritto da Lavermicocca *et al.* (2003). In breve, 10 µl della sospensione di spore (muffe) o di cellule (lievito) ( $5 \times 10^2$ ) sono stati aggiunti in triplicato a 190 µl di PF (PF<sub>i</sub>) o di substrato WHF (WHF<sub>i</sub>) contenente o no propionato di calcio 0,3% (p/vol). Sono stati allestiti in triplicato i controlli non inoculati contenenti 190 µl di PF o substrato WHF + 10 µl di Triton-X-100 0,05% (vol/vol) (PF<sub>ni</sub> o WHF<sub>ni</sub>, rispettivamente). Le piastre sono state incubate per 96 h in una camera umida a 25 °C. La crescita fungina è stata monitorata ogni 24 h per 4 giorni mediante lettura spettrofotometrica (Labsystem, Multiskan MS, Version 3.0, tipo 352) a 580 nm

(DO<sub>580 nm</sub>). E' stata quindi calcolata l'inibizione percentuale della crescita fungina ad opera dei PF in rapporto alla crescita fungina nel substrato WHF (WHF<sub>i</sub>) secondo la seguente formula:

$$\text{Inibizione\%} = 100 - [\text{DO}(\text{PF}_i) - \text{DO}(\text{PF}_{ni})] \times 100 / [\text{DO}(\text{WHF}_i) - \text{DO}(\text{WHF}_{ni})]$$

Gli esperimenti sono stati ripetuti tre volte.

### **2.2.10 Inibizione di *Bacillus subtilis***

L'attività antibatterica dei PF è stata valutata contro il ceppo *Bacillus subtilis* ATCC 8473 isolato da pane filante.

*Preparazione dell'inoculo di spore batteriche.* Le spore di *B. subtilis* ATCC 8473 sono state prelevate da una coltura di 6 giorni a 30 °C su Starch Agar (SA, Difco) e risospese in tampone fosfato (50 mM pH 7,0). Dopo trattamento termico a 90 °C per 20 min la sospensione contenente cellule e spore è stata raffreddata in bagno di ghiaccio. Le spore sono state raccolte per centrifugazione (10000 rpm per 7 min a 20°C) e risospese in tampone fosfato (50 mM pH 7,0) alla concentrazione finale di a 10<sup>6</sup> spore/ml. Il numero di spore è stato determinato mediante cella Thoma (Ehartnack, Germany).

*Saggio di attività in vitro.* Dieci µl di ogni PF sono stati depositi sulla superficie di piastre di SA (7 ml), lasciati adsorbire e ricoperti con 3 ml di soft-agar 0,7% (p/vol) inoculato con 100 µl di una sospensione contenente 10<sup>6</sup> spore/ml. Le piastre sono state incubate a 30°C. Dopo 24 h di incubazione l'alone di inibizione è stato misurato in unità arbitrarie di attività (UA) per ml. Una unità arbitraria corrisponde alla quantità della frazione attiva del PF nei 10 µl della diluizione più alta che inibisce la crescita batterica.

### **2.2.11 Stabilità chimico-fisica dei PF**

I prodotti di fermentazione risultati più attivi sono stati sottoposti a trattamenti termici, con enzimi proteolitici e variazione di pH.

*Digestione enzimatica con proteinasi K e tripsina.* Il pH dei prodotti di fermentazione è stato portato al valore 7,0 con l'aggiunta di NaOH 2M. A 900 µl di ciascun PF sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione 1 mg/ml di proteinasi K (Sigma) o tripsina (Sigma) in tampone fosfato (pH 7,0, 20 mM) o 100 µl di solo tampone (controlli). Le soluzioni sono state incubate per 1 h a 37°C, raffreddate in bagno di ghiaccio, riportate al valore originario di pH e infine sterilizzate mediante filtrazione (0,22 µm).

*Digestione enzimatica con pepsina.* Il pH dei prodotti di fermentazione è stato portato al valore 2,0 con l'aggiunta di HCl 3M. A 900 µl di ciascun PF sono stati aggiunti 100 µl di una soluzione 1 mg/ml di pepsina (pH 2,0) in acqua o 100 µl di acqua (controllo). Le soluzioni sono state incubate a 37°C per 1h, raffreddate in bagno di ghiaccio, riportate al valore originario di pH e sterilizzate mediante filtrazione (0,22 µm).

*Trattamento termico.* 500 µl di ciascun PF sono stati esposti alla temperatura di 100°C per 60 min.

*Variazione del pH.* I PF sono stati portati a pH 4,0, 5,0, 6,0, e 7,0 con NaOH 2M e dopo incubazione per 1 h a temperatura ambiente il pH è stato riportato ai valori iniziali con HCl 3M.

L'attività inibitoria dei PF sottoposti ai trattamenti chimico-fisici è stata valutata contro *A. niger*, *P. roqueforti* e *E. fibuliger* e *B. subtilis* secondo i metodi sopra riportati.

### **2.2.12 Prove di panificazione in laboratorio**

Sono state condotte prove di panificazione in laboratorio utilizzando i prodotti di fermentazione selezionati dagli esperimenti *in vitro*. Il pane è stato preparato con i seguenti ingredienti: farina 350 g, sale 5 g, zucchero 5 g, olio 5 g, lievito 10 g. A questi ingredienti sono stati aggiunti 210 ml del PF (tesi 1) o 210 ml di acqua con propionato di calcio (0,3% p/p di farina) (controllo 1) o 210 ml di acqua (controllo 2). Il pane è stato preparato utilizzando una Home breadmaker tipo 1936 (Princess Household Appliances BV, Breda, The Netherlands). Dopo la cottura il pane è stato inoculato con *A. niger* ITEM 5132 mediante nebulizzazione di una sospensione di spore ( $10^3$  conidi/ml) sulla superficie, lasciato asciugare e conservato in buste di polietilene a 25°C. Lo sviluppo fungino sul pane è stato valutato quotidianamente mediante analisi visiva fino alla comparsa del sintomo.

### **2.2.13 Analisi statistiche**

Tutti i dati microbiologici e le concentrazioni degli acidi organici sono stati analizzati mediante t-test di Student, analisi della varianza (ANOVA) a una via seguita da test di Fisher con livello di significatività a  $P < 0,05$ . Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software STATISTICA 6.0 (StatSoft software package, Tulsa, OK).

## **2.3 Risultati**

### **2.3.1 Isolamento di batteri lattici**

Nella tabella 2.3 sono riportati i risultati ottenuti dall'analisi microbiologica condotta sui 30 campioni di semola rimacinata di grano duro. Il numero di batteri mesofili complessivamente presenti è stato stimato sul substrato PCA ed è risultato essere compreso tra  $1 \times 10^2$  e  $4 \times 10^4$  ufc/g, mentre la conta su SDB di batteri lattici (LAB) presunti è risultata essere compresa tra  $3,4 \times 10^1$  e  $4,3 \times 10^4$  ufc/g. In particolare, la semola della varietà Duilio (C4) sottoposta a condizionamento lungo e la semola della varietà Ciccio (C27) sottoposta a condizionamento lungo hanno presentato i valori di carica batterica mesofila e lattica rispettivamente più alti ( $4 \times 10^4$  ufc/g) e più bassi ( $10^2$  ufc/g). Dall'analisi delle semole è stato osservato che i campioni sottoposti a condizionamento lungo (C1, C2, C3, C21) mostravano un numero di LAB presunti e una carica batterica mesofila totale più elevata rispetto ai corrispondenti campioni sottoposti a condizionamento breve (C6, C5, C7, C22). Nelle semole integrali la carica batterica mesofila totale è risultata maggiore nei campioni sottoposti a condizionamento breve (C43, C44, C45) rispetto ai corrispondenti campioni sottoposti a condizionamento lungo (C46, C47, C48). I valori di ufc/g su SDB e PCA delle miscele hanno confermato il dato rilevato nelle singole varietà ad eccezione della miscela Simeto/Duilio (C18, C9) e Simeto/Appulo (C20, C10). Infatti, nella miscela Simeto/Duilio i valori di ufc/g sono risultati più elevati sia su SDB che su PCA nel campione condizionato per un tempo breve (C18) rispetto ai corrispondenti valori trovati nel campione a condizionamento lungo (C9). Nella miscela Simeto/Appulo solo il numero di ufc/g dei batteri lattici presunti è risultato più elevato nel condizionamento breve (C20).

Le colonie isolate da SDB sono state sottoposte al test della catalasi e al test con idrossido di potassio al fine di individuare i batteri lattici. Sono state ottenute 125 colonie negative a entrambi i test (Tabella 2.3) e isolate complessivamente da 12 campioni di semola. In particolare, i campioni delle varietà Appulo, Simeto e Duilio sottoposti a condizionamento lungo e il campione Svevo integrale sottoposto a condizionamento breve hanno dato il maggior numero di colonie.

### **2.3.2 Caratterizzazione e identificazione dei batteri lattici**

L'amplificazione mediante rep-PCR del DNA totale estratto dalle 125 colonie batteriche ha prodotto 39 bande polimorfiche distribuite all'interno dei diversi

amplificati visualizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio (2% p/vol). L'analisi delle bande ha portato all'individuazione di 17 diversi profili elettroforetici, associabili ad un numero di isolati compreso fra 1 e 18, caratterizzati da un insieme di frammenti di numero e dimensioni diverse tale da fornire una "impronta digitale" caratteristica per ciascun profilo.

Poiché gli isolati aventi un profilo elettroforetico uguale sono considerati cloni di uno stesso individuo, per identificare le specie è stato amplificato il gene 16S rRNA di un solo isolato per profilo. L'amplificazione ha prodotto un frammento di circa 1400 bp la cui sequenza è stata confrontata con quelle presenti in banca dati. Le sequenze ottenute hanno mostrato il 99-100% d'identità con quelle disponibili in banca dati permettendo così l'identificazione delle seguenti specie batteriche: *Weissella cibaria*, *W. confusa*, *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rossiae*, *L. plantarum*/*L. pentosus*.

Il confronto della sequenza del gene 16S rRNA del ceppo C21-41 con quelle depositate in banca dati non ha permesso l'identificazione univoca della specie, in quanto il frammento amplificato è risultato avere un'identità del 100% sia con *L. plantarum* che con *L. pentosus*, è stata quindi eseguita un'ulteriore indagine al fine di ottenere l'identificazione esatta del ceppo. La Figura 2.1 mostra l'amplificazione del DNA totale del ceppo C21-41 con la miscela dei tre oligonucleotidi disegnati sulla sequenza del gene *recA*, che ha prodotto un frammento di 318 bp corrispondente alla specie *L. plantarum*. Successivamente i 17 profili sono stati analizzati utilizzando il coefficiente di similarità Dice ( $S_D$ ) e l'algoritmo UPGMA, ottenendo così il dendrogramma riportato in Figura 2.2. L'identificazione delle specie a cui appartengono gli isolati caratterizzati dai 17 diversi profili rep che compongono il dendrogramma di similarità ha messo in evidenza come otto dei 17 diversi profili (I-P, Figura 2.2) sono associati a isolati di *W. cibaria*. Essi sono raggruppati con un livello del coefficiente di similarità circa del 50% e sono chiaramente distinti dagli isolati di *W. confusa* (C, D e E) che si raggruppano tra loro ad un livello di similarità circa del 55%. Il gruppo di *W. cibaria* è unito a *L. mesenteroides* (Q) e a *L. citreum* (G) e *L. rossiae* (H) a un livello del coefficiente di similarità di circa il 46% e il 30%, rispettivamente. *L. plantarum* e *L. lactis* (profili A, B, F) sulla base dei loro profili sono raggruppati con *W. confusa*. Il confronto dei risultati ottenuti mediante rep-PCR insieme all'analisi delle sequenze hanno dimostrato che i batteri lattici isolati più frequentemente dalle semole analizzate appartengono al genere *Weissella*. Infatti *W. confusa* e *W. cibaria* sono state entrambe isolate da sei differenti campioni,



mentre isolati appartenenti al genere *Leuconostoc* sono stati isolati da tre campioni e il genere *Lactobacillus* è stato trovato solo in due campioni. Inoltre, è da rilevare che gli isolati di *W. cibaria* e *W. confusa* presentano una maggiore diversità genetica poiché differenziati rispettivamente da 8 e 3 profili rep.

### 2.3.3 Attività antifungina

Un ceppo rappresentativo di ciascuno dei 17 profili ottenuti con la rep-PCR è stato selezionato per valutarne l'attività antifungina. Come riportato nella Tabella 2.4, i prodotti di fermentazione di *W. cibaria* (C21-4, C43-11 e C4-21), *W. confusa* (C5-7), *L. citreum* (C2-27), *L. mesenteroides* (C43-2M), *L. plantarum* (C21-41) e *L. rossiae* (C21-11), hanno inibito più del 90% la crescita del lievito *E. fibuliger*. Per quanto riguarda *P. roqueforti*, quasi tutti i 17 prodotti di fermentazione sono stati in grado di ridurre la crescita più del 65%. In particolare il ceppo *L. plantarum* C21-41 è stato il più attivo (91,48%), mentre i prodotti di fermentazione ottenuti dai ceppi C4-17 (*W. confusa*) e C9-6 (*L. lactis*) sono risultati i meno attivi (circa 39 % di inibizione). Infine *A. niger* è stato inibito quasi completamente (>98%) dai prodotti di fermentazione di tre ceppi: *L. citreum* C2-27, *W. cibaria* C21-4 e *L. rossiae* C21-11, la cui attività è risultata essere superiore a quella del propionato di calcio ( $P < 0,05$ ). In questo sistema di saggio il propionato di calcio è stato efficace nell'inibire lo sviluppo dei due funghi *A. niger* e *P. roqueforti*, mentre è risultato poco attivo verso il lievito *E. fibuliger*. Lo sviluppo di *P. roqueforti* è stato inibito da 10 PF (*W. cibaria* C2-32, C4-21, C21-4 e C43-11, *W. confusa* C5-7, *L. lactis* C5-6, *L. citreum* C2-27, *L. mesenteroides* C43-2M, *L. plantarum* C21-41 e *L. rossiae* C21-11) nella stessa misura del propionato ( $P > 0,05$ ).

*E. fibuliger* è stato inibito solo dai PF di *W. cibaria* C3-4 e *W. confusa* C3-7 in misura uguale al propionato di calcio ( $P > 0,05$ ) mentre gli altri prodotti di fermentazione, ad eccezione di quello ottenuto da C4-17, sono stati molto più efficaci ( $P < 0,05$ ). Dal confronto delle percentuali di inibizione dei tre funghi (Tabella 2.4) sono stati selezionati tre prodotti di fermentazione - *L. citreum* (C2-27), *W. cibaria* (C21-4) e *L. rossiae* (C21-11) - con spiccata attività inibente.

### 2.3.4 Inibizione della germinazione delle spore di *B. subtilis* ATCC 8473

Le proprietà inibitorie dei 17 PF sono state valutate anche nei confronti di *B. subtilis* ATCC 8473. Sono stati selezionati i prodotti di fermentazione di quattro ceppi - *L. plantarum* C21-41, *L. lactis* C9-6, *L. citreum* C2-27 e *W. cibaria* C2-5 - che hanno

mostrato un'attività di ca. 200 UAm<sup>l</sup><sup>-1</sup>. Per meglio quantificare l'attività i prodotti di fermentazione sono stati concentrati 10 volte; il prodotto di fermentazione concentrato del ceppo C21-41 ha mostrato l'attività più alta, pari a 1600 UA ml<sup>-1</sup>, rispetto agli altri tre (400 UAm<sup>l</sup><sup>-1</sup>).

### **2.3.5 Effetto della temperatura, del pH e degli enzimi proteolitici**

I prodotti di fermentazione attivi verso i funghi (C21-4, C21-11, C2-27) e verso *B. subtilis* (C21-41, C9-6, C2-27, C2-5) sono stati sottoposti ad ulteriori indagini al fine di poter chiarire la natura dei metaboliti responsabili dell'attività antifungina e antibatterica. L'attività dei PF non è stata modificata dopo trattamento termico e con enzimi proteolitici indicando una natura non proteica delle sostanze coinvolte nell'attività. Quando invece il valore di pH dei PF è stato modificato a pH 4, 5, 6 e 7, l'attività dei prodotti di fermentazione è stata gradualmente ridotta ripristinandosi solo dopo aver riportato il pH ai valori di partenza.

### **2.3.6 Produzione degli acidi organici nei prodotti di fermentazione**

I prodotti di fermentazione dei 17 ceppi dei batteri lattici isolati sono stati analizzati per valutare la presenza di alcuni acidi organici (Tabella 2.5). Tutti i PF mostravano valori di pH compresi tra 3,04 e 4,05 e contenevano concentrazioni di acido lattico comprese tra 13,27 mM e 39,29 mM. L'acido acetico è stato prodotto da 14 ceppi a concentrazioni comprese tra 9,22 e 14,70 mM. Le concentrazioni di acido formico, citrico, PLA e OH-PLA sono state in generale di scarsa entità (< 0,35 mM e 0,14 mM, rispettivamente per l'acido formico e l'acido citrico e al di sotto della quantità presente nel WHF per PLA e OH-PLA).

In particolare, il ceppo *L. plantarum* C21-41 ha prodotto le più alte quantità di acido lattico ( $P < 0,05$ ), mentre il ceppo *L. citreum* C2-27 ha prodotto le più alte concentrazioni di acido acetico ( $P < 0,05$ ) (Tabella 2.5).

### **2.3.7 Relazione tra attività antifungina e acidi organici**

Al fine di confermare la relazione tra l'attività antifungina e la produzione di acidi lattico e acetico è stato valutato l'effetto di una miscela di acido acetico e lattico alle stesse concentrazioni presenti in alcuni dei prodotti di fermentazione attivi (*L. citreum* C2-27, *W. cibaria* C21-4 e *L. rossiae* C21-11). In particolare è stato saggiato l'acido lattico alle concentrazioni di 29 mM, 17 mM e 13 mM, l'acido acetico alle concentrazioni di 15 mM e 12 mM, ed infine due miscele di acido lattico e acido

acetico alle concentrazioni rispettivamente di 29 e 15 mM, e di 17 e 12 mM. Poiché le concentrazioni degli acidi lattico e acetico prodotte da *L. citreum* (C2-27), *W. cibaria* (C21-4) e *L. rossiae* (C21-11) sono risultate tra loro paragonabili ( $P>0,05$ ) è stato valutata la capacità inibitoria di soluzioni pure di acido lattico e acido acetico e di una miscela dei due acidi in WHF alle concentrazioni presenti in uno dei prodotti di fermentazione (C21-11). I risultati ottenuti hanno dimostrato che la miscela (pH 3,5) inibiva lo sviluppo di *A. niger*, *P. roqueforti* ed *E. fibuliger* rispettivamente al  $99,97\pm 0,04\%$ ,  $75,55\pm 6,25\%$  e  $97,44\pm 3,62\%$ , valori paragonabili ( $P>0,05$ ) a quelli ottenuti con il prodotto di fermentazione C21-11.

### **2.3.6 Prove di panificazione in laboratorio**

Al fine di valutare la capacità dei prodotti di fermentazione di inibire e/o ridurre lo sviluppo fungino direttamente sul pane sono stati applicati i PF di *L. citreum* C2-27 e *L. rossiae* C21-11 in prove di panificazione in laboratorio. I risultati ottenuti hanno confermato l'attività antifungina del prodotto di fermentazione del ceppo *L. citreum* C2-27 (Figura 2.3) poiché è stato registrato un ritardo di 1 giorno nello sviluppo fungino (*A. niger*) sulla superficie del pane preparato con il PF di C2-27. Una riduzione dell'intensità dell'alterazione è stata invece osservata nel pane con il PF di C21-11. L'uso dei prodotti di fermentazione in sostituzione dell'acqua nell'impasto non ha alterato l'aspetto del pane.

## 2.4 Discussione

La prevenzione e il controllo delle contaminazioni microbiologiche dei prodotti da forno rappresentano problematiche attuali soprattutto per la richiesta da parte dei consumatori di alimenti poco trattati e privi di conservanti. Una delle strategie innovative impiegate per prolungare la conservabilità di prodotti da forno è l'utilizzo di bioconservanti intesi come microrganismi endogeni e/o loro prodotti di fermentazione. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare nuovi ceppi di batteri lattici in grado di inibire i microrganismi maggiormente responsabili di alterazioni dei prodotti panari, quali *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *Penicillium roqueforti* e *Endomyces fibuliger*, e di utilizzare i loro prodotti di fermentazione come bioconservanti. A tal fine, sono stati analizzati 30 campioni di semole rimacinate di grano duro provenienti da alcune zone della Puglia e normalmente utilizzate nella produzione del pane tipico di Altamura, per isolare batteri lattici naturalmente presenti in questo ecosistema.

L'analisi microbiologica delle semole ha evidenziato che, ad eccezione dei campioni C9, C10, C27 C46 e C47, il maggior numero di batteri lattici (60%) è stato isolato da semole sottoposte a condizionamento lungo: in particolare, 75 dei 125 batteri lattici isolati provengono da campioni sottoposti a condizionamento lungo. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato da Berghofer *et al.* (2003), i quali hanno osservato un aumento nella carica microbica mesofila aerobia nel grano sottoposto a condizionamento. Questo dato può essere spiegato considerando che tempi di esposizione all'acqua (idratazione) più lunghi provocano un maggior aumento del contenuto di umidità dei grani, favorendo quindi lo sviluppo dei microrganismi. Inoltre, durante il condizionamento è favorita anche la colonizzazione del grano da parte di microrganismi presenti come contaminanti sui macchinari. Questa ipotesi trova riscontro nei dati riportati da Corsetti *et al.* (2007), i quali hanno osservato una maggiore concentrazione di batteri lattici nei campioni di semola, rispetto a quelli di grano duro.

La caratterizzazione ed identificazione molecolare dei batteri lattici isolati hanno evidenziato che i batteri appartenenti al genere *Weissella* sono i più rappresentativi sia per numero di isolati ottenuti sia per diffusione tra campioni esaminati. Infatti, le due specie appartenenti a questo genere, *W. cibaria* e *W. confusa*, sono state isolate da 9 dei 12 campioni di semole in cui è stata evidenziata la presenza di batteri lattici. Insieme alle specie *W. cibaria* e *W. confusa*, sono stati isolati anche *Lactobacillus plantarum*, *L. rossiae*, *Leuconostoc citreum*, *L.*

*mesenteroides* e *Lactococcus lactis*. Le specie isolate sono rappresentative della microflora lattica normalmente presente nel lievito naturale (De Vuyst *et al.* 2005, De Vuyst *et al.* 2002, Scheirlinck *et al.* 2007). In particolare, *L. plantarum*, *L. citreum*, *L. lactis* e *W. confusa* sono stati isolati da lieviti naturali ottenuti da semole di grano duro provenienti da diverse province della Puglia (Corsetti *et al.* 2001). Inoltre è stato di recente osservato che *L. plantarum* è la specie dominante nel lievito naturale utilizzato nella produzione del pane di Altamura (Ricciardi *et al.* 2005). Nei campioni di semola analizzati non sono state identificate le specie che dominano i processi fermentativi del lievito naturale, come ad esempio *L. alimentarius*, *L. brevis*, *L. fermentum*. Ciò potrebbe essere attribuito al fatto che queste specie sono presenti in forma dormiente e quindi non sono isolabili con tecniche colturali (Corsetti *et al.* 2007).

Lo studio dei diversi genotipi condotto mediante la tecnica molecolare di rep-PCR ha evidenziato la presenza di una discreta variabilità individuale all'interno del genere *Weissella*. Infatti, dei 17 profili elettroforetici ottenuti 11 rappresentano ceppi diversi appartenenti alle specie *W. cibaria* e *W. confusa*. La distinzione di queste due specie mediante analisi dei profili elettroforetici rappresenta un contributo importante per lo studio del genere *Weissella*, in quanto l'analisi delle sequenze del gene 16S *rRNA* non è sempre in grado di distinguere le due specie e risolvere attribuzioni dubbie.

La coincidenza, sebbene solo parziale, delle specie presenti nelle semole con quelle trovate nei lieviti naturali non sembra invece riscontrarsi quando si confronta la composizione della microflora lattica delle semole e quella presente sulle cariossidi di grano duro. Infatti, Corsetti *et al.* (2007) hanno dimostrato che i batteri lattici più comunemente riscontrati su grano duro proveniente da diverse regioni d'Italia compresa la Puglia, sono *Lactobacillus graminis* e alcune specie del genere *Enterococcus*. Ciò si può spiegare considerando che durante la molitura gli strati più esterni (tegumenti esterni) delle cariossidi, sui quali generalmente si insediano i batteri, vengono allontanati dalla parte interna del seme da cui si ottiene la semola. Si può quindi ipotizzare che la popolazione di batteri lattici isolata dalle semole di grano duro derivi da una contaminazione secondaria ad opera dei macchinari utilizzati nei molini. Il processo di molitura può influire sulla composizione della microflora lattica nelle semole e questo giustificerebbe la ridotta biodiversità riscontrata in campioni di semola provenienti dallo stesso molino.

L'uso del lievito naturale in alternativa ai conservanti chimici per prolungare la conservabilità può essere una risposta efficace all'esigenza dei consumatori di alimenti poco trattati. Attualmente il suo impiego trova però una ridotta applicazione nelle produzioni panarie su larga scala per via dei lunghi tempi di fermentazione e per la difficoltà di gestione della pasta acida. Per questo motivo i prodotti di fermentazione, più facili da gestire, possono rappresentare un'alternativa più semplice da applicare a livello industriale. I prodotti di fermentazione sono stati ottenuti in seguito alla crescita dei ceppi di batteri lattici identificati in un substrato a base di farina che riproduce un ambiente chimicamente simile a quello dell'impasto. L'indagine sull'attività antimicrobica dei prodotti di fermentazione è stata condotta utilizzando due muffe (*A. niger*, *P. roqueforti*), un lievito (*E. fibuliger*) e un batterio (*B. subtilis*) che rappresentano i comuni contaminanti dei prodotti da forno. I risultati ottenuti hanno permesso di selezionare 6 prodotti di fermentazione: *L. plantarum* C21-41, *L. lactis* C9-6, *W. cibaria* C2-5, *L. citreum* C2-27, *W. cibaria* C21-4 e *L. rossiae* C21-11. In particolare, il ceppo *L. citreum* C2-27 è risultato efficace sia verso i funghi che verso *B. subtilis*. I prodotti di fermentazione di *L. citreum* C2-27, *W. cibaria* C21-4 e *L. rossiae* C21-11 hanno inibito lo sviluppo di tutti e tre i funghi in modo paragonabile o superiore al propionato di calcio (0,3% p/vol), il conservante chimico comunemente impiegato nella preparazione dei lievitati da forno per contrastare l'ammuffimento. I risultati ottenuti sono interessanti in quanto, è questa la prima volta che viene segnalata l'attività inibitoria verso importanti agenti di deterioramento dei prodotti da forno in ceppi appartenenti alle specie *L. citreum* e *L. rossiae*.

Poiché l'attività antimicrobica dei batteri lattici è spesso correlata alla produzione di diverse molecole quali acidi organici, peptidi e batteriocine (Corsetti *et al.*, 1998b, Lavermicocca *et al.*, 2000, Lavermicocca *et al.* 2003, Ström *et al.* 2002), i 6 prodotti di fermentazione selezionati sono stati sottoposti a trattamenti chimico-fisici per definire la natura delle sostanze attive. I risultati ottenuti hanno escluso il coinvolgimento di molecole di natura proteica, individuando nella produzione di acidi organici e nell'acidificazione i probabili responsabili dell'attività. Poiché è noto che *E. fibuliger*, *P. roqueforti* e *Aspergillus* spp sono specie tolleranti a condizioni di acidità spinte (pH 1-4) (Lavermicocca *et al.* 2003; De Muynck *et al.* 2004) l'inibizione fungina non può essere attribuita al solo abbassamento del pH. E' quindi più probabile che l'attività inibente dei PF dipenda dall'effetto degli acidi lattico e acetico esaltato dalle condizioni di elevata acidità. Infatti i tre ceppi *W. cibaria* C21-4, *L.*

*citreum* C2-27 e *L. rossiae* C21-11 producono quantità di acidi lattico e acetico superiori ( $P < 0,05$ ) rispetto agli altri ceppi. In ambiente acido gli acidi organici, presenti prevalentemente in forma indissociata, sono in grado di attraversare la membrana cellulare e penetrare nel citoplasma. Qui il valore del pH più elevato comporta la dissociazione degli acidi e la liberazione di ioni  $H^+$  che provocano la riduzione del pH intracellulare e la morte cellulare (Narendranath *et al.* 2001a, b; Gerez *et al.* 2009). Nei prodotti di fermentazione attivi, che presentano valori di pH compresi tra 3,27 e 3,32, gli acidi lattico e acetico ( $pK_a$  3,8 e 4,7, rispettivamente) sono presenti in forma indissociata. Portando il pH dei PF a valori superiori a 4 gli acidi tornano nella forma dissociata spiegando la perdita di attività. Al fine di confermare la relazione tra l'attività antifungina e produzione di acidi lattico e acetico è stato valutato l'effetto di una miscela dei due acidi alle stesse concentrazioni presenti nei tre prodotti di fermentazione attivi (*L. citreum* C2-27, *W. cibaria* C21-4 e *L. rossiae* C21-11). I risultati ottenuti hanno dimostrato che la miscela inibisce lo sviluppo fungino nella stessa misura dei prodotti di fermentazione confermando il ruolo chiave degli acidi lattico e acetico nell'attività antimicrobica come suggerito anche da altri autori (Fayol-Messaoudi *et al.*, 2005, Makras *et al.*, 2006, Rocken 1996). In particolare, l'acido lattico è risultato essere il principale responsabile dell'attività contro *B. subtilis* poiché il ceppo più attivo (C21-41) ha prodotto la maggiore quantità di questo acido ( $P < 0,05$ ) e ha mostrato il più basso valore di pH ( $P < 0,05$ ). Gli altri ceppi efficaci contro le spore di *B. subtilis* (C9-6, C2-27 e C2-5) hanno prodotto quantità variabili di acidi e presentato valori di pH simili ai ceppi non attivi. La differenza di attività contro *B. subtilis* fra prodotti di fermentazione con valori di pH e contenuto di acidi organici simili ( $P > 0,05$ ) come C21-11 e C2-27 può essere spiegata ipotizzando la presenza di miscele di metaboliti non ben identificati in concentrazione e composizione variabili. Questi metaboliti potrebbero essere della stessa natura di quelli prodotti da ceppi di *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus johnsonii* attivi verso *Salmonella enterica* (Fayol-Messaoudi *et al.* 2005). Tali metaboliti mostrano caratteristiche chimico-fisiche differenti da quelle delle batteriocine e dall'acido lattico, sono stabili al trattamento termico e proteolitico ma perdono l'attività in seguito a neutralizzazione del pH.

Per valutare il potenziale utilizzo dei prodotti di fermentazione selezionati come bioconservanti nel pane e soprattutto per valutare la loro efficacia contro l'ammuffimento, la più comune contaminazione dei lievitati da forno, sono state condotte prove di panificazione in laboratorio. I prodotti di fermentazione dei ceppi *L.*

*citreum* C2-27 e *L. rossiae* C21-11, incorporati nell'impasto con gli altri ingredienti, hanno influito diversamente sullo sviluppo del fungo inoculato (*A. niger*). Infatti, il prodotto di fermentazione di *L. citreum* (C2-27) è risultato il più efficace, in quanto ha determinato un ritardo di un giorno nello sviluppo della muffa, rispetto al pane di controllo. Il C21-11 invece ha ridotto l'intensità dell'alterazione senza un ritardo effettivo. E' da notare anche che l'impiego dei prodotti di fermentazione non ha alterato la forma e la struttura del pane.



## 2.5 Conclusioni

Negli ultimi anni diverse aziende panarie dell'Italia meridionale hanno segnalato casi di alterazione microbiologica del pane. Poiché il fenomeno sta acquisendo una considerevole rilevanza economica, è importante individuare metodi naturali in grado di ridurre l'incidenza di queste alterazioni. L'impiego di batteri lattici con proprietà antimicrobiche isolati da inesplorate nicchie ecologiche quali le semole di grano duro, può rappresentare una risposta concreta e innovativa al problema della conservazione dei lievitati da forno. La capacità del prodotto di fermentazione di *L. citreum* C2-27 di inibire *in vitro* lo sviluppo delle principali specie alterative quali *B. subtilis*, *A. niger*, *P. roqueforti* e *E. fibuliger*, e di ritardare lo sviluppo fungino sul pane, assume un significato importante nella prospettiva di una sua potenziale applicazione come "bioconservante" a livello industriale. Inoltre, i batteri lattici isolati o i loro metaboliti potrebbero essere utilizzati in combinazione con i tradizionali conservanti chimici, consentendo una riduzione delle concentrazioni di tali sostanze, particolarmente nei prodotti lievitati con lievito di birra.

**Tabella 2.1** Campioni di semola rimacinata di grano duro esaminati.

<b>N°. campione</b>	<b>Varietà</b>	<b>Condizionamento</b>
1	Arcangelo	Lungo
2	Appulo	Lungo
3	Simeto	Lungo
4	Duilio	Lungo
5	Appuro	Breve
6	Arcangelo	Breve
7	Simeto	Breve
8	Duilio	Breve
9	Simeto – Duilio	Lungo
10	Simeto - Appulo	Lungo
11	Simeto – Arcangelo	Lungo
12	Appulo – Arcangelo	Breve
13	Appulo – Arcangelo	Lungo
14	Duilio – Arcangelo	Lungo
15	Duilio – Appulo	Lungo
16	Duilio – Arcangelo	Breve
17	Duilio – Appulo	Breve
18	Duilio – Simeto	Breve
19	Simeto – Arcangelo	Breve
20	Simeto - Appulo	Breve
21	Svevo	Lungo
22	Svevo	Breve
43	Svevo integrale	Breve
44	Ciccio integrale	Breve
45	Appulo integrale	Breve
46	Svevo integrale	Lungo
47	Ciccio integrale	Lungo
48	Appulo integrale	Lungo

**Tabella 2.2** Oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione del frammento del gene 16S rRNA e per il successivo sequenziamento

<b>Primer</b>	<b>Posizione <sup>(a)</sup></b>	<b>Sequenza</b>
P0	27f	5'- GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
P6	1495r	5'- CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'
P5	930f	5'-AAGGAATTGACGGGGGC-3'
we16s1r	408r	5'-AGCCGAAACCCTTCATCAC-3'
we16s1f	1061f	5'-GACAGGTGGTGCATGGTTG-3'
we16s2r	1073r	5'-AACCCAACATCTCACGACA-3'
P <sub>16S-1541</sub>	1541r	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

<sup>(a)</sup> La posizione corrisponde a quella sul gene 16S rRNA di *E. coli*, dove l'estremità 3' si allinea in direzione forward (f) o reverse (r).

**Tabella 2.3** Popolazione batterica mesofila totale (PCA) e LAB (SDB) isolata da semole rimacinate e semole integrali di grano duro sottoposte a condizionamento breve e condizionamento lungo. Numero di LAB ottenuti e specie identificate.

Varietà	Condizionamento breve (7- 8 h)					Condizionamento lungo (15-16 h)				
	Campione	UFC/g		No. di LAB	Specie di LAB <sup>(a)</sup>	Campione	UFC/g		No. di LAB	Specie di LAB <sup>(a)</sup>
		PCA	SDB				PCA	SDB		
<b>Miscela di semole di grano duro</b>										
Simeto-Duilio	C18	7×10 <sup>3</sup>	1,2×10 <sup>3</sup>	-	-	C9	3,2×10 <sup>3</sup>	3,8×10 <sup>1</sup>	1	<i>L. lactis</i>
Simeto-Appulo	C20	2,1×10 <sup>3</sup>	6×10 <sup>2</sup>	-	-	C10	7,2×10 <sup>3</sup>	7,4×10 <sup>1</sup>	-	-
Simeto-Arcangelo	C19	3,2×10 <sup>3</sup>	3,2×10 <sup>2</sup>	-	-	C11	1,6×10 <sup>4</sup>	1,4×10 <sup>4</sup>	2	<i>L. citreum</i>
Appulo-Arcangelo	C12	8,1×10 <sup>3</sup>	2,9×10 <sup>3</sup>	-	-	C13	1,7×10 <sup>4</sup>	7,1×10 <sup>3</sup>	-	-
Duilio-Arcangelo	C16	4,6×10 <sup>3</sup>	5,4×10 <sup>2</sup>	-	-	C14	2,1×10 <sup>4</sup>	4,6×10 <sup>3</sup>	-	-
Duilio-Appulo	C17	6,5×10 <sup>2</sup>	3,2×10 <sup>2</sup>	-	-	C15	5,2×10 <sup>3</sup>	3,9×10 <sup>2</sup>	-	<i>L. lactis</i>
<b>Semole di grano duro</b>										
Arcangelo	C6	8×10 <sup>3</sup>	9×10 <sup>1</sup>	8	<i>W. confusa</i>	C1	1,7×10 <sup>4</sup>	2,1×10 <sup>4</sup>	-	-
Appulo	C5	5,9×10 <sup>3</sup>	7,5×10 <sup>1</sup>	8	<i>L. lactis</i> , <i>W. confusa</i>	C2	1,3×10 <sup>4</sup>	8,6×10 <sup>3</sup>	24	<i>L. citreum</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i>

Continua nella pagina successiva...

... Continua dalla pagina precedente

Varietà	Condizionamento breve (7- 8 h)					Condizionamento lungo (15-16 h)				
	Campione	UFC/g		No. di LAB	Specie di LAB <sup>(a)</sup>	Campione	UFC/g		No. di LAB	Specie di LAB <sup>(a)</sup>
		PCA	SDB				PCA	SDB		
<b>Semole di grano duro</b>										
Simeto	C7	2,6×10 <sup>3</sup>	5,5×10 <sup>2</sup>	-	-	C3	7,4×10 <sup>3</sup>	6,9×10 <sup>2</sup>	19	<i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i>
Duilio	C8	4,2×10 <sup>3</sup>	1,4×10 <sup>3</sup>	-	-	C4	4×10 <sup>4</sup>	4,3×10 <sup>4</sup>	19	<i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i>
Svevo	C22	4×10 <sup>2</sup>	3,4×10 <sup>1</sup>	2	<i>W. cibaria</i>	C21	1×10 <sup>4</sup>	8,5×10 <sup>2</sup>	10	<i>L. rossiae</i> , <i>W. cibaria</i> , <i>L. plantarum</i>
Ciccio	C25	6,3×10 <sup>3</sup>	6,5×10 <sup>3</sup>	6	<i>L. plantarum</i>	C27	1×10 <sup>2</sup>	-	-	-
<b>Semola integrale di grano duro</b>										
Svevo	C43	2,3×10 <sup>3</sup>	3,3×10 <sup>2</sup>	25	<i>L. mesenteroides</i> <i>W. cibaria</i>	C46	1,8×10 <sup>3</sup>	1,6×10 <sup>3</sup>	-	-
Ciccio	C44	1,4×10 <sup>4</sup>	1,2×10 <sup>4</sup>	-	-	C47	3,3×10 <sup>3</sup>	1,7×10 <sup>3</sup>	-	-
Appulo	C45	2×10 <sup>3</sup>	5,5×10 <sup>2</sup>	1	<i>W. confusa</i>	C48	1×10 <sup>3</sup>	1,3×10 <sup>3</sup>	-	-

<sup>(a)</sup> L'identificazione della specie è stata ottenuta mediante sequenziamento del gene 16S rRNA.

**Tabella 2.4** Attività antifungina dei prodotti di fermentazione dei ceppi di LAB isolati dalle semole rimacinate di grano duro posta a confronto con il conservante chimico propionato di calcio (0,3% p/vol).

Ceppi	<i>A. niger</i>	<i>P. roqueforti</i>	<i>E. fibuliger</i>
	ITEM5132	IBT18687	IBT605
% inibizione $\pm$ SD <sup>(a)</sup>			
Propionato 0,3%	88,43 $\pm$ 1,88	84,68 $\pm$ 8,62	31,33 $\pm$ 0,64
<i>L. plantarum</i> C21-41	42,48 $\pm$ 6,92	91,48 $\pm$ 2,09	99,75 $\pm$ 0,35
<i>L. lactis</i> C5-6	45,10 $\pm$ 10,16	81,32 $\pm$ 9,46	80,00 $\pm$ 7,58
<i>W. confusa</i> C5-7	29,80 $\pm$ 9,54	82,01 $\pm$ 6,64	97,70 $\pm$ 1,27
<i>W. confusa</i> C3-7	0	65,52 $\pm$ 3,27	21,47 $\pm$ 9,37
<i>W. confusa</i> C4-17	0	39,06 $\pm$ 4,25	11,08 $\pm$ 1,73
<i>L. lactis</i> C9-6	0	39,63 $\pm$ 18,11	76,30 $\pm$ 12,14
<i>L. citreum</i> C2-27	98,14 $\pm$ 3,80	87,77 $\pm$ 2,30	97,84 $\pm$ 3,24
<i>L. rossiae</i> C21-11	99,94 $\pm$ 0,08	78,96 $\pm$ 11,64	99,40 $\pm$ 0,21
<i>W. cibaria</i> C21-4	99,96 $\pm$ 0,06	79,06 $\pm$ 6,89	90,86 $\pm$ 8,42
<i>W. cibaria</i> C3-2	56,42 $\pm$ 18,07	70,30 $\pm$ 3,03	50,87 $\pm$ 9,00
<i>W. cibaria</i> C3-4	49,94 $\pm$ 15,6	69,59 $\pm$ 3,27	43,09 $\pm$ 15,5
<i>W. cibaria</i> C43-11	72,54 $\pm$ 16,04	89,16 $\pm$ 7,3	100,00 $\pm$ 0,25
<i>W. cibaria</i> C3-19	23,78 $\pm$ 5,87	67,89 $\pm$ 6,19	59,46 $\pm$ 12,32
<i>W. cibaria</i> C4-21	26,28 $\pm$ 7,5	83,74 $\pm$ 6,50	99,37 $\pm$ 0,88
<i>W. cibaria</i> C2-32	62,13 $\pm$ 13,76	79,87 $\pm$ 6,38	80,78 $\pm$ 22,71
<i>W. cibaria</i> C2-5	57,17 $\pm$ 10,75	73,87 $\pm$ 2,72	60,27 $\pm$ 20,28
<i>L. mesenteroides</i> C43-2M	44,46 $\pm$ 15,52	87,11 $\pm$ 1,26	88,96 $\pm$ 13,2

(a) Inibizione percentuale dello sviluppo fungino determinato dai prodotti di fermentazione dopo 96 h, rispetto al testimone non trattato. Valori medi di tre determinazioni indipendenti.

**Tabella 2.5** Acidi organici e valori di pH dei prodotti di fermentazione dei 17 ceppi di batteri lattici isolati dai campioni di semole e del substrato di crescita WHF.

Ceppi	Ac. lattico	Ac. acetico	Ac. formico	Ac. citrico	PLA	OH-PLA	pH
	Concentrazione (mM) $\pm$ SD <sup>(a)</sup>						
Substrato WHF	1,36 $\pm$ 0,12	8,65 $\pm$ 0,72	0,08 $\pm$ 0,04	0,09 $\pm$ 0,03	<QL <sup>(b)</sup>	<QL	4,56 $\pm$ 0,16
<i>L. plantarum</i> C21-41	39,29 $\pm$ 8,13	NR <sup>(c)</sup>	NR	NR	0,09 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,01	3,05 $\pm$ 0,06
<i>L. lactis</i> C5-6	18,53 $\pm$ 2,12	NR	0,35 $\pm$ 0,05	0,12 $\pm$ 0,04	<QL	<QL	3,40 $\pm$ 0,14
<i>W. confusa</i> C5-7	22,24 $\pm$ 6,23	9,22 $\pm$ 0,73	0,11 $\pm$ 0,02	NR	<QL	<QL	3,48 $\pm$ 0,08
<i>W. confusa</i> C3-7	24,32 $\pm$ 7,88	11,60 $\pm$ 0,72	0,08 $\pm$ 0,03	NR	0,10 $\pm$ 0,03	0,02 $\pm$ 0,00	3,72 $\pm$ 0,17
<i>W. confusa</i> C4-17	16,62 $\pm$ 0,52	11,61 $\pm$ 0,97	0,15 $\pm$ 0,01	NR	<QL	<QL	3,85 $\pm$ 0,07
<i>L. lactis</i> C9-6	13,27 $\pm$ 3,49	NR	0,21 $\pm$ 0,09	NR	<QL	<QL	3,56 $\pm$ 0,13
<i>L. citreum</i> C2-27	28,26 $\pm$ 5,16	14,62 $\pm$ 0,09	NR	NR	0,11 $\pm$ 0,00	0,01 $\pm$ 0,00	3,42 $\pm$ 0,02
<i>L. rossiae</i> C21-11	28,93 $\pm$ 5,14	14,70 $\pm$ 0,03	NR	NR	<QL	<QL	3,27 $\pm$ 0,00
<i>W. cibaria</i> C21-4	25,44 $\pm$ 2,81	13,08 $\pm$ 1,25	NR	NR	<QL	<QL	3,32 $\pm$ 0,05
<i>W. cibaria</i> C3-2	21,96 $\pm$ 7,16	11,33 $\pm$ 0,93	NR	0,14 $\pm$ 0,00	<QL	<QL	3,56 $\pm$ 0,02

Continua nella pagina successiva...

...Continua dalla pagina precedente

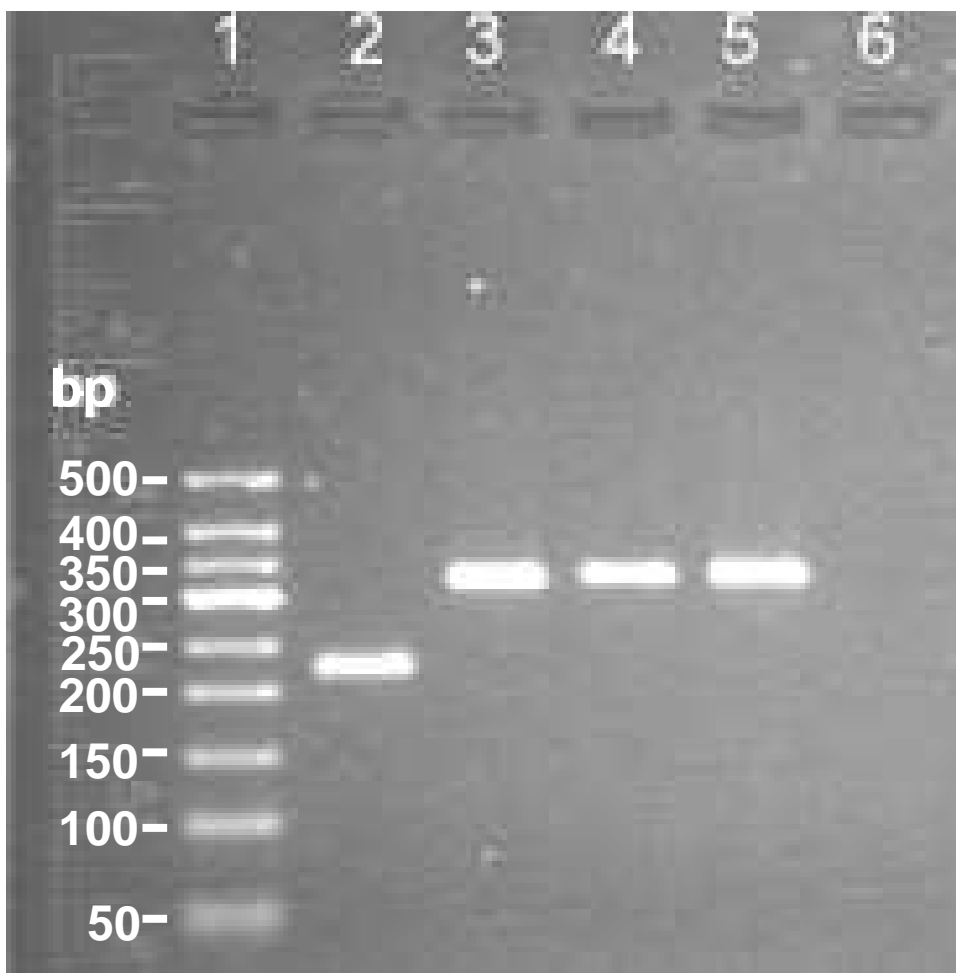
Ceppi	Ac. lattico	Ac. acetico	Ac. formico	Ac. citrico	PLA	OH-PLA	pH
	Concentrazione (mM) $\pm$ SD <sup>(a)</sup>						
<i>W. cibaria</i> C3-4	24,32 $\pm$ 2,95	11,79 $\pm$ 1,17	0,10 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02	<QL	0,01 $\pm$ 0,00	3,60 $\pm$ 0,03
<i>W. cibaria</i> C43-11	22,26 $\pm$ 0,87	11,9 $\pm$ 3,56	0,18 $\pm$ 0,09	NR	<QL	<QL	3,31 $\pm$ 0,17
<i>W. cibaria</i> C3-19	24,55 $\pm$ 1,72	11,90 $\pm$ 0,01	NR	0,13 $\pm$ 0,01	<QL	0,05 $\pm$ 0,03	3,55 $\pm$ 0,05
<i>W. cibaria</i> C4-21	24,94 $\pm$ 5,57	9,96 $\pm$ 1,98	0,12 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,01	<QL	0,02 $\pm$ 0,00	3,40 $\pm$ 0,13
<i>W. cibaria</i> C2-32	27,09 $\pm$ 7,43	12,88 $\pm$ 0,87	0,13 $\pm$ 0,05	0,13 $\pm$ 0,01	<QL	<QL	3,52 $\pm$ 0,12
<i>W. cibaria</i> C2-5	28,35 $\pm$ 5,30	12,50 $\pm$ 0,67	NR	0,14 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01	<QL	3,53 $\pm$ 0,09
<i>L. mesenteroides</i> C43-2M	20,25 $\pm$ 4,40	10,14 $\pm$ 3,57	0,20 $\pm$ 0,09	0,12 $\pm$ 0,00	<QL	<QL	3,48 $\pm$ 0,25

<sup>(a)</sup> Valori medi di tre determinazioni indipendenti.

<sup>(b)</sup> Limite di quantificazione. QL di PLA = 0,09 mM; QL di OH-PLA = 0,015 mM.

<sup>(c)</sup> Non rilevante in quanto inferiore al valore del controllo (substrato WHF).

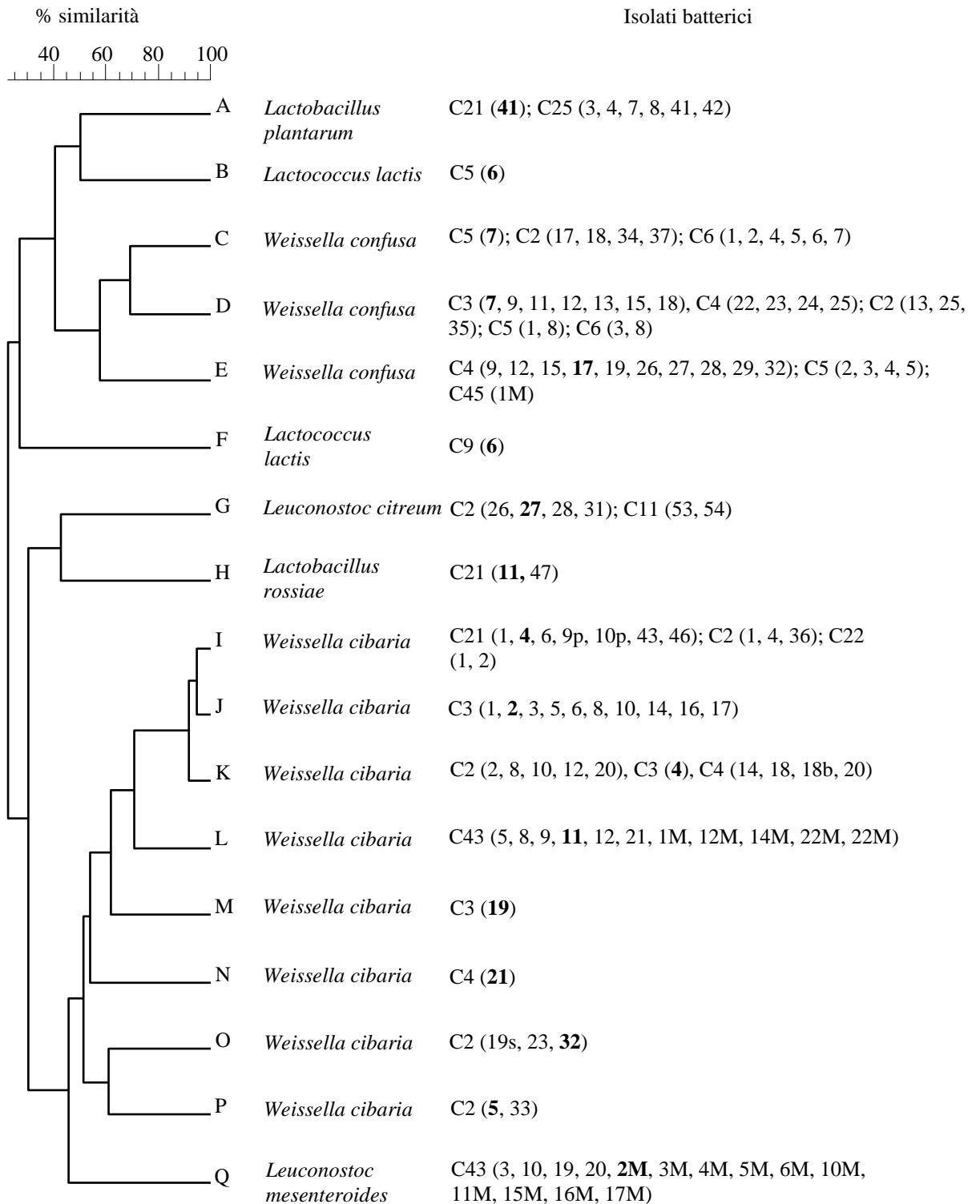




**Figura 2.1.** Prodotti di amplificazione del gene *recA* ottenuti mediante la tecnica multiplex – PCR. **1**, standard GelPilot 50 bp ladder (Quiagen), corsie **2, 3, 4, 5**, prodotti di amplificazione ottenuti rispettivamente da *L. pentosus* ATCC 8041, *L. plantarum* ATCC 14917, C21-41, C25-3. **6**, controllo negativo

**Nella pagina seguente:**

**Figura 2.2.** Dendrogramma ottenuto dai profili rep-PCR dei 125 batteri lattici isolati da semole rimacinate di grano duro. Il dendrogramma è stato realizzato utilizzando il coefficiente di similarità Dice e l’algoritmo UPGMA. Le lettere in maiuscolo (**A-Q**) indicano i 17 diversi profili ottenuti. Nella colonna “isolati batterici” le lettere maiuscole seguite da un numero indicano il campione di semola di provenienza, mentre il numero tra parentesi indica l’isolato batterico. Gli isolati utilizzati per i saggi di attività antimicrobica sono evidenziati in grassetto.



**Figura 2.2.** Vedi didascalia nella pagina precedente.



**Figura 2.3.** Pane preparato in laboratorio e inoculato artificialmente con *Aspergillus niger* ITEM 5132. **A)** pane di controllo ottenuto con acqua. **B)** pane preparato con il PF del ceppo *Leuconostoc citreum* C2-27; **C)** pane ottenuto con il PF del ceppo *Lactobacillus rossiae*. Osservazione dopo 4 gg di conservazione a 25°C.

**3. studio e caratterizzazione della popolazione di *Bacillus*  
spp. contaminante le semole rimacinate  
di grano duro**

### 3.1 Introduzione

Negli ultimi anni l'alterazione nota come "pane filante" risulta essere un problema attuale e frequente in molte parti del mondo. In particolare, diverse aziende del Meridione d'Italia hanno segnalato recentemente e soprattutto nel periodo compreso tra la primavera e l'autunno problemi di deterioramento che hanno portato alla completa compromissione delle produzioni panarie.

I microrganismi responsabili appartenenti al genere *Bacillus* sono ampiamente diffusi in natura e si sviluppano soprattutto nel terreno, contaminano il frumento durante la coltivazione e permangono nelle farine dopo la macinazione (Galli e Franzetti, 1987; Viljoen e von Holy, 1997). Le spore presenti, sopravvivono al processo di cottura del pane e dopo alcune ore germinano e avviano un processo degradativo dell'amido e delle proteine che porta alla formazione della filatura della mollica. Una delle specie più frequentemente associata a queste alterazioni è *B. subtilis* (Watkins, 1906, Kirschner e von Holy, 1989; Bailey e von Holy, 1993, Thompson *et al.*, 1993). In particolare uno studio condotto da Rosenkvist e Hansen (1995) *B. subtilis* è risultata l'unica specie isolata da pane contaminato, mentre la popolazione di Bacilli isolata dalle materie prime presentava una più ampia variabilità di specie (*B. megaterium*, *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. firmus*). Gli autori hanno giustificato la dominanza di *B. subtilis* nel pane con la più alta resistenza delle spore al calore (Rosenkvist e Hansen, 1995). Altre specie isolate da pane contaminato sono: *B. licheniformis*, *B. pumilus* e *B. cereus* (Collins *et al.* 1991, Thompson *et al.* 1998).

La farina rappresenta la principale fonte di spore batteriche ma l'alterazione del pane può originare anche dall'uso di altre materie prime quali lievito e additivi spesso contaminate da spore di *Bacillus* (Collins, 1991; Rosenkvist e Hansen, 1995). Inoltre è stato dimostrato che le macchine usate per la panificazione e gli ambienti di lavorazione possono rappresentare ulteriori veicoli di contaminazione (Legan, 1987; von Holy *et al.*, 1988; Bailey e von Holy, 1993). La presenza di lotti di grano contaminati può infatti compromettere l'igiene dei macchinari deputati alla macinazione delle cariossidi, determinando così il rischio di contaminare altri lotti.

L'assenza di conservanti aumenta il rischio che l'alterazione si manifesti. Per esempio, Rosenkvist e Hansen (1995) hanno osservato che si possono ottenere elevate concentrazioni di cellule batteriche (ca  $10^6$  ufc/g) nel pane privo conservanti nonostante l'alterazione non sia visibile. Inoltre gli stessi autori, hanno riportato che

pane preparato in laboratorio, con farine contenenti bassi valori di carica batterica (0-6 spore/g), dopo 1 solo giorno di conservazione a 30°C, presentavano valori di ca 10<sup>7</sup> ufc/g (Rosenkvist e Hansen, 1995).

Il processo alterativo del pane filante non solo causa danni economici alle aziende del settore panario, ma può essere anche fonte di rischio per la salute del consumatore. In letteratura sono riportati casi di intossicazioni alimentari dovute al consumo di pane filante e di alimenti contaminati con *B. subtilis* e *B. licheniformis* alle concentrazioni di 10<sup>5</sup>-10<sup>9</sup> ufc/g (Todd, 1982; Sockett, 1991). Inoltre la presenza nelle farine di ceppi di *B. cereus*, una specie che produce enterotossine in grado di resistere al calore (Asano *et al.*, 1997), sottolinea l'importanza di prevenire questo tipo di contaminazioni.

La crescente variabilità riscontrata all'interno delle specie di *Bacillus* spp. responsabili del "pane filante" e l'eventuale presenza tra esse di specie o ceppi responsabili di intossicazioni alimentari (*B. cereus*, *B. subtilis*) (Kramer e Gilbert, 1989) rende lo studio della diversità inter e intra-specifica un requisito importante per la corretta valutazione dei possibili rischi legati alla presenza di spore di *Bacillus* spp. nel pane e nelle materie prime.

Scopo del presente lavoro è stato quello di indagare la presenza di spore di *Bacillus* spp. in semole rimacinate di grano duro comunemente impiegate nella preparazione di pani tipici pugliesi attraverso l'uso della tecnica molecolare di caratterizzazione e biotipizzazione, rep-PCR, per studiare la diversità genetica inter e intra-specifica della popolazione di *Bacillus*. Lo studio si pone inoltre l'obiettivo di fornire alle aziende informazioni sul livello della qualità microbiologica delle semole di grano duro, ponendo l'attenzione sull'importanza del controllo dell'igiene delle materie prime come primo passo di una strategia del contenimento delle contaminazioni del pane.

## **3.2 Materiali e metodi**

### **3.2.1 Campioni di semole ed analisi microbiologica**

Oggetto di studio sono stati 59 campioni di 200 g di semole rimacinate di grano duro (Tabella 3.1). I campioni sono stati forniti da molini situati nella zona di Altamura e Candela e sono relativi alle annate 2004-2005, 2005-2006 e 2006-2007. Le semole durante il periodo di analisi sono state conservate a 4°C.

Per valutare la presenza di spore batteriche appartenenti al genere *Bacillus* 20 grammi di campione sono stati diluiti in 180 ml di una soluzione di Bacto-peptone (0,1% p/vol) (Difco Laboratory Inc, Detroit, MI, USA). Dopo 30 min a temperatura ambiente la sospensione è stata omogeneizzata per 2 min mediante Stomacher Lab-Blender 400 (PBI International Milano, Italia). Successivamente una aliquota è stata filtrata mediante carta Whatman N. 4 e sottoposta a trattamento termico (90°C) per 20 min seguito da un rapido raffreddamento in bagno di ghiaccio. Dalla sospensione, concentrata 10 volte rispetto al volume iniziale, mediante centrifugazione (10000 rpm per 10 min), sono state preparate le opportune diluizioni decimali seriali in soluzione di cloruro di sodio (0,85% p/vol) e Tween 80 ed 1 ml è stato inoculato in piastre di Starch-Agar (SA, Difco) per la semina con la tecnica dell'inclusione. Dopo 24-48 h di incubazione a 30°C le colonie sono state enumerate, prelevate e purificate mediante la tecnica dello striscio su SA. Ogni isolato è stato sottoposto al test per la valutazione dell'attività amilasica con una soluzione di iodio. (Hurrigan e McCance, 1976; Pepe *et al.*, 2003). L'amido del substrato (SA) nella forma non idrolizzata si colora di blu in presenza di una soluzione di iodio, mentre quando viene idrolizzato dall'attività dell'enzima  $\beta$ -amilasi prodotto dai batteri, assume un aspetto trasparente. Infine le colonie che hanno dimostrato attività amilasica sono state conservate a -80°C in Brain Heart Infusion (BHI, Difco) al 20% di (vol/vol) di glicerolo.

### **3.2.2 Estrazione DNA genomico**

Il DNA genomico è stato estratto da 2 ml di coltura inoculata in BHI ed incubata per 12 h a 30°C in agitazione. Il DNA è stato estratto utilizzando il kit commerciale della Promega Corporation apportando alcune modifiche al protocollo indicato dalla ditta. Tale estrazione si basa su quattro fasi principali: una prima fase di lisi cellulare, una digestione dell'RNA presente, una terza fase che consiste nell'allontanamento delle proteine cellulari mediante precipitazione con sali ed infine una quarta fase in cui il

DNA è concentrato e purificato utilizzando isopropanolo. In breve: le cellule sono state ottenute centrifugando 1,5 ml di coltura batterica a 13000 x g per 2 minuti. Il precipitato dopo essere stato lavato con soluzione fisiologica (cloruro di sodio allo 0,85% p/vol) è stato risospeso in 480 µl di EDTA (50 mM pH 8) e trattato enzimaticamente con lisozima (10 mg/ml, Sigma) per 60 minuti a 37°C, al fine di lisare la parete cellulare e favorire l'estrazione del DNA. Al termine dell'incubazione il preparato così ottenuto è stato centrifugato; il precipitato è stato risospeso in 600 µl di Nuclei Lysis solution, incubato a 80°C per 5 minuti e lasciato raffreddare a temperatura ambiente. Successivamente il lisato cellulare è stato trattato con una soluzione contenente l'enzima Rnase per 30 minuti a 37°C in modo da permettere all'enzima di agire degradando l'RNA presente. Dopo aver lasciato raffreddare il lisato cellulare a temperatura ambiente, sono stati aggiunti 200 µl di una soluzione (Protein Purification solution) che permette la precipitazione delle proteine presenti in soluzione agevolata anche dall'incubazione in ghiaccio per 5 minuti. Al termine dell'incubazione il DNA è stato separato dal materiale cellulare per centrifugazione, la fase liquida contenente il DNA in soluzione è stata trasferita in 600 µl di isopropanolo e il DNA precipitato mediante centrifugazione (13000xg per 5 min.). L'isopropanolo è stato rimosso e il DNA lavato con etanolo al 70% vol/vol. L'etanolo è stato successivamente allontanato mediante centrifugazione. Il DNA ottenuto è stato reidratato in 50 µl di acqua ultrapura ((Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) riscaldandolo a 56°C per 15 minuti. Successivamente il DNA estratto è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica (ND 1000, NanoDrop Technologies) e impiegato per l'analisi rep-PCR al fine di caratterizzare le diverse specie e i diversi ceppi.

### **3.2.3 Amplificazione mediante rep-PCR Caratterizzazione genotipica mediante rep-PCR**

La diversità genetica esistente tra gli isolati batterici ottenuti, è stata indagata mediante la tecnica molecolare rep-PCR. Al fine di discriminare i diversi ceppi presenti, il DNA genomico estratto è stato amplificato utilizzando tre diverse condizioni di amplificazione, in modo da permettere l'individuazione delle condizioni di amplificazione migliori in grado di fornire il maggior numero di profili con il più alto numero di bande discriminanti. In una fase preliminare sono stati valutati diversi oligonucleotidi per amplificare il DNA di 11 isolati. Per amplificare il DNA genomico sono state scelte le due coppie di inneschi REP-1R-Dt/REP-2R-Dt (5'-



IIINCGNCGNCATCNGGC-3'; 5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3'; N = A, T, C o G; I = iosina) (Hyytia-Trees *et al.* 1999), e REP1R-I/REP2-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3'; 5'-IIICGNCGNCATCNGGC -3', e due inneschi (GTG)<sub>5</sub> (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3') e BOX A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Coudeyras *et al.*, 2008). Gli inneschi sono stati utilizzati singolarmente in tre serie di amplificazioni.

Le reazioni di amplificazione sono state condotte in un volume finale di 25 µl contenenti 23 µl di MegaMix (Microzone Ltd., United Kingdom), 2 µM di ciascun oligonuocletide e 10 ng di DNA genomico. Le amplificazioni sono state eseguite in un termociclatore GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer-Applied Biosystems) programmato come segue: una iniziale denaturazione a 94°C per 5 minuti, seguita da 35 cicli comprendenti una denaturazione di 30 secondi a 94°C, una fase di appaiamento di 1 minuto e una fase di allungamento di 4 minuti a 72°C, seguiti da un'estensione finale a 72°C per 7 minuti. La fase di appaiamento è stata condotta a 40°C per le coppie di inneschi REP-1R-Dt/REP-2R-Dt e REP 1R-I/REP 2-I, a 50°C per l'innesco BOX A1R e 45°C per l'innesco (GTG)<sub>5</sub>.

I prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante elettroforesi con un Bioanalizzatore Agilent 2100 (Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany) avvalendosi del kit DNA1000 della stessa ditta. Un microlitro di ciascun prodotto di PCR è stato posto nel pozzetto del chip per la separazione del DNA seguendo il protocollo della ditta. I dati sono stati visualizzati come elettroferogrammi o come immagini gel-simili. Il peso molecolare dei frammenti di DNA amplificati, è stato stimato mediante comparazione con DNA di peso molecolare noto compreso tra 50 e 10380 bp. Nelle condizioni sperimentali utilizzate l'innesco (GTG)<sub>5</sub> ha permesso una migliore discriminazione dei diversi profili per cui è stato scelto per lo studio di caratterizzazione degli isolati.

La riproducibilità delle bande ottenute attraverso rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic), è stata valutata comparando i prodotti PCR ottenuti da 3 colture separate dello stesso ceppo.

### **3.2.3 Identificazione molecolare di *Bacillus* spp**

Un isolato rappresentativo di ciascun profilo rep-PCR è stato identificato mediante analisi delle sequenze del gene dell'rRNA 16S. Per l'amplificazione è stata usata la coppia di inneschi P0/P16S-1541 (Di Cello *et al.* 1997, Oomes *et al.* 2007). Cinquanta microlitri di ogni miscela PCR contenevano 0,025U/µl di Taq DNA

polimerasi, 5µl di mix 10X del kit AccuPrime™ Pfx DNA polimerasi (Invitrogen, Life Technologies CA, USA), 0,3 µM di ciascun innesco e 1 µl di DNA.

Gli oligonucleotidi P<sub>0</sub> e P<sub>16S-1541</sub> usati per l'amplificazione del 16S rDNA sono localizzati alle estremità 5' e 3' del gene 16S Tabella 3.2).

L'amplificazione PCR è stata eseguita in un termociclatore GeneAmp PCR rRNA e la loro posizione rende possibile l'amplificazione di quasi tutto il gene (system 9700 (Perkin Elmer-Applied Biosystems) programmato come segue: una prima incubazione a 95°C per 5 minuti, 30 cicli con posti da 40 secondi a 95°C, 60 secondi a 53°C e 2 minuti a 72°C, seguiti da una estensione finale a 72°C per 10 minuti (Zheng *et al.*, 2008).

Un'aliquota (2µl) dei prodotti di amplificazione è stata analizzata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1% (p/vol) (Shelton Scientific) colorato con etidio bromuro (0,5 µg/ml). Il peso molecolare dei frammenti di DNA amplificati è stato stimato mediante comparazione con DNA di peso molecolare noto compreso tra 100 e 12000 bp (Gel Pilot 100 bp plus ladder Qiagen GmbH, Hilden, Germany). La purificazione del frammento di DNA amplificato, dai componenti della reazione PCR, è avvenuta utilizzando il kit QIAquick PCR Purification (Qiagen). La quantità e la qualità del DNA purificato sono state valutate mediante spettrofotometro ND 1000 (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA).

Il sequenziamento dei prodotti di PCR del 16S rDNA è stato effettuato utilizzando il "BigDye™ Terminator cycle sequencing kit" (Applied Biosystems) e gli inneschi P<sub>0</sub>, P<sub>6</sub>, P<sub>6 We16S2r</sub> ed il P<sub>5</sub> (Tabella 3.2). Le reazioni di sequenza sono state condotte in un volume di 5µl contenenti circa 15 ng di DNA purificato, l'innesco alla concentrazione 0,16 µM, 1µl del tampone e 1µl di mix del suddetto kit. La reazione di sequenza è stata eseguita in un termociclatore GeneAmp PCR system 9700 (Perkin Elmer-Applied Biosystems) programmato come segue: 25 cicli di 10 secondi a 96°C, 5 secondi a 50°C, 4 minuti a 60°C. I prodotti di reazione sono stati purificati utilizzando colonnine di Sephadex (5% p/vol, Sigma) ed analizzati con un sequenziatore automatico ABI Prism 3100 (Applied Biosystems). Le sequenze parziali sono state assemblate e comparate usando il software BioNumerics v. 5.1 (Applied Maths, Inc., Austin, Texas, USA). Le sequenze del 16S rDNA così ottenute sono state confrontate con le sequenze depositate in banca dati utilizzando il programma Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) disponibile attraverso il National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) allo scopo di identificare quelle che presentavano il livello di identità più elevato. I

diversi ceppi analizzati e da identificare sono stati attribuiti alle specie batteriche le cui sequenze del gene del 16S rRNA presentavano il più elevato livello d'identità (pari almeno al 97%) con le sequenze dei ceppi analizzati.

### 3.3 Risultati

#### 3.3.1 Isolamento e caratterizzazione di *Bacillus* spp.

L'analisi microbiologica dei 59 campioni di semola rimacinata di grano duro ha rilevato la presenza di contaminazione da spore di *Bacillus* nel 93,2% dei campioni. In particolare, il 57,6% ha presentato un livello di contaminazione nell'ordine di grandezza di  $10^0$  spore/g, il 13,6% di  $10^1$  spore/g, l'11,8% di  $10^2$  spore/g e il 10,2% di  $10^3$  spore/g. I dati riportati in Tabella 3.3 non indicano una influenza relazione tra varietà e livello di contaminazione, ma risulta evidente una variazione di contaminazione nel tempo nell'ambito della stessa varietà. Con riferimento alla tipologia tecnologica (semole o semole integrali), sembrerebbe esserci tendenza alla maggiore presenza di *Bacillus* spp. in semole integrali rispetto alle semole della corrispondente varietà negli anni 2006 e 2007. Il dato che risalta con maggiore evidenza è il picco di incidenza delle specie sporigene nell'anno 2006. Dalla figura 3.1 si osserva una maggiore frequenza di campioni con una carica batterica di ca.  $10^3$  spore/g.

Un totale di 119 colonie, prelevate sulla base della diversa morfologia, sono state trattate con una soluzione di iodio al fine di valutare la produzione di enzima  $\beta$ -amilasi, responsabile dell'idrolisi dell'amido. Tutte le 119 colonie sono risultate produrre l'enzima. Le colonie sono state successivamente caratterizzate mediante la tecnica rep-PCR. Prove preliminari condotte su 11 isolati per definire le migliori condizioni di amplificazione del DNA totale hanno indicato nell'oligonucleotide (GTG)<sub>5</sub> l'innescio in grado di fornire profili elettroforetici con il più elevato numero di frammenti significativi ai fini della discriminazione dei diversi ceppi. La rep-PCR ha permesso di individuare 31 profili (Tabella 3.1). I profili generati sono costituiti da un numero di frammenti compreso tra 6 e 27, di dimensioni che vanno da 70 bp a 7 kb. Un isolato rappresentativo di ciascun profilo rep è stato identificato tramite sequenziamento di un frammento del gene 16S rRNA di circa 1400 bp. Le sequenze ottenute hanno mostrato il 98-100% d'identità con quelle disponibili in banca dati, permettendo di attribuire i diversi ceppi alle specie corrispondenti, tutte appartenenti ai generi *Bacillus* e *Paenibacillus*. Le specie identificate sono state: *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. cereus*/*B. thuringensis*, *B. pumilus* e *B. simplex* e *B. mojavensis*. Per le specie *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* e *B. cereus*/*B. thuringensis* non è stato possibile ottenere un'identificazione univoca a causa dell'elevato livello di similarità delle sequenze del 16S rDNA. Per i 12 isolati

con profilo rep 2, è stato possibile accertare soltanto l'appartenenza al genere *Paenibacillus*, nonostante sia stata utilizzata una sequenza di 1380 bp per il confronto con quelle presenti in banca dati.

Nell'ambito della popolazione batterica studiata 63 isolati sono stati identificati come *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* ed associati a 10 diversi profili rep (profili numero **1, 5, 7, 8, 11, 15, 22, 26, 27 e 30**) (Figura 3.2). I 25 isolati identificati come *B. cereus*/*B. thuringensis* sono stati distinti con 9 profili rep (**6, 9, 12, 13, 14, 17, 18, 19 e 25**). Cinque diversi profili rep (**10, 21, 23, 29 e 31**) sono stati associati ai 10 isolati batterici identificati come *B. licheniformis*, mentre 3 diversi profili rep (**4, 20 e 28**) sono stati associati a 3 isolati identificati come *B. pumilus*. I profili **3 e 16** corrispondevano ciascuno a cinque isolati identificati come *B. simplex*, mentre il profilo **24** era associato ad 1 solo isolato, identificato come *B. mojavensis*.

La specie *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* è stata isolata dal 62,7% dei campioni esaminati mentre *B. cereus*/*B. thuringensis*, *B. licheniformis* sono stati trovati rispettivamente nel 23,7% e 16,9% delle semole analizzate (Tabella 3.4). Il genere *Paenibacillus* spp. è stato isolato dall'11,9% dei campioni di semola, tutti relativi all'annata 2006. *B. pumilus* e *B. simplex* sono stati isolati da tre campioni, mentre *B. mojavensis* da un solo campione (Tabella 3.4). La distribuzione delle specie all'interno dei campioni analizzati risulta essere indipendente sia dall'origine che dall'annata in cui sono state prodotte le semole (Tabella 3.1).

### 3.4 Discussione

Il presente studio ha avuto lo scopo di indagare la presenza di *Bacillus* spp. in semole rimacinate di grano duro provenienti da diverse zone della Puglia ed impiegate nella produzione del pane di Altamura (DOP). Gli isolati ottenuti sono stati caratterizzati ed identificati al fine di fornire una indicazione sulla diffusione delle principali specie (*B. subtilis* e *B. licheniformis*) responsabili del “pane filante”. I risultati hanno evidenziato che solo una minima parte (ca. 7%) dei campioni è privo di contaminazione. I valori di spore/g ottenuti compresi tra 1 e  $5,4 \times 10^3$ , presenti nel 93,6% dei campioni, sono dello stesso ordine di grandezza di quelli riportati in analoghi studi condotti su farine di frumento (Aydin *et al.*, 2009). Valori analoghi sono stati ottenuti anche in uno studio eseguito da Berghofer *et al.* (2003) su farine di frumento australiane. Gli autori hanno osservato che, sebbene durante la macinazione la carica microbica naturalmente presente sul grano si riduce a causa dell'eliminazione degli strati più esterni delle cariossidi, la qualità microbiologica delle farine è strettamente dipendente dalla carica batterica presente sul grano di origine. Inoltre è stato osservato il rischio di contaminazioni secondarie delle farine dovute alla presenza di microrganismi sulle attrezzature impiegate nei processi di molitura.

I valori di carica sporigena riscontrati nella maggior parte dei campioni di semole rimacinate di grano duro esaminati sono inferiori a  $10^4$  spore/g, ma potrebbero comunque causare, nelle opportune condizioni di temperatura ed umidità, il deterioramento del pane. Infatti alcuni studi hanno riportato che anche bassi valori di contaminazione delle farine ( $10^0$ - $10^2$  spore/g), da parte soprattutto di *B. subtilis* e *B. licheniformis*, possono portare a valori di  $10^7$  ufc/g nel pane dopo 2 gg di conservazione con conseguente deterioramento del prodotto (Rosenkvist e Hansen, 1995).

Nel corso del presente lavoro la diversità genetica degli isolati è stata studiata mediante la tecnica rep-PCR. E' stato possibile distinguere 31 diversi ceppi all'interno della comunità batterica isolata. Dal confronto tra i risultati ottenuti dalla caratterizzazione dei diversi ceppi mediante rep-PCR e l'identificazione delle specie mediante sequenziamento del gene 16S rRNA, è stato possibile osservare che la specie *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* è la più diffusa tra i campioni esaminati (62,7%) ed è presente anche con un maggior numero di ceppi (Tabella 3.4). *B. licheniformis* è insieme al *B. subtilis* la specie principalmente coinvolta nell'alterazione del pane filante, ed è presente nel 16,9% dei campioni esaminati.

Inoltre la presenza di isolati della specie *B. cereus/B. thuringensis* nel 23,7% delle semole analizzate sottolinea l'importanza di verificare costantemente la qualità delle farine per evitare l'insorgenza di fenomeni di tossinfazioni alimentari. Un aspetto interessante è il ritrovamento nel 2006 di batteri sporigeni non appartenenti al genere *Bacillus*, ma al vicino genere *Paenibacillus* (Tabella 3.1). E' ipotizzabile che un particolare andamento climatico (per esempio caldo-umido e piovoso), specialmente in vicinanza della mietitura abbia potuto determinare nel 2006 una maggiore proliferazione e diffusione di questi batteri e anche una variazione nel rapporto della popolazione di *Bacillus* spp e quella di *Paenibacillus* (McSpadden Gardener, 2004; Ramos *et al.*, 1998).

Per le specie *B. subtilis/B. amyloliquefaciens* e *B. cereus/B. thuringensis* non è stato possibile ottenere un'identificazione univoca, nonostante sia stato amplificato un frammento del gene 16S rRNA di ca. 1400 bp, a causa dell'elevato livello di similarità tra le sequenze del 16S rDNA delle specie *B. subtilis* e *B. amyloliquefaciens* e delle specie *B. cereus* e *B. thuringensis*. La specie *B. pumilus*, presente solo nel 5% circa dei campioni è stata recentemente inserita tra le specie agenti del "pane filante" (Sorokulova *et al.*, 2003; Pepe *et al.*, 2003), mentre le altre specie rinvenute nelle semole pugliesi non risultano, sulla base di quanto conosciuto finora, tra quelle capaci di causare il suddetto processo alterativo. Gli studi proseguiranno per accertare se anche esse possono determinare nel pane processi alterativi.

I dati ottenuti sottolineano l'importanza di effettuare un costante monitoraggio della qualità delle partite di grano e dei livelli igienici delle attrezzature impiegate nei processi di molitura per evitare il rischio di contaminazioni nel pane.

**Tabella 3.1.** Campioni di semola rimacinata di grano duro analizzati e loro caratteristiche.

Campioni	Varietà	Annata	Origine geografica	N° isolati esaminati	Specie (N° di ceppi)	N° profilo rep-PCR (n° isolati)
N 2	Appulo	2004	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(2)
N 5	Appulo	2004	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (2)	7(2)-26(1)
N 3	Simeto	2004	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	26(2)
N 7	Simeto	2004	Altamura	4	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (2)	1(3)-11(1)
N 1	Arcangelo	2005	Altamura	-	-	-
N 6	Arcangelo	2005	Altamura	-	-	-
N 4	Duilio	2005	Altamura	-	-	-
N 8	Duilio	2005	Altamura	4	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	7(4)
N 21	Svevo	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	12(1)-15(1)
N 22	Svevo	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	12(1)-15(1)
N 25	Ciccio	2005	Altamura	4	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1) <i>B.licheniformis</i> (1)	7(1)-12(2)-31(1)
N 27	Ciccio	2005	Altamura	1	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	7(1)

Continua nella pagina successiva...



...Continua dalla pagina precedente

Campioni	Varietà	Annata	Origine geografica	N° isolati esaminati	Specie (N° di ceppi)	N° profilo rep-PCR (n° isolati)
S 102	NR	2005	Candela	1	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(1)
S 66	NR	2005	Mestre	2	<i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	14(2)
S 67	NR	2005	Altamura	7	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (3) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (2)	1(1)-9(1)-14(2)-27(2)-34(1)
N 43	Svevo integrale	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	1(1)-18(1)
N 46	Svevo integrale	2005	Altamura	1	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(1)
N 44	Ciccio integrale	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	1(1)-18(1)
N 47	Ciccio integrale	2005	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(3)
N 45	Appulo integrale	2005	Altamura	1	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(1)
N 48	Appulo integrale	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(2)
N 9	Simeto-duilio	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (2)	1(1)-7(1)
N 18	Simeto-duilio	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	7(1)-12(1)
N 10	Simeto-Appulo	2005	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B.licheniformis</i> (1)	1(2)-10(1)

Continua nella pagina successiva...

...Continua dalla pagina precedente

Campioni	Varietà	Annata	Origine geografica	N° isolati esaminati	Specie (N° di ceppi)	N° profilo rep-PCR (n° isolati)
N 20	Simeto-Appulo	2005	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (3)	<b>7(1)-30(1)-32(1)</b>
N 11	Simeto-Arcangelo	2005	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (2)	<b>1(2)-7(1)</b>
N 19	Simeto-arcangelo	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	<b>1(2)</b>
N 13	Appulo-Arcangelo	2005	Altamura	2	<i>B. licheniformis</i> (1)	<b>29(1)</b>
N 14	Duilio-Arcangelo	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	<b>1(1)</b>
N 16	Duilio-arcangelo	2005	Altamura	4	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	<b>1(2)-13(2)</b>
N 15	Duilio-appulo	2005	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	<b>11(3)</b>
N 17	Duilio-appulo	2005	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (2)	<b>1(1)-15(1)</b>
N 49	Appulo	2006	Altamura	2	<i>Paenibacillus</i> spp.	<b>2(2)</b>
N 51	Simeto	2006	Altamura	2	<i>Paenibacillus</i> spp.	<b>2(2)</b>
N 54	Svevo	2006	Altamura	2	<i>Paenibacillus</i> spp.	<b>2(2)</b>
N 50	Ciccio	2006	Altamura	2	<i>Paenibacillus</i> spp.	<b>2(2)</b>
S 59	NR	2006	Candela	1	<i>Paenibacillus</i> spp.	<b>2(1)</b>

Continua nella pagina successiva...

...Continua dalla pagina precedente

Campioni	Varietà	Annata	Origine geografica	N° isolati esaminati	Specie (N° di ceppi)	N° profilo rep-PCR (n° isolati)
S 60	NR	2006	Candela	1	<i>B. licheniformis</i> (1)	10(1)
S 61	NR	2006	Candela	1	<i>B. licheniformis</i> (1)	10(1)
S 64	NR	2006	Candela	1	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(1)
S 78	integrale	2006	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(2)-35(1)
S80	integrale	2006	Altamura	4	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (2) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	1(1)-7(1)-13(2)
S 82	NR	2006	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	1(1)-9(2)
S 83	NR	2006	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. pumilus</i> (1)	1(2)-4(1)
S 85	NR	2006	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(2)
S 87	NR	2006	Altamura	2	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	1(2)
N 57	Svevo integrale	2006	Altamura	2	<i>B. simplex</i>	3(2)
N 53	Ciccio integrale	2006	Altamura	2	<i>Paenibacillus</i> spp. <i>B. licheniformis</i> (1)	2(1)-10(1)
N 52	Appulo integrale	2006	Altamura	2	<i>Paenibacillus</i> spp.	2(2)
N 60	Simeto	2007	Altamura	2	<i>B. licheniformis</i> (1) <i>B. pumilus</i> (1)	10(1)-28(1)

Continua nella pagina successiva...

...Continua dalla pagina precedente

Campioni	Varietà	Annata	Origine geografica	N° isolati esaminati	Specie (N° di ceppi)	N° profilo rep-PCR (n° isolati)
N 58	Duilio	2007	Altamura	2	<i>B. simplex</i> (1) <i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1).	<b>3(1)-25(1)</b>
N 65	Svevo	2007	Altamura	2	<i>B. simplex</i>	<b>37(2)</b>
N 64	Ciccio	2007	Altamura	-	-	-
N 62	Claudio	2007	Altamura	1	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1)	<b>1(1)</b>
N 59	Duilio integrale	2007	Altamura	1	<i>B. cereus/B. thuringensis</i> (1)	<b>17(1)</b>
N 61	Simeto integrale	2007	Altamura	4	<i>B. cereus/B. thuringensis</i> (3)	<b>6(1)-17(2)-18(1)</b>
N 63	Claudio integrale	2007	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. pumilus</i> (1)	<b>1(2)-36(1)</b>
N 66	NR	2008	Altamura	2	<i>B. licheniformis</i> (2)	<b>38(1)-39(1)</b>
N 67	NR	2008	Altamura	3	<i>B. subtilis/B. amiloliquefaciens</i> (1) <i>B. licheniformis</i> (1) <i>B. mojavensis</i> (1)	<b>10(1)-22(1)-40(1)</b>

**Tabella 3.2.** Sequenza nucleotidica e relativa posizione sul gene del 16S rRNA di *Escherichia coli* dei diversi inneschi utilizzati per amplificare e sequenziare parte del gene 16S rRNA dei ceppi rappresentativi dei 31 profili rep.

Inneschi	Sequenza	Posizione sul 16S rRNA di <i>E. coli</i>
P0	5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	27 F
P5	5'-AAGGAATTGACGGGGGC-3'	930 F
P6	5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'	1495 R
P6 <sub>We16S2R</sub>	5'-AACCCAACATCTCACGACA-3'	1073 R
P <sub>16S-1541</sub>	5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'	1541 R

**Tabella 3.3.** Contaminazione da parte di batteri sporigeni dei campioni di semole e semole integrali di diverse varietà (annate 2004-2007).

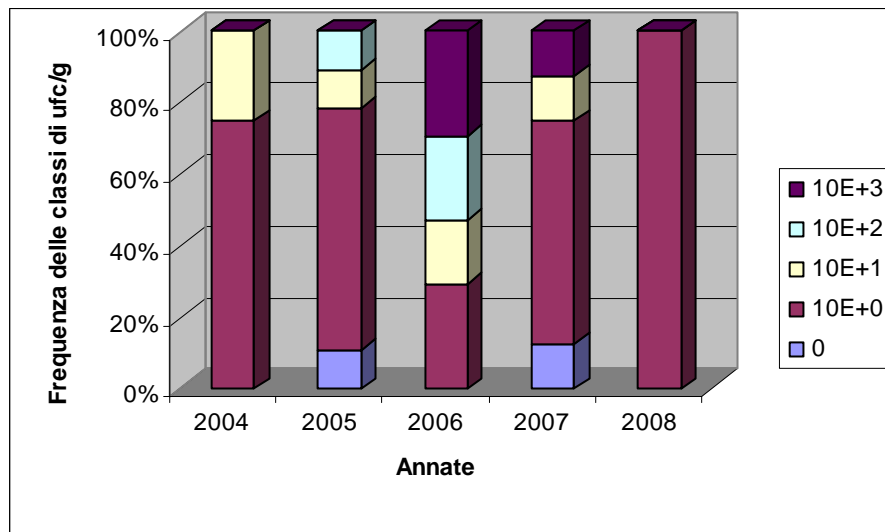
Varietà	Semole (spore/g) <sup>a</sup>				Semole integrali (spore/g) <sup>a</sup>			
	2004	2005	2006	2007	2004	2005	2006	2007
Appulo	1,9 (n=2) <sup>b</sup>		4,2x10 <sup>2</sup> (n=1)			2,8 (n=2)	4x10 <sup>3</sup> (n=1)	
Simeto	30,6 (n=2)		1,5x10 <sup>3</sup> (n=1)	1 (n=1)				
Arcangelo		0 (n=2)						3,5x10 <sup>3</sup> (n=1)
Duilio		32,5 (n=2)		2 (n=1)				
Svevo		1 (n=2)	2,7x10 <sup>3</sup> (n=1)	1 (n=1)		1,6 (n=2)	1 (n=1)	3x10 (n=1)
Ciccio		1,1 (n=2)	5,6x10 <sup>2</sup> (n=1)	0 (n=1)		1,3 (n=2)	5,4x10 <sup>3</sup> (n=1)	
Claudio				1 (n=1)				

<sup>a</sup> Valore medio delle spore/g

<sup>b</sup> (n=numero di campioni esaminati).

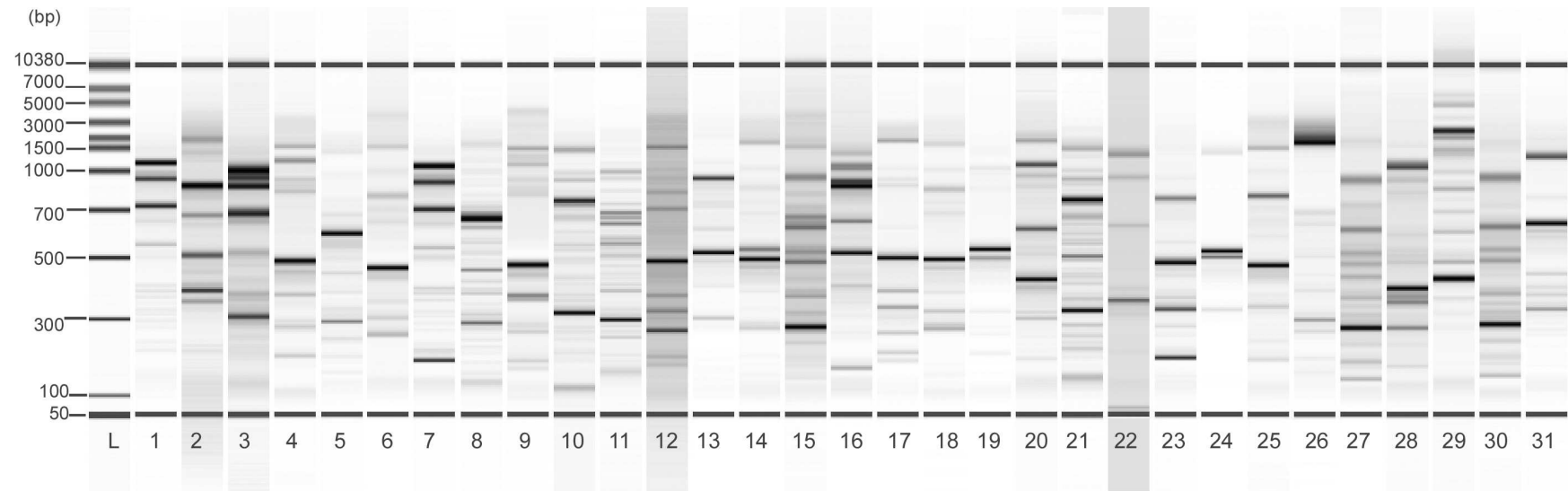
**Tabella 3.4.** Specie di batteri sporigeni (*Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp.) isolate dai 59 campioni di semola rimacinata e semola integrale di grano duro.

<b>Specie</b>	<b>% di semole contaminate</b>	<b>% degli isolati della specie rispetto al totale</b>	<b>N° di profili rep associati alla specie</b>
<i>B.subtilis/B.amyloliquefaciens</i>	62,7	52,9	10
<i>B. cereus/B. thuringensis</i>	23,7	21,0	9
<i>B. licheniformis</i>	16,9	8,4	5
<i>B. pumilus</i>	5,1	2,5	3
<i>B. simplex</i>	5,1	4,2	2
<i>Paenibacillus</i> spp.	11,9	10,1	1
<i>B. mojavensis</i>	1,7	0,8	1



**Figura 3.1.** Frequenza (%) del livello di contaminazione da batteri sporigeni (spore/g) in campioni di semole e semole integrali (annate 2004-2008) della zona della Murgia pugliese.





**Figura 3.2.** Profili rep-PCR ottenuti dall'amplificazione del DNA degli isolati di batteri sporigeni (*Bacillus* spp. e *Paenibacillus* spp.) ottenuti dai 59 campioni di semole rimacinate e semole integrali di grano duro. I profili sono stati ottenuti con l'oligonucleotide (GTG)<sub>5</sub> visualizzati come immagine gel-simile mediante bioanalizzatore Agilent 2100. L: standard di riferimento con frammenti in bp (DNA 100 ladder, Agilent Technologies).

## **BIBLIOGRAFIA**

- ARTI-Puglia (2008). La domanda di innovazione della filiera agroalimentare in Puglia. Quaderni ARTI n. 15. Agenzia regionale per la tecnologia e l'innovazione, Valenzano (BA).
- Asano S. I., Nukumizo Y., Bando H., Hzuka T. (1997). Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1054-1057.
- Axelsson L. T. (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In*: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (ed.), *Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects*. 2<sup>a</sup> edizione. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA. Pp.1-66.
- Aydin A., Paulsen P., Smulders F. J. M. (2009). The physico-chemical and microbiological properties of wheat flour in Thrace. *Turk J. Agric. For.* 33: 445-454
- Bailey C. P., von Holy A. (1993). *Bacillus* spore contamination associated with commercial bread manufacture. *Food Microbiol.* 10: 287-294.
- Berghofer L. K., Hocking A. D., Miskelly D., Jansson E. (2003). Microbiology of wheat and flour milling in Australia. *Int. J. Food Microbiol.* 85: 137–149.
- Björkroth J., Holzapfel W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. *In*: Dworkin M. (ed.), *The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*, Vol. 4. 3<sup>a</sup> ed. Springer-Verlag, New York, NY, USA. Pp. 267 -319.
- Brul S., Coote P. (1999). Preservative agents in foods – Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 1-17.
- Brumlik M. J., Szymajda U., Zakowska D., Liang X., Redkar R. J., Del Vecchio V. G., (2001). Use of long-range repetitive element polymorphism-PCR to differentiate *Bacillus anthracis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3021-3028.
- Busch U., Nitschko H. (1999). Methods for the differentiation of microorganisms. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* 722: 263-278.
- Caplice E., Fitzgerald G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50: 131-149.
- Chen K., Neimark H., Rumore P., Steinman C. R., (1989). Broad-range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 57: 19–24.
- Cherif A., Brusetti L., Borin S., Rizzi A., Boudabous A., Khyami-Horani H., Daffonchio D., (2003). Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-

- PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1108-1119.
- Christensen C. M. (1951). Fungi in and on wheat seed. *Cereal Chem.* 28: 408-415.
- Christensen C. M., Cohen M. (1950). Numbers, kinds, and source of molds in flour. *Cereal Chem.* 27: 178-185.
- Cicognani G., Pedretti C., Cerrato A. (1975). Caratteristiche microbiologiche delle farine di frumento. *Industrie Alimentari.* 14: 60-64.
- Coda R., Rizzello C. G., Nigro F., De Angelis M., Arnault P., Gobbetti M. (2008). Long-Term Fungal Inhibitory Activity of Water-Soluble Extracts of *Phaseolus vulgaris* cv. Pinto and Sourdough Lactic Acid Bacteria during Bread Storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 7391-7398.
- Codex Alimentarius Standard (1995). Codex Standard for wheat flour. Codex Standard 152-1985, Rev.1-1995. FAO, Roma.
- Collins N. E., Kirschner L. M., von Holy A. (1991). Characterization of *Bacillus* isolated from ropey bread, bakery equipment and raw material. *South Afr. J. Sci.* 87: 62-66.
- Cook F. K., Johnson B. L. (2009). Microbiological spoilage of cereal products. *In: Sperber W. H. e Doyle M. P. (ed.), Compendium of the microbiological spoilage of foods and beverages. Food microbiology and Food Safety. Springer, New York, NY, USA. Pp. 223-244.*
- Corsetti A., Gobbetti M., Smacchi E. (1996). Antimicrobial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiol.* 13: 447-456.
- Corsetti A., Gobbetti M., Balestrieri F., Paoletti F., Russi L., Rossi J. (1998a). Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *J. Food Sci.* 63: 347:351.
- Corsetti A., Gobbetti M., Rossi J., Damiani P. (1998b). Anti- mould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 253–256.
- 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. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 95–104.

- Corsetti A., De Angelis M., Dellaglio F., Paparella A., Fox P. F., Settanni L., Gobbetti M. (2003). Characterization of sourdough lactic acid bacteria based on genotypic and cell-wall protein analyses. *J. Appl. Microbiol.* 94: 641-654.
- Corsetti A., Settanni L., López C. C., Felis G. E., Mastrangelo M. M., Suzzi G. (2007). A taxonomic survey of lactic acid bacteria isolates from wheat (*Triticum durum*) kernels and non-conventional flours. *Syst. Appl. Microbiol.* 30:561–571.
- Coudeyras S., Marchandin H., Fajon C., Forestier C. (2008). Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus* 35 within the *Lactobacillus casei* Group. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2679-2689.
- Dal Bello F., Clarke C. I., Ryan L. A. M., Ulmer H., Schober T. J., Ström K. (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* 45: 309–318.
- De Muynck C., Leroy A. I. J., De Maeseneire S., Arnaut F., Soetaert W., Vandamme E. J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiol. Res.* 159: 339-346.
- De Vuyst L., Leroy F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 13: 194-1999.
- De Vuyst L., Neysens P. (2005). The sourdough microflora: biodiversity and metabolic interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 43–56.
- De Vuyst L., Vandamme E. J. (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications. Blackie Academic and Professional, London, UK.
- De Vuyst L., Schrijvers V., Paramithiotis S., Hoste B., Vancanneyt M., Swings J., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., Messens W. (2002). The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 6059–6069.
- Decreto Ministeriale n. 312 , 13 luglio 1998. Regolamento recante norme per il trattamento con alcool etilico del pane speciale confezionato. GU n. 200 del 28/08/1998.
- Di Cagno R., De Angelis M., Lavermicocca P., De Vincenti M., Giovannini C., Faccia M., Gobbetti M. (2002). Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects

- on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 623-633.
- Di Cello F. P., Bevivino A., Chiarini L., Fani R., Paffetti D., Tabacchioni S., Dalmastrì C. (1997). Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from maize rhizosphere at different plant growth stages. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4485–4493.
- Direttiva 1995/2/CE. Direttiva riguardante gli additivi alimentari diversi da coloranti e dolcificanti. GU Serie n. L 61 del 18/03/1995.
- Doerry W. T. (1990). Water activity and safety of baked products. American Institute of Baking Research Department Technical Bulletin. 12: 6.
- El-Nezami H., Mykkänen H., Haskard C., Salminen S., Salminen E. (2004). Lactic acid bacteria as a tool for enhancing food safety by removal of dietary toxins. *In: Salminen S., von Wright A., Ouwehand A. (ed.), Lactic Acid Bacteria - Microbiology and functional aspects.* Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA. Pp. 397-406.
- Ennahar S., Sonomoto K., Ishizaki A. (1999). Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. *J. Biosci. Bioeng.* 87: 705-716.
- Eyles M. J., Moss R., Hocking A. D. (1989). The microbiological status of Australian flour and the effects of milling procedures on the microflora of wheat and flour. *Food Australia.* 41: 704-708.
- Fayol-Messaoudi D., Berger C. N., Coconnier-Polter M. H., Liévin-Le Moal V., Servin A. L. (2005). pH-, lactic acid, and non-lactic acid dependent activities of probiotic lactobacilli against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6008–6013.
- Feord J. (2002). Lactic acid bacteria in a changing legislative environment. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 82: 353- 360.
- Florjanowicz T. (2001). Antifungal activity of some microorganisms against *Penicillium expansum*. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 282-286.
- Fretzdorff B., Brummer J. M. (1992). Reduction of phytic acid during breadmaking of whole-meal bread. *Cereal Chem.* 69: 266-270.
- Galli A., Franzetti L. (1987). Ricerche sulla composizione microbiologica della farina di grano tenero. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 1: 73-80.
- Galli A., Franzetti L., Fortina M. G. (1988). Isolation and identification of sour dough microflora. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* 6: 345-351.

- Gänzle M. G. (1998). Useful Properties of Lactobacilli for Application as Protective Cultures in Food. PhD thesis, University of Hohenheim. Germany.
- George M. L. C., Bustamam M., Cruz W. T., Leach J. E., Nelson R. J. (1997). Movement of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in south-east Asia detected using PCR-based DNA fingerprinting. *Phytopathology*. 87: 302-309.
- Gerez C. L., Torino M. I., Rollán G., Font de Valdez G. (2009). Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control*. 20: 144–148.
- Gillings M., Holley M. (1997). Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Lett. Appl. Microbiol.* 25: 17-21.
- Gobbetti M., Simonetti M. S., Corsetti A., Santinelli F., Rossi J., Damiani P. (1995). Volatile compound and organic acid productions by mixed wheat sour dough starters: influence of fermentation parameters and dynamics during baking. *Food Microbiol.* 12: 497-507.
- Gobbetti M., Smacchi E. Corsetti A. (1996). The proteolytic system of *Lactobacillus sanfrancisco* CB1: purification and characterization of a proteinase, a dipeptidase, and an aminopeptidase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3220-3226.
- Gould G. W. (1996). Methods for preservation and extension of shelf life. *Int. J. Food Microbiol.* 33: 51-64.
- Gourama H., Bullerman L. B. (1997). Anti-aflatoxigenic activity of *Lactobacillus casei pseudoplantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 34: 131-143.
- Hammes W. P., Gänzle M. G. (1998). Sourdough breads and related products. In: Wood B. J. B. (ed), *Microbiology of Fermented Food*, Vol. 1. Blackie Academic and Professional, London, UK. Pp 199-216.
- Hammes W. P., Hertel C. (2003). The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K. H., Stackebrandt E. (ed.), *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community*, release 3.15. <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>. Springer-Verlag, New York, NY, USA.
- Hammes W. P., Stolz P., Gänzle M. (1996). Metabolism of lactobacilli in traditional sourdoughs. *Advances in Food Science*. 18: 176-184.
- Hazan R., Levine A., Abeliovich H. (2004). Benzoic acid, a weak organic acid food preservative, exerts specific effects on intracellular membrane trafficking

- pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 70: 4449-4457.
- Hurrigan W. F., McCance M. E. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London, UK.
- Hyytia-Trees E., Lyhs U., Korkeala H., Björkroth J. (1999). Characterisation of ropy slime-producing *Lactobacillus sakei* using repetitive element sequence-based PCR. Int. J. Food Microbiol. 50: 215-219.
- ICMSF (1998). Microorganisms in Foods: 6 Microbial Ecology of Food Commodities. Blackie Academic and Professional, London. Pp. 313-346.
- Jay J. M. (1996). Modern food microbiology. Chapman and Hall, Londra, UK.
- Kirschner L. M., von Holy A. (1989). Rope spoilage of bread. South Afr. J. Sci. 85: 425-427.
- Klaenhammer T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie. 70: 337-349.
- Kline L., Sugihara T. F. (1971). Microorganisms of San Francisco sourdough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. Appl. Environ. Microbiol. 21:456-465.
- Kostinek M., Specht I., Edward V. A., Pinto C., Egounlety M., Sossa C., Mbugua S., Dortu C., Thonart P., Taljaard L., Mengu M., Franz C. M. A. P., Holzapfel W. H. (2007). Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. Int. J. Food Microbiol. 114: 342-351.
- Kramer J. M., Gilbert R. J. (1989). *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. In: Doyle M. P. (ed.), Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York, NY, USA. Pp. 22-70.
- Krebs H. A., Wiggins D., Stubbs M., Sols A., Bedoya F. (1983). Studies on the mechanism of the antifungal action of benzoate Biochem. Journal. 214: 657-663
- Laitila A., Alakomi H. L., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Haikara A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium moulds* in vitro and in malting of barley. J. Appl. Microbiol. 93: 566-576.
- Lavermicocca P., Valerio F., Evidente A., Lazzaroni S., Corsetti A., Gobbetti M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4084-4090.



- Lavermicocca P., Valerio F., Visconti A. (2003). Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 634–640.
- Lavermicocca P., Valerio F., Lonigro S. L., De Angelis M., Morelli L., Callegari M. L., Rizzello C. G., Visconti A. (2005). Study of Adhesion and Survival of Lactobacilli and Bifidobacteria on Table Olives with the Aim of Formulating a New Probiotic Food. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4233-4240.
- Lavermicocca P., Valerio F., Foschino R. (2010). La contaminazione microbica e le infezioni virali nei prodotti lievitati da forno. *In: Gobbetti M. e Corsetti A (ed.), Biotecnologie dei prodotti lievitati da forno. In corso di stampa*
- Legan J. D. (1987). Bakery hygiene: a practical approach. *FMBRA Bull.* 5: 188-197.
- Legan J. D. (1993). Mould spoilage of bread: the problem and some solutions. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 32: 33-53.
- Legan J. D. (1994). Spoilage of bakery products and confectionery. *PHLS Microbiology Digest.* 11: 114-117.
- Legan, J. D., Voysey, P. A. (1991). Yeast spoilage of bakery products and ingredients. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 361-371.
- Leroy F., De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67-78
- Leroy F., Verluyten J. De Vuyst L. (2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 270-285.
- Lindgren S. E., Dobrogosz W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-163.
- Louws F. J., Schneider M., de Bruijn F. J. (1996). Assessing genetic diversity of microbes using repetitive sequence-based PCR (rep-PCR). *In: Toronzos G., (ed.), Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples. Technomic Publishing Co., Lancaster, PA, USA. Pp. 63-94.*
- Louws F. J., Rademaker J. L. W., de Bruijn F. J. (1999). The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: diversity, detection, and disease diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 37: 81-125.
- Magnusson J. (2003). Antifungal Lactic acid Bacteria. PhD thesis. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Magnusson J., Schnürer J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad-spectrum proteinaceous antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 1-5.

- Makanjuola D. B., Tymon A., Springham D. G. (1992). Some Effects of Lactic-Acid Bacteria on Laboratory-Scale Yeast Fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 14: 350-357.
- Makras L., Triantafyllou V., Fayol-Messaoudi D., Adriany T., Zoumpopoulou G., Tsakalidou E., Servin A., De Vuyst L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res.Microbiol.* 157: 241–247.
- Marin S., Guynot M. E., Neira P., Bernado M., Sanchis V., Ramos A. J. (2002). Risk assessment of the use of sub-optimal levels of weak acid preservatives in the control of mould growth on bakery products. *Int. J. Food Microbiol.* 79: 203-211.
- McSpadden Gardener B. B. (2002). Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in agricultural systems. *Phytopathology.* 94:1252-1258.
- Meroth C. B., Walter J., Hertel C., Brandt M., Hammes W. P. (2003). Monitoring the bacterial population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 475-482.
- Messens\ W., De Vuyst L. (2002). Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs – A review. *Int. J. Food Microbiol.* 72: 31-43.
- Miller H. E. , Rigelhof F., Marquart L., Prakash A., Kauter M. (2000). Whole-Grain Products and Antioxidants. *Cereal Foods World.* 45: 59-65.
- Narendranath N. V., Thomas K. C., Ingledew W. M. (2001a). Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanisms. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59: 187-194.
- Narendranath N. V., Thomas K. C., Ingledew W. M. (2001b). Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26: 171-177.
- Nicholson P., Rezanoor H. N., (1994). The use of random amplified polymorphic DNA to identify pathotype and detect variation in *Pseudocercospora herpotrichoides*. *Mycol. Res.* 98: 13-21.
- Niku-Paavola M. L., Laitila A., Mattila-Sandholm T., Haikara A. (1999). New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 86: 29-35.

- Okkers D. J., Dicks L. M., Silvester M., Joubert J. J., Odendaal H. J. (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 87: 726-734.
- Onno B., Roussel P. (1994). Technologie et microbiologie de la panification au levain. *In: de Roissart H., Luquet F. M. (ed), Bactéries Lactiques, vol. II. Loriga, Grenoble, Francia. Pp. 293–321:*
- Oomes S. J. C. M., van Zuijlen A. C. M., Hehenkamp J. O., Witsenboer H., van der Vossen J. M. B. M., Brul S. (2007). The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *Int. J. Food Microbiol.* 120: 85-94
- Ottogalli G., Galli A. (1979). Microbiological quality of flours sour dough for bakery products and spaghetti. *In: Jarvis B., Christian J. H. B., Michener H. (ed.), Food Microbiology and Technology. Proceedings of the International Meeting on Food Microbiology and Technology, Tabiabo (Parma) Italy, April 20–23, 1978. Medicinia Viva, Parma, Italy Pp. 141– 153.*
- Ottogalli G., Galli A., Foschino R. (1996). Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora. *Advances in Food Science.* 18: 131-144.
- Pattison T. L., Lindsay D., von Holy A. (2004). Natural antimicrobials as potential replacements for calcium propionate in bread. *South Afr. J. Sci.* 100: 342-348.
- Pepe O., Blaiotta G., Moschetti G., Greco T., Villani F. (2003). Rope-producing strains of *Bacillus* spp. From wheat bread and strategy for their control by lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2321-2329.
- Picchi G. (2000). Atlante dei prodotti tipici: il pane. Agra Editrice e Rai-Eri, Roma.
- Piper P., Mahe Y., Thompson S., Pandjaitan R., Holyoak C., Egner R., Muhlbauer M., Coote P., Kuchler K. (1998). The Pdr12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *Embo Journal.* 17: 4257-4265.
- Piper P., Calderon C. O., Hatzixanthis K., Mollapour M. (2001). Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology.* 147: 2635-2642.
- Plumridge A., Hesse S. J. A., Watson A. J., Lowe K. C., Stratford M., Archer D. B. (2004). The weak acid preservative sorbic acid inhibits conidial germination

- and mycelial growth of *Aspergillus niger* through intracellular acidification. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 3506-3511.
- Ponte J. G., Tsen C. C. (1978). Bakery products. *In*: Beuchat L. R. (ed.), *Food and Beverage Mycology*. AVI Publishing Co. Westport, CT, USA. Pp. 191-223.
- Potus e Suchet 1989Potus J., Suchet P. (1989). Les problèmes de microbiologie en meunerie (Microbiological problems in milling). *Industries des Cereales.* 58: 27-33.
- Quaglia G. (1984). *Scienza e tecnologia della panificazione*. Chirotti Editori, Pinerolo (TO).
- Ramos B., Pozuelo J. M., Acero N., Gutiérrez Mañero F. J. (1988) Seasonal variations of *Bacillus* isolated from the rhizosphere of *Elaeagnus angustifolia* L. *Orsis.* 13: 7-16.
- Regolamento (CE) N. 1881/2006 della Commissione, 19 dicembre 2006. Regolamento che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. GU Serie L n. 364/5 del 20/12/2006.
- Relman D. A. (1999). The search for unrecognized pathogens. *Science.* 284: 1308–1310.
- Ricciardi A., Parente E., Piraino P., Paraggio M., Romano P. (2005). Phenotypic characterization of lactic acid bacteria from sourdoughs for Altamura bread produced in Apulia (Southern Italy). *Int. J. Food Microbiol.* 98:63–72.
- Rizzello C. G., Coda R., De Angelis M., Di Cagno R., Carnevali P., Gobbetti M. (2009). Long-term fungal inhibitory activity of water-soluble extract from *Amaranthus* spp. seeds during storage of gluten-free and wheat flour breads. *Int. J. Food Microbiol.* 131: 189-196.
- Rocken W. (1996). Applied aspects of sourdough fermentation. *Adv. Food Sci.* 18:212–216.
- Rosenkvist H., Hansen Å (1995). Contamination profiles and characterisation of *Bacillus* species in wheat bread and raw materials for bread production. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 353-363.
- Roy U., Batish V. K., Grover S., Neelakantan S. (1996). Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. *Int. J. Food Microbiol.* 32: 27-34.
- Samson R. A., Hoekstra E. S., van Oorschot C. A. N. (1995). *Introduction to food-borne fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Olanda.

- Scheirlinck I., Van der Meulen R., Van Schoor A., Vancanneyt M., De Vuyst L., Vandamme P., Huys G. (2007). Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional belgian sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 6262-6269.
- Scheirlinck I., Van der Meulen R., Van Schoor A., Vancanneyt M., De Vuyst L., Vandamme P., Huys G. (2008). Taxonomic structure and stability of the bacterial community in belgian sourdough ecosystems as assessed by culture and population fingerprinting. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2414-242.
- Schillinger U., Geisen R., Holzapfel W. H. (1996). Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Technol.* 7: 158-164.
- Schnürer J., Magnusson J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 16: 70-78.
- Schweninger S. M., van Ah U., Niederer B., Teuber M., Meile L. (2005). Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *J. Food Prot.* 68: 111-119.
- Sjögren J. (2005). Bioassay-guided Isolation and Characterisation of Antifungal Metabolites. PhD thesis, Swedish Agricultural University.
- Sjögren J., Magnusson J., Broberg A., Schnürer J., Kenne L. (2003). Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 7554-7557.
- Smith J. P., Daifas D. P., El-Khoury W., Koukoutsis J., El-Khoury A. (2004). Shelf-life and safety concerns of bakery products – A review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 19-55.
- Sockett P. N. (1991). Food poisoning outbreaks associated with manufactured foods in England and Wales: 1980-89. *Communicable Disease Report* 1, R105-R109.
- Sorokulova I. B., Reva O. N., Smirnov V. V., Pinchuk I. V., Lapa S. V., Urdaci M. C. (2003). Genetic diversity and involvement in bread spoilage of *Bacillus* strains isolated from flour and rony bread. *Lett. Appl. Microbiol.* 37: 169-173.
- Soubra L., Sarkis D., Hilan C., Verger P. (2009). Occurrence of total aflatoxins, ochratoxin A and deoxynivalenol in foodstuffs available on the Lebanese market and their impact on dietary exposure of children and teenagers in Beirut. *Food Add. Cont.* 26: 189-200.

- Stevens K. A., Sheldon B. W., Klapes N. A., Klaenhammer T. R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3613-3615.
- Stiles M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 70: 331-345.
- Stiles M. E., Holzappel W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Stratford M., Anslow P. A. (1996). Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiol. Lett.* 142: 53-58.
- Ström K., Sjögren J., Broberg A., Schnürer J. (2002). *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe- trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4322–4327.
- Thompson J. M., Dodd C. E. R., Waites W. M. (1993). Spoilage of bread by *Bacillus*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 32: 55-66
- Thompson J. M., Waites W. M., Dodd C. E. R. (1998). Detection of rope spoilage in bread caused by *Bacillus* species. *J. Appl. Microbiol.* 85: 481-486.
- Todd E. C. D. (1982). Foodborne and waterborne disease in Canada-1977. Annual summary. *J. Food Prot.* 45: 865-873.
- Todorov S., Onno B., Sorokine O., Chobert J. M., Ivanova I., Dousset X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *Int J. Food Microbiol.* 48: 167-177.
- Torriani S., Felis G. E., Dellaglio F., (2001). Differentiation of *Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, and *L. paraplantarum* by *recA* gene sequence analysis and multiplex PCR assay with *recA* gene-derived primers. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3450-3454.
- Twomey D., Ross R. P., Ryan M., Meaney B., Hill C. (2002). Lantibiotics produced by lactic acid bacteria: structure, function and applications. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82:165-185.
- Unione Europea (1995). Direttiva 95/2/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 20 febbraio 1995 relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti.

- Valerio F., De Bellis P., Lonigro S. L., Visconti A., Lavermicocca P. (2008). Use of *Lactobacillus plantarum* fermentation products in bread-making to prevent *Bacillus subtilis* ropy spoilage. *Int. J. Food Microbiol.* 122: 328–332.
- 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 of Lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4741-4750.
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.
- Versalovic J., Schneider M., De Bruijn F. J., Lupski J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth. Mol. Cell Biol.* 5: 25-40.
- Viljoen C. R., von Holy A. (1997). Microbial populations associated with commercial bread production. *J. Basic Microbiol.* 37: 439-444.
- Vogel R. F., Müller M., Stolz P. Ehrmann M. (1996). Ecology in sourdoughs produced by traditional and modern technologies. *Advances in Food Science.* 18: 152-159.
- Von Holy A., Allan C., Williams D., Kirschner L. (1988). Incidence of rope in South Africa brown bread. *In: Bush P.B., Clark I. R., Kort M. J., Smith M. F. (ed.), Functionality of Ingredients in the Baking Industry.* Natal Technicon Printers, Durban, Sud Africa. Pp. 157-164.
- FAO (2009). Crop Prospects and Food Situation. <http://www.fao.org/qIEWS/english/cpfs/>
- Watkins E. J. (1906). Ropiness in flour and bread, and its detection and prevention. *J. Soc. Chem. Ind.* 5: 350-355.
- Wessels S., Axelsson L., Bech Hansen E., De Vuyst L., Laulund S., Lahteenmaki L., Lindgren S., Mollet B., Salminen S., von Wright A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 498-505.
- Zheng Y. G., Chen J., Liu Z. Q., Wu M. H., Xing L. Y., Shen Y. C. (2008). Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis* ZJB-063, a versatile nitrile-converting bacterium. *Applied Microbiol. Biotechnol.* 77: 985-993.

## Sinopsi

**Obiettivo:** sviluppare metodi innovativi di controllo e bioconservazione per prolungare la shelf-life dei prodotti panari attraverso lo studio dell'ecologia dei microrganismi autoctoni per selezionare ceppi protecnologici e monitorare i contaminanti microbici. La caratterizzazione molecolare e fisiologica di questi ceppi è determinante per la loro applicazione e per lo svolgimento del loro ruolo nel miglioramento della qualità dei prodotti sia a livello industriale che artigianale. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di individuare nuovi ceppi di batteri lattici in grado di inibire i microrganismi maggiormente responsabili di alterazioni dei prodotti panari e utilizzare i loro prodotti di fermentazione come bioconservanti.

**Contesto della ricerca:** L'aumento della produzione e dell'esportazione di prodotti panari a vocazione territoriale, e la conseguente necessità di assicurare una elevata qualità di prodotti in termini di conservabilità reologica, organolettica e microbiologica ha determinato l'urgenza da parte di produttori locali di affrontare problematiche tecnologiche in sinergia con Enti di ricerca al fine di attuare processi innovativi per il miglioramento della qualità. L'interesse delle imprese che operano nel settore della panificazione ha determinato lo sviluppo di sperimentazioni biotecnologiche per standardizzare gli impasti e individuare metodi innovativi di biocontrollo per prolungare la shelf-life dei prodotti, salvaguardando nello stesso tempo gli attributi sensoriali.

**Modalità di studio:** studio dell'ecologia microbica di campioni di semole rimacinate di grano duro - provenienti da alcune zone della Puglia e utilizzate nella produzione del pane di Altamura - attraverso l'applicazione di metodologie microbiologiche e molecolari per la selezione, identificazione e caratterizzazione dei microrganismi protecnologici e contaminanti.

**Risultati:** L'analisi microbiologica delle semole ha evidenziato che il maggior numero di batteri lattici (60%) è stato isolato da semole sottoposte a condizionamento lungo: in particolare, 75 dei 125 batteri lattici isolati provengono da campioni sottoposti a condizionamento lungo. La caratterizzazione ed identificazione molecolare dei batteri lattici isolati hanno evidenziato che i batteri appartenenti al genere *Weissella* sono i più rappresentativi sia per numero di isolati



ottenuti sia per diffusione tra campioni esaminati. Insieme alle specie *W. cibaria* e *W. confusa*, sono stati isolati anche *Lactobacillus plantarum*, *L. rossiae*, *Leuconostoc citreum*, *L. mesenteroides* e *Lactococcus lactis*. Sono stati selezionati 6 prodotti di fermentazione ottenuti da ceppi delle specie *L. plantarum*, *L. lactis*, *W. cibaria*, *L. citreum*, *W. cibaria* e *L. rossiae*. In particolare, il ceppo di *L. citreum* è risultato efficace sia verso i funghi che verso *B. subtilis*. Tre prodotti di fermentazione hanno inibito lo sviluppo di tutti e tre i funghi in modo paragonabile o superiore al propionato di calcio (0,3% p/vol), il conservante chimico comunemente impiegato nella preparazione dei lievitati da forno per contrastare l'ammuffimento.

L'analisi microbiologica dei 59 campioni di semola rimacinata di grano duro ha rilevato la presenza di contaminazione da spore di *Bacillus* nel 93,2% dei campioni. In particolare, il 57,6% ha presentato un livello di contaminazione nell'ordine di grandezza di  $10^0$  spore/g, il 13,6% di  $10^1$  spore/g, l'11,8% di  $10^2$  spore/g e il 10,2% di  $10^3$  spore/g. La specie *B. subtilis*/*B. amyloliquefaciens* è risultata essere la più diffusa tra i campioni esaminati (62,7%) ed era presente anche con un maggior numero di ceppi. *B. licheniformis* è insieme al *B. subtilis* la specie principalmente coinvolta nell'alterazione del pane filante, ed è presente nel 16,9% dei campioni esaminati.

**Conclusioni:** L'impiego di batteri lattici con proprietà antimicrobiche, isolati da inesplorate nicchie ecologiche, quali le semole di grano duro, può rappresentare una risposta concreta e innovativa al problema della conservazione dei lievitati da forno. La capacità del prodotto di fermentazione di un ceppo di *Leuconostoc citreum* di inibire *in vitro* lo sviluppo delle principali specie alterative quali *B. subtilis*, *A. niger*, *P. roqueforti* e *E. fibuliger*, e di ritardare lo sviluppo fungino sul pane, assume un significato importante nella prospettiva di una sua potenziale applicazione come "bioconservante" a livello industriale. Inoltre per la prima volta viene segnalata l'attività inibitoria in ceppi appartenenti alle specie *L. citreum* e *L. rossiae* verso importanti agenti di deterioramento dei prodotti da forno.

I risultati relativi alla presenza di spore responsabili dell'alterazione "pane filante" nelle semole hanno evidenziato che solo una minima parte (ca. 7%) dei campioni è privo di contaminazione. I dati ottenuti sottolineano l'importanza di effettuare un costante monitoraggio della qualità delle partite di grano e dei livelli igienici delle attrezzature impiegate nei processi di molitura per evitare il rischio di contaminazioni nel pane.

## Ringraziamenti

Ringrazio la Dr.ssa Paola Lavermicocca e per avermi consentito di svolgere il mio percorso di formazione su tematiche di forte attualità per il miglioramento delle produzioni agro-alimentari fornendomi strumenti di conoscenza indispensabili per la mia identificazione professionale.

Ringrazio il Dr Angelo Visconti per avermi dato l'opportunità di svolgere la mia ricerca presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del CNR di Bari.

Ringrazio il prof. Pasquale Trematerra e tutto il collegio dei docenti del dipartimento S.A.V.A. della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi del Molise, per avermi dato la possibilità di svolgere questo percorso di formazione.

Un sentito ringraziamento alla Dr.ssa Francesca Valerio per aver guidato e coordinato la mia attività di ricerca attraverso un percorso costruttivo.

Ringrazio inoltre il Dr. Sisto, la Dr.ssa De Bellis e la Sig.ra Lonigro per la pazienza, la disponibilita' e per aver contribuito alla mia crescita scientifica.

Ringrazio Tonia per avermi aiutato nei momenti di difficoltà, Angela per la sua disponibilità e Marinella con la quale ho condiviso viaggi e ansie.

Infine ringrazio Fabio per il suo sostegno ed incoraggiamento nel corso di questa impegnativa prova.