



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e Applicata

**BIODIVERSITA' MICROBICA NEI FORMAGGI E
RELATIVI CASEIFICI DELLA REGIONE MARCHE,
DURANTE IL PROCESSO DI PRODUZIONE DEL
PECORINO TRADIZIONALE DEI MONTI SIBILLINI**

MICROBIAL BIODIVERSITY IN CHEESES AND ITS
RELATED DAIRIES IN THE MARCHE REGION, DURING
THE TRADITIONAL *PECORINO DEI MONTI SIBILLINI*
PRODUCTION PROCESS

Tesi di Laurea Magistrale
di :
Pigliacampo Ilaria

Relatore:
Prof.ssa
Comitini Francesca

Sessione Estiva
Anno Accademico 2019/2020

INDICE

1- Capitolo primo : IINTRODUZIONE	1
1.1 Settore caseario: generalità e importanza	1
1.1.1 Caratteristiche del formaggio Pecorino	5
1.1.2 Caseifici nella regione Marche	9
1.1.3 Fasi di produzione : lavorazione e maturazione	14
1.2 Microbiologia della fermentazione del latte	15
1.2.1 Coagulazione presamica: caglio e stagionatura	17
1.3 Microrganismi che intervengono durante la maturazione	23
1.4 Alterazioni biologiche dei formaggi	25
2- Capitolo secondo : SCOPO DEL LAVORO	32
3- Capitolo terzo : MATERIALI E METODI	34
3.1 Campionamenti	34
3.1.1 Raccolta dei campioni	35
3.2 Terreni di coltura impiegati	37
3.3 Analisi di laboratorio	40
3.3.1 Isolamento, purificazione ed esame morfologico dei lieviti	42
3.3.2 Estrazione del DNA dai ceppi isolati	43
3.3.3 Reazione a catena della DNA polimerasi	45

3.3.4 Elettroforesi su gel d'Agaroso	48
3.3.5 Sequenziamento del Dna	50
3.4 Attività enzimatiche su lieviti selezionati	51
4- Capitolo quarto : RISULTATI	55
4.1 Biodiversità Microbica nei caseifici campionati	55
4.2 Identificazione dei lieviti	64
4.2.1 Diversità di specie	68
4.3 Risultati prove di attività enzimatiche	75
4.3.1 Valutazione dell'attività proteolitica, killer, lipolitica ed esterasica	75
4.3.2 Valutazione dell'attività antiossidante	77
4.4 Valutazione della sopravvivenza a 37°C e ai Sali Biliari	79
5- Capitolo quinto : DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	81
BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA	87
RINGRAZIAMENTI	89

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 Settore caseario: generalità e importanza

Nel XVIII secolo, il forte sviluppo di scienza e tecnica ha permesso di definire la composizione del latte e dei suoi derivati a livello chimico e biologico. Grazie allo sviluppo di nuove tecnologie, è stato possibile identificare i principali microrganismi utili o dannosi alla produzione ed allo stesso tempo mettere a punto la tecnica per l'utilizzo degli starters naturali. Sono state inoltre perfezionate le procedure, quali filtrazione, pastorizzazione, cottura, stagionatura, utili ad ottenere un prodotto di alta qualità. L'aver definito le caratteristiche del latte ha permesso la nascita e lo sviluppo di nuovi macchinari dedicati ed utili alla produzione casearia.

Sin dai tempi antichi, la scienza del formaggio non ha mai smesso di perfezionarsi attraverso il progresso tecnologico, il quale ha favorito la comparsa di nuovi prodotti accanto a quelli più tradizionali.

Tra le filiere dell'agroalimentare, quella lattiero/casearia si presenta come una delle più articolate e dinamiche di un settore

particolarmente competitivo per la variegata offerta di prodotti tipici e diversi tra loro, come testimoniano i 37 formaggi DOP (Denominazione di Origine protetta) e altri prodotti appartenenti alla tradizione italiana. L'Italia copre attualmente una posizione di rilievo nel settore lattiero caseario europeo, detenendo il primato di maggior Paese produttore di Formaggi tipici D.O.P.

L'industria lattiero-casearia prepara il latte per il consumo diretto o lo trasforma in burro, formaggio e derivati. Dalla lavorazione del latte si ricavano una serie di sottoprodotti, come il latticello ed il siero, utilizzati per l'alimentazione animale. I prodotti lattiero-caseari sono ancora eccedentari all'interno della Comunità Economica Europea, soprattutto per quanto riguarda il latte ed il burro, nonostante le misure restrittive di politica comunitaria. L'Italia rappresenta una eccezione in Europa in quanto la produzione di latte è deficitaria ed elevate sono le importazioni per il consumo alimentare e per la trasformazione in burro e formaggio. Nel nostro Paese il consumo di latte è notevolmente inferiore a quello degli altri Stati europei e quello di burro risente della concorrenza dell'olio di oliva e di altri grassi vegetali. La produzione italiana di formaggio non è sufficiente a coprire il fabbisogno interno per cui, se si escludono alcuni formaggi tipici, quali il Grana

Padano, il Pecorino e il Provolone, che vengono anche esportati, bisogna ricorrere ogni anno all'importazione di forti quantitativi di questo prodotto dalla Francia e dall'Inghilterra. I consumi pro capite di formaggio in Italia sono tra i più alti in Europa ed in continua crescita.

L'Italia :

- rappresenta l'**8,2%** del totale delle consegne di latte in Europa (anno 2018),
- esporta in prodotti lattiero-caseari, convertiti in equivalente latte (ME), il **29,6%** del totale delle quote (anno 2018),
- rappresenta il **4,7%** del totale delle esportazioni europee in ME (anno 2019).

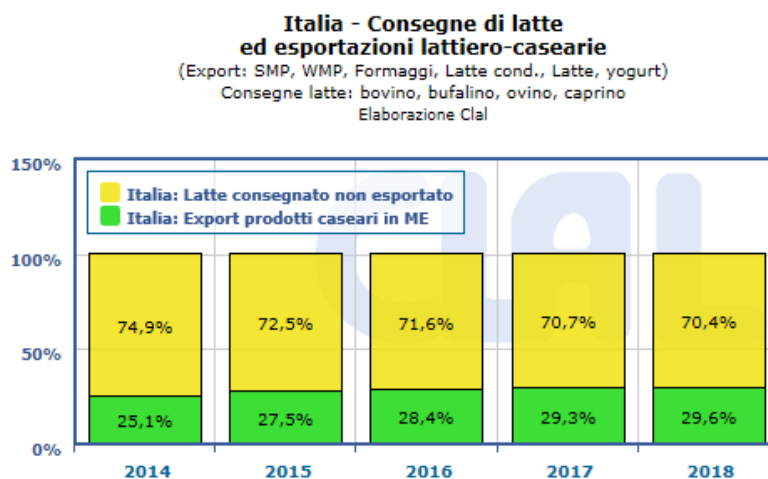


Fig.1 da www.clal.it

Il lattiero caseario è il primo settore alimentare italiano e rappresenta da solo più del 12% del fatturato complessivo del food nazionale.

Ogni anno, le imprese italiane producono un milione di tonnellate di formaggi - di cui 460.000 di prodotti DOP - tre milioni di tonnellate di latte alimentare, un miliardo e ottocentomila vasetti di yogurt e 160.000 tonnellate di burro. Si tratta di prodotti di qualità, frutto di antiche tradizioni, di una sapienza tramandata di generazione in generazione e di una forte capacità innovativa. Prodotti nobili, che utilizzano una materia prima delicata che richiede trattamenti specifici, grande professionalità e sicurezza garantite dai rigorosi controlli della filiera alimentare .

La produzione nazionale non garantisce il fabbisogno interno, per questo nel sistema lattiero caseario italiano le importazioni rappresentano allo stesso tempo “male necessario” e risorsa indispensabile .

Uno dei punti di forza del settore caseario è la sua capacità esportativa, una forza che poggia sulla qualità di prodotti ottenuti secondo standard industriali di altissimo livello e su processi che sempre più coniugano tradizione e modernità.

1.1.1 Caratteristiche del formaggio Pecorino

Il pecorino è un formaggio ottenuto dalla lavorazione del latte di pecora, il quale si differenzia da quello vaccino soprattutto per la presenza di un'alta percentuale di grasso e caseina. Storicamente di origine mediterranea, è un prodotto oggi diffuso anche in altri paesi . Caratterizzato da una bassa umidità (inferiore al 40%), viene considerato un formaggio a pasta dura.

Esistono diverse tipologie di pecorino, le quali si differenziano principalmente per la regione di produzione e la zona di origine delle pecore.

Tra i più conosciuti vi sono quello Romano e quello Sardo. Il primo, è generalmente caratterizzato da una crosta sottile, tipicamente color avorio chiaro o paglierino naturale che talora si presenta cappata con appositi materiali protettivi per alimenti, solitamente di colore neutro o nero.

Il gusto del pecorino è molto aromatico. Da lievemente piccante e sapido nel formaggio da tavola, si presenta piccante e intenso nel formaggio da grattugia.

Il Pecorino Sardo DOP è prodotto unicamente con latte di pecora intero proveniente dalla zona di origine. L'alimentazione degli ovini è basata

in prevalenza sull'utilizzo diretto di pascoli naturali, prati ed erbai, ragione per cui il latte destinato alla DOP è di elevata qualità e conferisce al prodotto finito un sapore e un gusto unici.

È un ottimo formaggio da tavola, e se ne producono due tipologie, differenti per tecniche di lavorazione, stagionatura, dimensione della forma e proprietà

organolettiche: il DOLCE e il MATURO. Il disciplinare di produzione prevede che il latte intero di pecora, eventualmente pastorizzato, possa essere inoculato con colture autoctone di fermenti lattici e successivamente coagulato con caglio di vitello ad una temperatura compresa tra 35° e 39° C.

In linea generale, ogni Pecorino, indipendentemente dalla regione di produzione, presenta una pasta compatta o leggermente occhiata. Il suo colore può variare dal bianco al paglierino più o meno intenso in rapporto alle condizioni tecniche di produzione.

Il Pecorino viene classificato in base alla stagionatura in:

- fresco
- Primosale
- Secondosale o semi-stagionato
- Stagionato

Il pecorino è un formaggio a pasta dura: esso costituisce pertanto un alimento derivato, lavorato e concentrato.

È ricavato dal latte di pecora che ha un sapore e un gusto inconfondibili. Ha più corpo rispetto al latte vaccino e al palato risulta dolce e cremoso. Si potrebbe paragonare, quanto a consistenza, al latte di capra, non presentandone tuttavia la caratteristica amarezza e spiccata sapidità. Il suo gusto viene ritrovato nel formaggio Pecorino, il quale può vantare un sapore più delicato, anche nelle versioni a lunga stagionatura. Esso contiene una quantità inferiore di lattosio rispetto al latte vaccino e per questo risulta più facilmente digeribile. Nonostante venga parzialmente scremato, presenta un contenuto lipidico iniziale superiore a quello vaccino; poiché la componente sierosa viene eliminata in fase di lavorazione, il pecorino non si avvale delle proteine e del lattosio in essa contenuti. La concomitanza di questi due fattori determina una ripartizione nutrizionale dei macronutrienti energetici a favore dei lipidi ed una densità energetica estremamente elevata. Il pecorino è comunque ricco di proteine caseine, ma contiene poco lattosio, il quale all'interno della pasta subisce una fermentazione batterica che lo trasforma in acido lattico durante la maturazione. Esso possiede anche una prevalenza di acidi grassi a favore di quelli saturi ed un contenuto di colesterolo decisamente elevato che rende il prodotto

poco salutare per il metabolismo delle persone che soffrono di ipercolesterolemia.

Dal punto di vista vitaminico, il pecorino contiene un'alta percentuale di vitamina A ed E, due potenti antiossidanti ed è altresì ricco di Vitamina D, essenziale per la mineralizzazione delle ossa, la cui assunzione è necessaria per la loro crescita e rimodellamento, e che interviene nella regolazione del metabolismo del calcio e del fosforo, regolandone l'assorbimento intestinale.

Per quel che concerne i sali minerali, il pecorino apporta ottime frazioni di calcio e fosforo, anche se il contenuto in sale (cloruro di sodio) lo rende inadatto all'alimentazione dell'iperteso.

Il latte di pecora costituisce un'enorme fonte di calcio, in percentuale maggiore di quello presente nel latte vaccino. È risaputo come il calcio aiuti a mantenere forti e sane le ossa e sostenere il buon funzionamento di nervi e muscoli, oltre ad essere un valido aiutante nella coagulazione del sangue.

Secondo un recente studio dell'Università di Firenze, il latte di pecora, e quindi il Pecorino che ne è diretto derivato, è un importante fattore di prevenzione sia delle malattie cardiovascolari che di alcuni particolari tipi di tumore, soprattutto quelli del colon e della mammella.

Nonostante le sue grandi proprietà ed apporti nutrizionali, il pecorino è comunque un alimento conservato da consumare saltuariamente ed in porzioni limitate.

1.1.1 Caseifici nella regione Marche

I caseifici nelle Marche sono per la grande maggioranza a conduzione familiare. È questa una regione di antiche tradizioni contadine e da qui è nata la necessità di una produzione familiare di prodotti caseari. I formaggi prodotti sono ottenuti dalle mungiture di mucche, pecore e capre. Tra questi troviamo il pecorino marchigiano, caratterizzato dal suo sapore forte e piccante. Molto vasta è la gamma dei pecorini che caratterizzano tutte le zone montane, ricche di pascoli. È un formaggio che, grazie alle sue affinature, viene stagionato con tecniche differenti ed in questo modo acquisisce sapori e profumi diversi. Nel nord della regione è possibile trovare ancora il pecorino conservato in botti di rovere, barili o tini, in cui viene lasciato fino a tre mesi avvolto in foglie di noce o, in alternativa, disposto a strati insieme ad erbe aromatiche o vinacce.

Da fonti antichissime si apprende che i formaggi tipici marchigiani erano molto apprezzati già nella Roma di Augusto, mentre nel XVI secolo la Casciotta d'Urbino aveva tra i suoi estimatori Michelangelo, che amava gustarla in

primavera, periodo dell'anno in cui questo prodotto sfoggia le sue caratteristiche migliori.

Nello specifico, per questo lavoro sperimentale, sono stati presi in considerazione cinque caseifici marchigiani, situati nell'area dei Monti Sibillini.

Tra questi ritroviamo la Società agricola zootecnica LAI, realtà interamente a conduzione familiare, sin dal 1982, che pratica agricoltura e allevamento biologici.

Nell'azienda si allevano pecore di razza sarda (circa 1300 capi) e bovini da carne da cui vengono prodotti pecorini di varie stagionature, ricotta e pecorino speziato.

Il latte crudo viene lavorato entro due ore dalla mungitura per conservare tutte le caratteristiche organolettiche e nutrizionali. Sono prodotti genuini, senza aggiunta di conservanti, così da mantenere inalterati i sapori di una volta.

Il caseificio BB nasce dalla collaborazione dei componenti di queste due famiglie che si sono ritrovate a dover spostare il loro centro di produzione in un unico luogo a seguito dei danni provocati dal sisma del 2016 che ha colpito gravemente l'entroterra marchigiano. Essi si occupano dell'allevamento di ovini di razza marchigiana, ovini e caprini ed è uno dei caseifici dove il

pecorino trova il suo luogo di elezione, annoverandoli tra gli specialisti del settore.



Fig.2 Forme di Pecorino del caseificio BB

Altro stabilimento caseario preso in analisi è la società agricola AN, anch'essa a conduzione familiare situata nella zona dei Monti Sibillini dal 1960. Ad oggi vi si possono contare un migliaio di animali divisi tra pecore (di razza Comisana, Sarda e Sopravvissana) e mucche (di razza Frisona e Pezzata Rossa) che durante il periodo estivo sono libere di pascolare e nutrirsi di quelle erbe spontanee che rendono il latte davvero speciale mentre in inverno vengono alimentate con i foraggi e i cereali dell'azienda stessa.

Poco distante dal Santuario di Macereto si trova il piccolo paesino di Cupi, in cui è situata l'azienda agricola PC, a conduzione familiare, che gode di una meravigliosa posizione all'interno del Parco Nazionale dei Monti Sibillini, luogo ideale per l'allevamento degli ovini. In particolare, viene allevata la pecora comisana, una razza meticcica molto robusta.

Condotta con passione e competenza, l'azienda ha ottenuto il marchio CEE grazie anche ad un tocco di modernità in più, dato dalla realizzazione di un modernissimo laboratorio artigianale per la lavorazione del latte, senza però togliere, al prodotto finito, quel gusto particolare che ha sempre avuto, e per il quale è sempre stato famoso, il vero pecorino di Cupi, realizzato esclusivamente con latte di pecora e caglio naturale. Tutti i prodotti del caseificio PC vengono realizzati seguendo regole secolari, tramandate di generazione in generazione, utilizzando esclusivamente latte di pecora proveniente da agricoltura biologica. Le erbe profumate dei pascoli di alta quota dei Monti Sibillini, contribuiscono a dare al prodotto quel gusto particolare, unico nel suo genere, che ha da sempre rappresentato una delle realtà produttive più rilevanti della Frazione Cupi di Visso.

L'azienda agricola MM, a conduzione familiare, si è insediata nella zona pedemontana di alta collina circa trenta anni fa. Essa si occupa dell'allevamento di capre, vacche e pecore, da cui si ricava il latte che, lavorato secondo le

tradizionali tecniche artigianali dei piceni, antichi abitanti dei Monti Sibillini, dà origine ad un caratteristico formaggio Pecorino iscritto all'Albo dei Prodotti Tipici Regionali.



Fig.3 e 4 Caseificio MM

1.1.2 Fasi di produzione : lavorazione e maturazione

La storia dei Sibillini è storia di transumanza e queste montagne conservano i segni di un'importante civiltà pastorale. Dal Monte Sibilla (2173 metri di altezza) prendono nome il parco nazionale e il pecorino che lì si produce.

La prima fase della produzione del formaggio pecorino non avviene in caseificio come si potrebbe pensare ma all'aria aperta. Il pecorino migliore si ottiene da pecore allevate allo stato brado in pascoli biologici. Il suo periodo di produzione va dalla primavera, dopo lo svezzamento degli agnelli, fino al mese di ottobre.

I pecorini dei Sibillini, in realtà, sono due: uno fresco e prodotto tutto l'anno con il latte pastorizzato dai caseifici industriali, l'altro fatto con latte crudo, semicotto e stagionato in modo naturale, sostenuto dal Presidio. Secondo la tecnica tradizionale il latte appena munto viene portato a circa 37°C in un paiolo di rame; ad esso viene aggiunto il caglio naturale di agnello o di capretto. Una pratica antichissima e quasi scomparsa prevede inoltre l'aromatizzazione del latte prima della cagliatura con un mazzetto di erbe (timo serpillio). Dopo circa 30 minuti si rompe la cagliata in grani molto fini, si riscalda a circa 45-48°C e la massa ottenuta viene sistemata nelle fascere, pressata e salata a secco. Le forme, in un primo periodo, vengono frequentemente lavate con siero tiepido, asciugate e poste a stagionare in un locale fresco e lievemente umido

in cui, ogni due o tre giorni, devono essere rigirate per favorire la formazione della crosta. Il formaggio si può consumare dopo circa 60 giorni ma senza dubbio il risultato migliore si ottiene facendolo affinare per alcuni mesi, in modo da avere forme dalla crosta dorata, ocra o nocciola, dalla pasta giallo carico, compatta e lievemente grassa, con una consistenza granito-scagliosa, un odore aromatico e potente, spesso di fungo e tartufo, un sapore deciso, piccante e molto persistente.

Collocato in cantine fresche, il Pecorino può maturare anche fino a due anni. Ben stagionato ha una fragranza ed un'aromaticità straordinarie.

1.2 Microbiologia della fermentazione del latte

La fermentazione è un processo che avviene sia naturalmente negli alimenti, sia sfruttato dalla biotecnologia per la conservazione alimentare; il procedimento avviene in assenza di ossigeno, grazie ad alcuni microrganismi quali muffe, lieviti e batteri, che trasformano gli zuccheri in altri composti. Il termine “fermentare”, infatti, significa “respirare senza ossigeno” ed ha lo scopo di ricavare energia chimica per lo svolgimento di alcune funzioni.

Esistono diversi tipi di fermentazione, ma le maggiormente utilizzate sono quella alcolica, lattica e acetica.

La fermentazione lattica è un processo metabolico attivato da alcuni batteri presenti nelle cellule animali in assenza di ossigeno. Dal punto di vista chimico, questa trasformazione interessa una molecola di glucosio e termina con la produzione dell'acido piruvico e dell'acido lattico.

Con la fermentazione lattica il latte viene trasformato in yogurt o in formaggio.

Durante la produzione del formaggio, il latte deve mantenere una carica batterica utile ad attivare le fermentazioni necessarie. In genere si parte dal latte crudo al quale il casaro aggiunge *lattoinnesto* che permette di ottenere formaggi a pasta semidura e dura, oppure o il *siero innesto* , per formaggi a pasta dura.

Se si utilizza latte pastorizzato, invece, si può ricorrere anche a fermenti lattici liofilizzati o congelati. Il formaggio, in effetti, si ottiene dalla coagulazione delle proteine e dei grassi del latte che passano dallo stato liquido a quello semi-solido e gelatinoso (*cagliata*).

In fase di lavorazione della cagliata, i batteri sono responsabili di tre tipi di trasformazioni: glucidica, proteica e lipidica.

Per quanto riguarda la trasformazione dei glucidi il lattosio contenuto nella cagliata viene trasformato dai batteri lattici in acido lattico, alcool etilico e anidride carbonica.

L'acido lattico, a sua volta, viene trasformato in composti aromatici o in sale, il lattato. Ed è proprio quest'ultimo che in formaggi come il Grana fa comparire le classiche macchie biancastre nella pasta.

1.2.1 Coagulazione presamica: caglio e stagionatura

La stagionatura è una fase molto delicata nella produzione del formaggio, dal momento che è quella in cui hanno luogo tutti i processi biochimici di trasformazione dei costituenti del latte, che conferiscono al prodotto finale l'aspetto, la consistenza, il sapore e il profumo che li caratterizza. L'intensità e la durata del periodo di maturazione variano a seconda delle diverse tipologie di formaggio, ma in linea generale le reazioni che trasformano la cagliata sono agevolate dalla presenza di enzimi che agiscono al meglio in determinate condizioni. Vi sono tre eventi principali che avvengono in fase di stagionatura: la fermentazione lattica, la proteolisi e la lipolisi.

Durante la caseificazione, il lattosio si trasforma per lo più in acido lattico. Il 90% dei carboidrati del latte vengono rilasciati nel siero sotto forma di lattosio o lattato, ma la cagliata messa nello stampo può contenere fino all'1,5% di zucchero: il lattosio residuo viene solitamente metabolizzato dai microrganismi dello starter, ma se quest'ultimo è costituito da batteri lattici che non utilizzano il galattosio, esso potrà rimanere nel formaggio maturo contribuendo alla

fermentazione propionica (quella che provoca l'aspetto lucido dell'Emmental) o alla fermentazione butirrica (che causa un gonfiore tardivo nei formaggi dalla lunga stagionatura).

La proteolisi indica un insieme di trasformazioni della caseina per azione di complessi enzimatici che concorrono alla formazione della struttura del formaggio, al rilascio di componenti sapide durante la masticazione e alla modificazione della consistenza e del pH della pasta (a causa della produzione di ammoniaca e anidride carbonica).

La lipolisi, invece, è il processo metabolico di scissione dei trigliceridi con conseguente liberazione di acidi grassi liberi ed ha un ruolo molto importante nella formazione del gusto e dell'aroma del formaggio. Essa conferisce al prodotto un profumo particolarmente forte ed intenso, considerato un evento gradito, se ben controllato, come nel caso dei formaggi duri a base di latte di pecora e di alcuni erborinati come il gorgonzola.

Nel latte le caseine si trovano sotto forma di micelle, particelle lipoproteiche con tendenza ad unirsi e coagulare; in condizioni standard ciò non avviene per la loro carica elettrica, che a pH naturale risulta negativa e porta le particelle a respingersi, e per la presenza del peptide colloidaleprotettore nella parte C-terminale della K-caseina. In mancanza di tali fattori, si va incontro a coalescenza, quindi a coagulazione lattica o presamica. La differenza fra le due

tipologie è che per la coagulazione lattica non è previsto l'utilizzo del caglio, ma solo i fermenti lattici naturali del latte o inoculati dal casaro. La cagliata presamica, invece, avviene solo con l'utilizzo di caglio o coagulante.

La coagulazione è una sorta di modificazione chimica e fisica che porta il latte a perdere la sua caratteristica di prodotto liquido per diventare gelatinoso; il prodotto che ne deriva è la cagliata, processo essenziale per la produzione del formaggio.

In Italia la grande maggioranza dei formaggi è a coagulazione presamica e per questo vengono utilizzati diversi tipi di caglio (di vitello, di capretto o di agnello) ma anche coagulanti vegetali, estratti anche da piante selvatiche.

I formaggi D.O.P. italiani sono tutti coadiuvati dal caglio, naturalmente di derivazione animale, mentre altri formaggi soprattutto nel Centro e nel Sud Italia, sono il frutto della coagulazione derivante da coagulanti vegetali e microbici.

Il caglio o presame è un prodotto ricco di enzimi proteolitici, tra cui la pepsina e la chimosina (o rennina), che determinano il distacco della parte C-terminale della K-caseina, proteina idrofila presente nel latte, provocando la coagulazione delle rimanenti caseine, idrofobe. Per effetto del caglio la massa proteica, non

più solubile nell'acqua, precipita sul fondo a formare la cagliata che può essere raccolta e lavorata per fare il formaggio.

Il presame, o caglio, viene aggiunto al latte ad una temperatura di 30-37°C, rispettivamente per formaggi a pasta molle o a pasta dura; esso si ottiene per macerazione di frammenti di quarto stomaco di ruminanti non svezzati (vitelli, agnelli, capretti), essiccati o conservati in salamoia al 10% di NaCl addizionati ad insetticidi per 10-12 ore a 20°C e a pH 4. Il succo viene quindi filtrato, chiarificato ed essiccato. Lo stomaco di animali adulti non può essere utilizzato proprio perché questi sono privi di lattasi e di altri enzimi necessari alla digestione dell'alimento.

Esistono anche cagli commerciali che vengono standardizzati e portati a titolo fisso: il titolo di caglio è la quantità di latte coagulata da 1 cc di caglio in 40 minuti a 37°C, parametro estremamente importante per i caseifici.

Durante la coagulazione presamica la chimosina va ad idrolizzare la K-caseina in un punto ben preciso, localizzato tra gli amminoacidi 105 (fenilalanina) e 106 (metionina). Tagliando in questa posizione viene perso il peptide colloidal protettore, che rappresenta la parte C-terminale della proteina che, essendo glicosilata, aumenta l'idrofilia della micella; perdendo questo peptide si riduce l'idrofilia e le micelle caseiniche acquistano una maggior tendenza all'aggregazione. Dopo il distacco del peptide C-terminale la caseina si

trasforma in para-caseina, che in presenza degli ioni calcio contenuti nella micella diventa Paracaseinato bicalcico, formando un reticolo tridimensionale (gel) rigido e in grado di trattenere una alta quantità di lattosio e sali minerali nei globuli lipidici. Questo gel è talmente forte che nel tempo tende a contrarsi e ad espellere il siero, mentre il calcio rimane legato alle caseine.

La formazione della cagliata dipende da moltissimi fattori, che devono essere attentamente controllati per ottenere il formaggio:

- concentrazione e titolo del caglio
- temperatura: sotto i 10 °C e sopra i 65 °C le caseine non precipitano; in genere la loro tendenza a cagliare è massima tra i 20 ed i 40 °C.
- pH: sopra pH 7 il latte non coagula, poiché le cariche delle caseine sono troppo forti per consentire l'avvicinamento delle micelle caseiniche
- concentrazione di ioni Ca^{++}
- dimensione delle micelle
- conservazione del latte: se è mantenuto per più di 2 giorni a +4 °C non coagula.



Fig.5 forme in cella di stagionatura

1.3 Microrganismi che intervengono durante la maturazione

I microrganismi coinvolti nel processo di maturazione appartengono a gruppi e specie differenti, e le popolazioni dominanti possono variare in funzione della tecnica di produzione a cui è stato sottoposto il formaggio.

Tra i batteri predominano ceppi e specie di batteri lattici quali *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* ed *Enterococcus*, ma anche ceppi e specie di micrococchi e stafilococchi, propionibatteri, corinebatteri. Quest'ultimi sono i batteri lattici non starter (NSLAB) che non contribuiscono alla produzione di acido, ma svolgono in generale un ruolo significativo nel complesso processo biochimico quale è la maturazione del formaggio.

I batteri lattici, rientrando nella costituzione dei numerosi prodotti lattiero-caseari, sono diventati parte integrante della dieta umana da quando gli uomini hanno iniziato la raccolta e la conservazione del latte in contenitori grezzi. Essi costituiscono forse il gruppo più numeroso di batteri collegati all'uomo e sono naturalmente associati alle superfici mucose, in particolare del tratto gastrointestinale, e indigeni di svariate matrici alimentari quali frutta, verdura, cereali, vino, latte e carne (Wood e Holzapfel, 1995, Wood e Warner, 2003). Il termine LAB viene usato principalmente per definire la caratteristica del metabolismo basale di tali batteri, la fermentazione degli zuccheri esosi, attraverso cui essi portano alla liberazione di alcuni acidi organici come l'acido

lattico che rappresenta il principale prodotto finale del metabolismo. I LAB sono microrganismi procarioti, eterotrofi e chemiorganotrofi; definiti batteri Gram-positivi, immobili, non sporigeni, ed anaerobi facoltativi o microaerofili, ossia tolleranti solo piccole quantità di ossigeno. Sono privi di catalasi, di riduttasi attiva sui nitrati e di citocromo ossidasi (Bottazzi, 1993).

Alcuni ceppi di batteri lattici, in particolare la maggior parte dei ceppi del genere *Lactobacillus*, sono sempre più riconosciuti come health-promoting, cioè, batteri probiotici (Saxelin et al., 2005), mentre alcuni ceppi dello stesso genere sono noti per la produzione di peptidi bioattivi dalle proteine del latte, benefici per la salute.

Occasionalmente possono essere presenti batteri alterativi (clostridi, bacilli, coliformi) e patogeni (*L. monocytogenes*, *Salmonella* e altri).

Un ruolo importante durante il processo di maturazione è svolto dai lieviti (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*) che si occupano in modo particolare della metabolizzazione del lattato e che, in alcuni casi, grazie alla loro attività lipolitica, vanno a determinare le caratteristiche tipiche dei prodotti caseari. Nella maggior parte dei formaggi lo sviluppo di muffe non è gradito ed è considerato segno di alterazione, ci sono però alcuni di questi in cui le muffe rappresentano una caratteristica

distinguibile e vengono inoculate come colture selezionate. Esempi tipici sono il Camembert, il Brie e il Gorgonzola (ma anche il Roquefort, lo Stilton ecc.).

Il ruolo delle muffe è quello di svolgere principalmente le seguenti azioni:

- utilizzazione del lattato, con conseguente disacidificazione e addolcimento del prodotto;
- attività lipolitica e proteolitica i cui prodotti di degradazione conferiscono al prodotto le caratteristiche sensoriali ed organolettiche tipiche.

1.4 Alterazioni biologiche dei formaggi

L'alterazione di un alimento rappresenta una trasformazione a carico di uno o più componenti chimici e questo comporta la modificazione delle sue proprietà fisiche, chimiche e biologiche. Le trasformazioni possono essere percepite come alterazioni positive o negative delle proprietà nutritive ed organolettiche dell'alimento o delle sue caratteristiche tecnologiche.

Difetti della pasta

GONFIORE PRECOCE : tipico di formaggi freschi e a pasta molle. È un difetto di origine microbica dovuto a lieviti, batteri coliformi (A. Aerogenes ed E. Coli) o eterofermentanti presenti in quantità elevate nel latte a causa di contaminazione batterica; questi fermentano il lattosio producendo

principalmente acido lattico, anidride carbonica ed idrogeno. Il gonfiore è definito precoce poiché si presenta entro 24 ore dalla lavorazione, interessa la pasta e porta alla comparsa di piccole “occhiature” e le forme, dall’esterno, appaiono rigonfiate. Il sapore tende all’amaro e l’odore può risultare sgradevole per la formazione di composti volatili.

GONFIORE TARDIVO : tipico di formaggi a lunga stagionatura (>3 mesi), è un grave difetto che si manifesta con occhiature della pasta a formare ampie cavità all’interno, causate da batteri anaerobi come clostridi e propionici, che utilizzano il lattato trasformandolo in acido butirrico o acido propionico e CO₂ e H₂. I formaggi appaiono fortemente rigonfiati e talvolta questo difetto porta allo “scoppio” delle forme. Ne consegue un aroma alterato (quasi di rancido) e un odore sgradevole di acido acetico e butirrico. Le cause principali sono da ritrovare nell’utilizzo di insilati, cattiva conservazione, contaminazione del latte con feci e foraggi, per cui si tende ad ovviare il problema aggiungendo al latte degli antifermentativi (es. lisozima).

Difetti di superficie o della crosta

COLORAZIONI ANOMALE : lo sviluppo superficiale indesiderato di colori anomali è attribuibile a batteri del genere *Pseudomonas* contaminanti l’acqua (blu, come nei noti casi a carico di mozzarelle, verde-blu, rossa) o a cocchi

pigmentanti che causano una colorazione rossa e provengono dalla contaminazione del sale marino utilizzato. In alternativa sulla crosta si possono trovare batteri che causano colorazioni nere-grigiastre, il *Cladosporium herbarum*, *Bacterium denigras*, *Bacillus mesentericus* e muffe, che fanno assumere alla pasta un colore verde-azzurro. La colorazione biancastra è legata a una salagione scorretta e non uniforme, a salamoia troppo fredda o a una rottura non omogenea della cagliata che produce una venatura simile al marmo (formaggio marmorizzato). La colorazione rossa o rossastra della pasta è dovuta a presenza micrococchi e ifomiceti (sapore inalterato) o a *Streptococcus faecalis*. Il difetto si evita rinnovando la salamoia o pastorizzandola, migliorando l'aerazione dei locali, pulendo i formaggi e curando la qualità dell'acqua.

INFESTAZIONE DA ACARI: i formaggi vengono ridotti in polvere rosso-grigiastra, nella quale si ritrovano anche gli escrementi e le spoglie dei parassiti. Gli acari si sviluppano sia sulla crosta che all'interno del formaggio penetrando da fessurazioni, causando perdita di peso. Il problema è legato alla pulizia delle assi e dei locali di stagionatura.

AMARO : nonostante sia un tipo di percezione soggettiva e talvolta gradita, rappresenta pur sempre un'alterazione. Il difetto deriva principalmente dall'accumulo di peptidi amari formati dall'azione di enzimi proteolitici sulle

caseine. La caseina di per sé non è una proteina “amara” ma a seguito della scissione enzimatica può liberare numerosi peptidi, tra i quali alcuni risultano di sapore amaro. Le cause sono molteplici, tra queste possono essere annoverate l'alimentazione del bestiame, il tipo di caglio e le contaminazioni microbiche, come anche alcune piante della famiglia delle brassicaceae (rapa). Altri fattori incidenti sono da ritrovare nell'uso di starter o nella contaminazione con batteri di origine fecale; un'ulteriore causa in elenco è una salatura non corretta che può modificare la struttura della caseina e di conseguenza l'azione degli enzimi proteolitici. Fortunatamente tra i batteri lattici presenti normalmente nel latte o aggiunti con l'innesto alcuni sono in grado di degradare, mediante gli enzimi da essi prodotti, anche i peptidi amari. Può pertanto accadere che lo stesso formaggio che ad un certo stadio di maturazione risulta difettoso dopo un ulteriore periodo di stagionatura perda il difetto amaro.

COLATURA : Rottura della crosta e fuoriuscita della pasta interna, molle e ricca di siero, durante la maturazione. Un difetto dovuto all'uso di caglio con troppa pepsina, spurgo insufficiente del siero dovuto a sua volta a rottura troppo grossolana della cagliata e/o a temperature troppo basse nei locali di stufatura e stagionatura. Essa può dipendere anche da un latte di cattiva qualità. Il

formaggio avrà così un sapore tendente all'amaro e al piccante ma questo difetto non considerato grave allo stesso modo da tutti i consumatori.

GESSATURA : difetto di origine tecnologica determinato da differenti cause, come il latte povero di grasso o eccessivamente acido, la forte acidificazione della pasta o errori nell'uso della temperatura nelle varie fasi. La cagliata assume un aspetto spugnoso, mentre la pasta del formaggio ne assume uno friabile di colore troppo chiaro e dal sapore acido. Il difetto si manifesta nel corso della stagionatura del prodotto, in particolare durante la fermentazione evidenziando mancanza di elasticità e coesione della pasta. Nel caso di alcuni formaggi, però, la gessatura al centro del formaggio non rappresenta un difetto (Stracchino all'antica) mentre è persino un pregio della toma del Lait brusc piemontese.

MUFFE: all'esterno del formaggio non provocano quasi mai danni e possono essere tenute sotto controllo, risultano dannose se penetrano all'interno della pasta a causa di bolle d'aria o rotture della crosta, poiché vanno a determinare un deterioramento per azione degli acari che si nutrono delle muffe. Possono non essere macroscopicamente presenti, ma sviluppandosi provocano un'accentuata proteolisi che determina il rammollimento della forma con conseguente alterazione di odore e gusto nel formaggio.

OCCHIATURA : non è un difetto, anzi. Ma deve essere regolare, uniformemente distribuita nella pasta. L'assenza di occhiatura tipica è un difetto e comporta l'appiattimento del gusto per riduzione delle attività fermentative e di conseguenza la formazione di composti aromatici. Le cause sono da ricercare principalmente nella scarsa qualità igienica del latte di partenza e da una scarsa attenzione allo spurgo della cagliata.

SFOGLIA : La pasta all'interno presenta fessurazioni parallele, risulta essere troppo disidratata e demineralizzata. Le cause sono rappresentate dall'eccessiva acidità del latte di partenza o ad una eccessiva acidificazione della pasta, eccesso di caglio, coagulazione veloce e variazioni di temperatura nei locali di stagionatura.

SPACCATURE DELLA CROSTA : È un difetto di origine tecnologica per cui le forme colpite presentano screpolature sulla crosta e/o spaccature superficiali visibili. Le cause vanno ricercate principalmente in una eccessiva demineralizzazione e disidratazione della cagliata che la rende poco elastica, provocando la formazione precoce della crosta. Il difetto può derivare da temperature e umidità non idonee alla conservazione o l'uso di latte troppo acido. Una circostanza che causa un'eccessiva attività fermentativa negli strati di pasta sottostanti con produzione di gas e l'esercizio di una pressione dall'interno verso l'esterno.

UNGHIA: Nel gergo caseario l'“unghia” è una crosta eccessivamente spessa e secca, con una colorazione grigiastra. Il difetto è causato da un'eccessiva salatura, dall'areazione eccessiva dei locali che disidrata troppo rapidamente la crosta o dalle elevate temperature che provocano un eccesso di trasudazione del grasso.

Capitolo secondo

SCOPO DEL LAVORO

Il Parco Nazionale dei Monti Sibillini prende il nome dal Monte Sibilla ed è questa la zona di produzione di alcuni prodotti tipici della regione Marche tra cui il formaggio Pecorino dei Sibillini.

La lavorazione casearia di questa zona ha origini molto antiche e profondamente radicate nel territorio da sempre testimone di una intensa attività pastorale. Il metodo di produzione del Pecorino prevede l'uso di latte pastorizzato o latte crudo e successiva stagionatura in ambiente naturale.

L'attività di ricerca è stata avviata al fine di studiare ed analizzare la Biodiversità Microbica relativa alla lavorazione e creazione del formaggio di tipo Pecorino. Nel progetto sono state coinvolte alcune aziende agricole situate nell'entroterra marchigiano, zona colpita dal sisma nel 2016, molte delle quali costrette a spostare i luoghi atti alla lavorazione, stagionatura e deposito dei prodotti in locali differenti da quelli originari.

In tutti i caseifici sono stati effettuati campionamenti sugli ambienti di lavoro e sui formaggi nei vari stadi di maturazione. Lo studio ha posto l'attenzione sulla

valutazione quantitativa e qualitativa della presenza negli elementi oggetto di esame dei microrganismi che contribuiscono a rendere il prodotto finale caratteristico e distinguibile. Nello specifico lo scopo ultimo è stato quello di stimare la presenza di lieviti e batteri, sia lattici che enterici, come indice di contaminazione fecale ottenendo ulteriori informazioni su lieviti, muffe e batteri individuati nelle varie zone di lavorazione e conservazione delle forme.

Il lavoro sperimentale, condotto mediante analisi microbiologiche e molecolari, ha permesso di identificare e caratterizzare i lieviti mettendone in risalto i tratti fenotipici e fisiologici; alcuni ceppi selezionati sono stati sottoposti ad attività di tipo enzimatico che hanno messo in evidenza le suddette caratteristiche svolgendo un ruolo fondamentale nella maturazione dei formaggi.

Capitolo terzo

MATERIALI E METODI

3.1 Campionamenti

Nelle giornate del 21 e 28 marzo 2019 sono stati eseguiti dei campionamenti in alcuni caseifici a conduzione familiare situati nella zona dei Monti Sibillini della regione Marche, al fine di prelevare dei campioni utili ai successivi esami microbiologici.

Gli stabilimenti caseari presi in considerazione sono stati i seguenti:

1. Caseificio MM (Monte San Martino, MC)
2. Caseificio BB (Gualdo, MC)
3. Caseificio AN (Pieve Torina, MC)
4. Caseificio L (San Ginesio, MC)
5. Caseificio PC (Visso, MC)

L'obiettivo ha avuto come finalità l'analisi della Biodiversità Microbica presente nei suddetti caseifici, aderendo al progetto Bio.MI.Ma-Biodiversità Microbica nelle Marche del centro operativo Agrometeorologia ASSAM.

3.1.1 Raccolta dei campioni

Nei vari caseifici sono state prelevate con sacchetti sterili delle parti di forme a vari stadi di maturazione mentre per l'esame di tipo ambientale sono stati utilizzati dei tamponi monouso immersi in 9 ml di soluzione fisiologica sterile.

Tutti i campioni prelevati sono stati conservati a 4°C sino all'arrivo in laboratorio, dove sono state svolte le analisi che hanno permesso di identificare e quantizzare i gruppi microbici presenti.



Fig.6 Stagionato più di 6 mesi

In Tab.1 sono riportati i campioni per l'analisi microbiologica ambientale ed alimentare.

	Formaggi	Ambienti
Caseificio MM	Fresco 30 giorni	Muto locale unico
		Tavola 2 locale unico
	Intermedio 3 mesi	Tavola 1 locale unico
		Telo cotone locale unico
	Stagionato più di 6 mesi	Tavole stanza sinistra
		Muro cella stagionatura
Griglia di appoggio cella di stagionatura		
Caseificio BB	BAT. 16.01.19	Griglia sopra
		Griglia sotto
	BEC. misto Gennaio 2019	Muro plastica
		Muro cemento
	BEC. Sarda Settembre 2018	Carrello formaggi 21.03.19
		Carrello formaggi 15.03.19
Caseificio AN		Cesti vuoti
		Muro locale lavorazione
		Muro cella lavorazione
		Griglia cella lavorazione
		Griglia 2 cella lavorazione
Caseificio L	Fresco 20 giorni	Muro locale stagionatura
		Griglia locale lavorazione
		Muro locale lavorazione
Caseificio PC	Fresco 2 giorni	Muro sala stagionatura
		Griglia sala stagionatura
	Intermedio 25 giorni	Cesto salamoia
		Muro sala maturazione
	Stagionato 18 mesi	Griglia sala maturazione

Tab.1 Campioni presi in esame

3.2. Terreni di coltura impiegati

I terreni agarizzati e liquidi, impiegati per le colture in laboratorio, sono stati preparati seguendo le specifiche quantità, proprie di ogni tipologia.

1. Per favorire la crescita dei lieviti, ostacolando quella dei batteri lattici sono stati usati terreni pronti in polvere, contenenti agar, da solubilizzare in acqua deionizzata nelle seguenti proporzioni:

- WL : 80 g su 1000 ml.
- Rose Bengala : 16 g su 500 ml; con aggiunta di cloramfenicolo come antibiotico per impedire la crescita dei batteri.

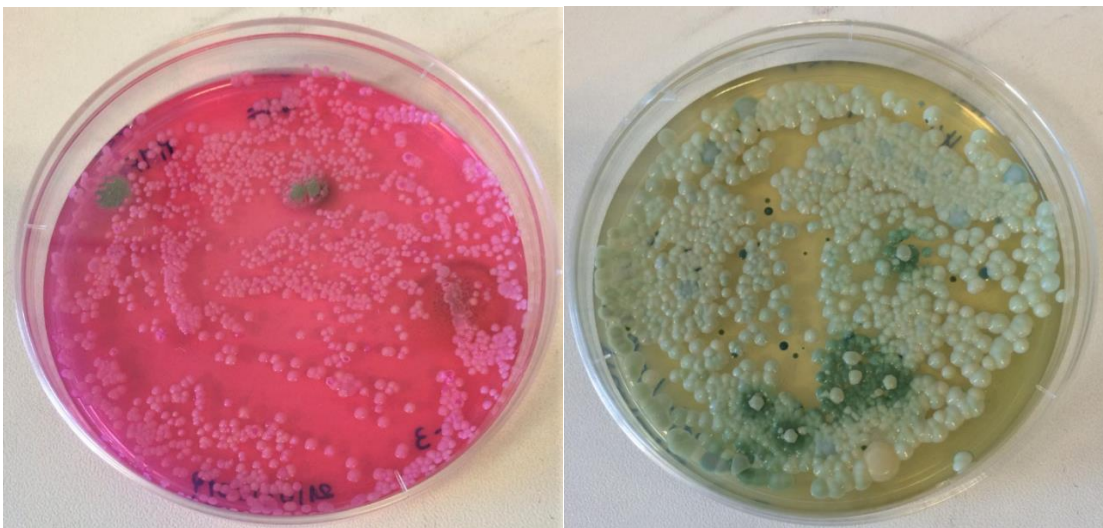


Fig.7 e 8 Campione MMF1 alla -3 in piastre di Petri su terreno Rose Benagala e WL a confronto

2. Per la crescita dei batteri sono stati utilizzati i seguenti terreni già pronti in polvere da sospendere in acqua distillata nelle seguenti proporzioni:
- MRS : 70,2 g su 1000 ml, per i Lattobacilli;
 - M17 : 55,2 g su 1000 ml, per Lattococchi e Streptococchi;
 - PCA : 23,5 g su 1000 ml, posto a 10°C e 37°C per la crescita di Psicrofili e Mesofili rispettivamente.
 - VRBGA : 41,5 g su 1000 ml, per gli Enterobatteri.
3. Per il mantenimento delle colture di collezione, per gli isolamenti e per i conteggi è stato utilizzato il YPD, sia solido che liquido, costituito dai seguenti composti, disciolti in acqua deionizzata:
- 2% peptone
 - 2% glucosio
 - 1% estratto di lievito
 - 1,8% Agar (nel caso di terreno solido).
4. Per la caratterizzazione enzimatica dei lieviti, sono stati impiegati i seguenti terreni, specifici per ogni attività enzimatica. Tutti i componenti sono stati sciolti in acqua deionizzata.

▪ Attività proteolitica :

- Estratto di lievito 3g/L ;
- Estratto di Malto 3g/L ;
- Peptone 5g/L ;
- Glucosio 10g/L ;
- NaCl 5g/L ;
- Skin milk 50g/L ;
- Agar 15g/L.

▪ Attività Killer :

- Estratto di Malto 10,8 g
- Agar 7,2 g

sciolti in 200 ml di H₂O deionizzata e aggiunti a

- Acido citrico 2,44 g
- Na₂HPO₄ 2,32g

Sciolti in altri 200 ml di acqua deionizzata, come tampone citrato-fosfato.

- Lipasica : 10 ml di Tributirina, supplemento liquido, filtrati e aggiunti dopo il normale processo di sterilizzazione a 1 litro di terreno già formato, il Tributirrin Agar.

- Attività esterasica
 - Peptone 10g/1 ;
 - NaCl 5g/1 ;
 - CaCl₂ 0,1g/1 ;
 - Tween 80 10g/1 ;
 - Agar 20g/1.

3.3 Analisi di laboratorio

Sono state svolte diverse analisi microbiologiche, che hanno permesso di isolare, studiare e visualizzare la qualità e la quantità approssimativa dei microrganismi presenti nei caseifici campionati.

In un primo momento sono stati preparati terreni con finalità diverse per la crescita dei vari microrganismi, i quali sono riportati sopra in elenco [3.2].

In questo modo sono state differenziate le diverse classi di microrganismi, divisi per quantità e caseifici.

Il passo successivo ha comportato l'isolamento alcuni ceppi, tramite l'impiego di piastre con terreno YPD; da questi ne sono stati selezionati alcuni per proseguire nelle seguenti tappe analitiche che avrebbero condotto alla loro identificazione. Tali processi di analisi prevedono l'estrazione del DNA, la PCR e l'elettroforesi su gel d'Agaroso.

Sebbene la caratterizzazione fenotipica, basata sulle proprietà morfologiche e fisiologiche dei lieviti sia ancora la base per l'identificazione delle specie di microrganismi, è noto che essa può essere fortemente influenzata dalle condizioni fisiologiche del ceppo. Questa variabilità ha portato all'impiego di tecniche di discriminazione a livello basate sull'analisi del DNA, che hanno fatto compiere alla analisi tassonomica un enorme avanzamento in termini di attendibilità e discriminazione. Il DNA, infatti, è caratteristico di ogni specie, non varia con il modificarsi delle condizioni metaboliche della cellula, è facilmente estraibile e conservabile. L'invenzione della reazione a catena della Polimerasi (PCR: Polimerase Chain Reaction) da parte di Kary B. Mullis nei primi anni '80, ha ulteriormente ampliato le tecniche a disposizione del tassonomista molecolare andando oltre l'analisi del DNA totale. L'introduzione di queste metodologie ha, inoltre, reso possibile, almeno per alcune specie, la discriminazione a livello intraspecifico, rendendo cioè distinguibili diversi ceppi appartenenti ad una stessa specie.

3.3.1 Isolamento, purificazione ed esame morfologico dei lieviti

Per arrivare ad isolare i lieviti presenti nel pecorino e negli ambienti considerati sono state allestite diluizioni decimali (fino a 10^{-7}) dei vari campioni, in seguito inoculate per spatolamento superficiale su piastre di diversi substrati nutritivi agarizzati: WL e Rose Benagala, per la crescita esclusiva di lieviti; MRS e M17 per bacilli e cocchi; VRBGA per gli enterobatteri e PCA, posto a 10 e 37°C per psicrofili e mesofili.

Una volta effettuate le conte su piastra, lo step successivo ha comportato la distinzione mediante analisi macroscopica delle colonie cresciute, distinte per dimensione, forma, colore, opacità e una serie di parametri che hanno permesso una loro parziale differenziazione. Sono state, poi, isolati circa 500 ceppi, che mostravano caratteristiche morfologiche diverse.

Per isolare i lieviti sono state preparate piastre con terreno di YPD, che è un substrato di uso molto comune per l'isolamento dei lieviti, sulle quali sono state disseminate le 500 colonie singole individuate. Una volta scartate quelle simili, ipoteticamente appartenenti alla stessa specie, ne sono state selezionate 152 colonie singole ulteriormente disseminate su terreno YPD, su queste si sono poi effettuate le successive analisi di tipo molecolare che avrebbero portato alla loro caratterizzazione e identificazione di specie.

Parallelamente il ceppo in coltura pura viene inoculato in YPG liquido e, una volta cresciuto, miscelato a glicerolo sterile e conservato a -80°C in tubi adatti alla crioconservazione.

3.3.2 Estrazione del DNA dai ceppi isolati

L'estrazione del DNA dai ceppi isolati è stata condotta seguendo il protocollo per l'estrazione del DNA dai lieviti *non-Saccharomyces*, usato anche per i controlli *Saccharomyces*.

Il metodo consente di ottenere, in maniera semplice e veloce, del DNA utilizzabile in esperimenti di Polimerase Chain Reaction (PCR).

Il protocollo prevede le seguenti fasi:

- Crescita delle cellule su piastra con terreno YPD-agar
- Prelevare le cellule sulla piastra con un'ansa di plastica e metterle in un eppendorf con 300 µl di tampone (0,1M Tris a pH 8,5 – 50mM EDTA pH8 – 1% SDS)
- Aggiungere delle sfere di vetro per circa 1/3 del contenuto dell'eppendorf
- Vortexare per 1 minuto e porre in ghiaccio per 1 minuto, ripetendo tali operazioni per tre volte
- Bollire le eppendorf in acqua per dieci minuti

- Mettere in ghiaccio per tre minuti
- Aggiungere 20 µl Tris HCl 1M e 15 µl EDTA 0,5 M
- Aggiungere 50 µl di SDS 10% e mescolare con la pipetta
- Aggiungere 200 µl di Potassio Acetato 5M (non piaccato) e spipettare brevemente
- Porre i campioni 30 minuti in ghiaccio
- Centrifugare per 10 minuti a 14.000 rpm
- Prelevare 500 µl di sovrnatante e aggiungere egual volume di Isopropanolo freddo (conservato a -20°C)
- Incubare per 5 minuti in ghiaccio e centrifugare 10 minuti a 14.000 rpm
- Eliminare il sovrnatante ed aggiungere 500 µl di etanolo al 70% freddo
- Centrifugare per 5 minuti ed eliminare l'Etanolo
- Risospendere su 100 µl di TE pH8
- Incubare in stufa a 30-45°C per 15 minuti
- Spipettare bene e vortexare

Seguendo tale procedura, il surnatante ottenuto contiene il DNA dei ceppi

microbici da sottoporre a PCR e può essere conservato per ulteriori

amplificazioni a -20 °C.

3.3.3 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Le tecniche basate sulla PCR (K. Mullis, 1983) si sono rivelate un mezzo estremamente veloce ed efficace per l'identificazione, la tipizzazione ed il monitoraggio dei microrganismi.

Sfruttando la reazione a catena della DNA-polimerasi, la PCR permette l'amplificazione selettiva di una piccola regione genomica delimitata da due brevi sequenze specifiche.

Il procedimento prevede tre steps, che si ripetono ciclicamente per circa 30-40 volte:

- 1) Denaturazione (a 94-99°C) : le due eliche che compongono i filamenti devono essere separate.

In questa prima tappa vengono poste in soluzione DNA da replicare, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, *primer* e TAQ polimerasi

- 2) Annealing (a 40-55°C) : si fanno riassociare i filamenti singoli in presenza di un eccesso di due oligonucleotidi sintetici, detti “primers”, che rappresentano le sequenze delimitanti la regione che si vuole amplificare.

3) Allungamento (a 65-72°C) : determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA mediante l'azione della DNA-polimerasi

La DNA-polimerasi comunemente utilizzata è la Taq-polimerasi, un enzima estratto da un microrganismo termofilo: *Thermus aquaticus*. L'enzima è caratterizzato da un'elevata termostabilità, proprietà che gli permette di esplicare la sua azione nonostante le alte temperature (90-95 °C) che si raggiungono al momento della denaturazione della doppia elica.

I cicli di denaturazione, ibridazione e polimerizzazione possono essere reiterati in una macchina programmata per compiere queste operazioni, detta termocicizzatore, che consiste in una cella termostata che viene ritmicamente riscaldata per denaturare il DNA e raffreddata per permettere l'appaiamento di questo con i primer e la copia del filamento.

Esistono molti metodi molecolari basati sulla PCR per l'identificazione, la tipizzazione ed il monitoraggio dei batteri e ogni buon protocollo per la identificazione e/o la tipizzazione di un isolato batterico dovrebbe essere specifico, sensibile, riproducibile, rapido, semplice e a basso costo. In particolare, le tecniche basate sulla PCR (AFLP, AP-PCR, DAF, RAPD, rep-PCR, eric-PCR, tDNA-PCR, ARDRA, ITS, sequenziamento del 16S rDNA) si

sono rivelate un mezzo estremamente veloce ed efficace per l'identificazione, la tipizzazione ed il monitoraggio dei batteri.

In questo caso è stata effettuata la PCR ITS (Internal Transcribed Spacer, regione interna all'rDNA dei lieviti) che prevede l'amplificazione della regione intergenica compresa tra il 16S rDNA ed il 23S rDNA, con primers ITS1 e ITS4.

La fase preparatoria prevede l'utilizzo di mini-ependorf, in cui vengono aliquotati 5ul di ogni campione proveniente dal processo di estrazione del DNA, a questi vengono poi aggiunti 45 µl di una soluzione mix contenente:

- DreamTaq Buffer 5 µl
- dNTP 0,5 µl
- ITS1 0,5 µl
- ITS4 0,5 µl
- H2O 38,4 µl
- Taq 0,2 µl

È bene sottolineare che queste misurazioni si riferiscono al volume per un solo campione, sono stati quindi modificati in base alla quantità di campioni presi in esame volta per volta.

Per arrivare ad ottenere tali valori si è partito dal presupposto di ottenere un volume finale di 50 μ l, utilizzando ogni qualvolta la formula base $C_i x V_i = C_f x V_f$.

Vengono quindi riportati qui di seguito i calcoli effettuati per i singoli componenti:

1. DreamTaq Buffer : $10X \times X = 1X \times 50 \mu\text{l}$, dove $X = 5 \mu\text{l}$
2. dNTP : $10\text{mM} \times X = 0,1\text{mM} \times 50 \mu\text{l}$, dove $X = 0,5 \mu\text{l}$
3. ITS1 : $50\text{uMol} \times X = 0,5\text{uMol} \times 50\text{ul}$, dove $X = 0,5\text{ul}$
4. ITS4 : $50\text{uMol} \times X = 0,5\text{uMol} \times 50\text{ul}$, dove $X = 0,5\text{ul}$
5. Taq : $5U : 1 \mu\text{l} = 1U : X\mu\text{l}$, dove $X = 0,2 \mu\text{l}$

Per quanto riguarda l'acqua si ricorre alla sottrazione del totale di tutti i precedentemente elementi elencati al volume finale di 50 μ l, per ottenere in fine un Volume di 38,4 μ l.

3.3.4 Elettroforesi su gel d'Agarosio

Per la rilevazione del DNA amplificato è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel di agarosio, in cui avviene una migrazione dei frammenti di DNA per effetto di un campo elettrico e quindi una loro separazione in base al peso molecolare.

Il DNA, carico (-) a pH neutro, migra verso il polo positivo (anodo), in funzione del suo peso molecolare.

Più grossa è la molecola, maggiore sarà la resistenza opposta dalle maglie del gel e, quindi, più lenta sarà la migrazione.

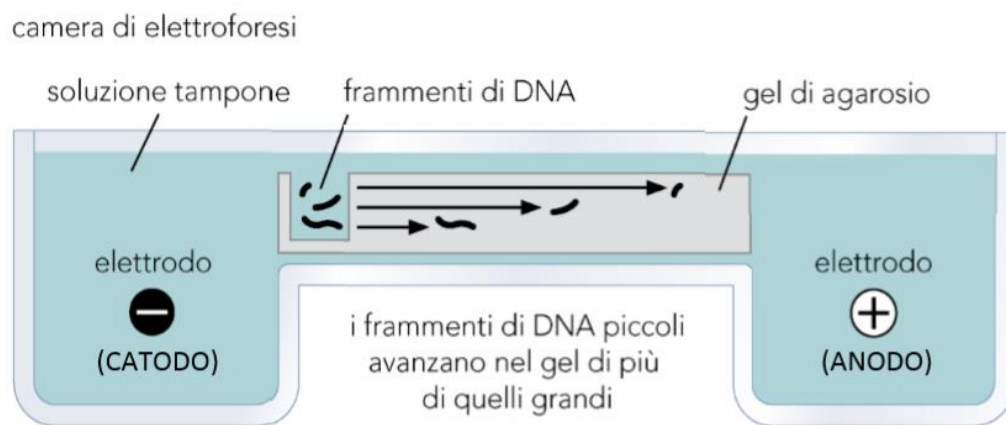


Fig.9 Apparecchio elettroforetico

La tecnica prevede i seguenti passaggi :

- Pesare la quantità desiderata di agarosio (1,5g) e scioglierla in un volume adatto di tampone TBE 0,5X (100ml di Tris-borato) all'interno di una beuta
- Far bollire la beuta, fino a che il liquido assume colorazione trasparente
- Aggiungere Bromuro di Etidio (4,5 ml) e versare il liquido nell'apposito apparato per la corsa elettroforetica.

- Nei pozzetti, formati nel gel a mezzo di un pettine, sono caricati in ordine: un marker 100x e i campioni amplificati (10 μ l) miscelati ad un colorante, il blu di bromofenolo 6X (3 μ l).
- Chiuso l'apparecchio e collegato ad un voltaggio di 75V , si fa partire la corsa elettroforetica per circa 1 ora.
- Avvenuta la corsa, illuminare il gel con raggi UV per rendere visibile il DNA. L'EtBr ha la capacit  di legarsi al Dna, intercalandosi nella doppia elica, e di emettere luce arancione se colpita dai raggi UV di un transilluminatore. Le bande migrate sui gel sono state visualizzate con un transilluminatore UV e successivamente fotografate.

3.3.5 Sequenziamento del Dna

Il sequenziamento del DNA   la determinazione dell'ordine dei diversi nucleotidi (quindi delle quattro basi azotate che li differenziano, cio  adenina, citosina, guanina e timina) che costituiscono l'acido nucleico.

Una quantit  di campione pari a circa 35 ng di purificato (6 ng/100 bp)   stata inviata al Laboratorio Genewiz, che ha provveduto al sequenziamento del frammento di interesse mediante il metodo enzimatico di Sanger (Sanger, 1988). In questo modo   stata ottenuta una sequenza nucleotidica comparata

con quelle riportate in letteratura e depositate alla GeneBank del National Center of Biotechnology Information, avvalendosi del programma BLAST (Altschul et al., 1997).

3.4 Attività enzimatiche su lieviti selezionati

Con le seguenti prove si è verificata la produzione di enzimi extracellulari da parte dei trentacinque ceppi di lieviti, appartenenti a diverse specie, precedentemente coltivati su piastre di YPD a 25°C per 48 ore.

Per ciascuna delle prove enzimatiche, i lieviti sono stati risospesi in acqua sterile, prelevando delle colonie dalle piastre di crescita. Circa 10µl di ogni sospensione sono stati collocati, poi, nelle piastre relative alle varie attività enzimatiche. Inoltre, sono stati impiegati dei controlli positivi o negativi per ognuna delle prove di attività (anche essi cresciuti precedentemente a 25°C per 48 ore) che consentono il confronto dei ceppi presi in esame.

Ogni caratteristica enzimatica è stata valutata impiegando diversi terreni, contenenti gli opportuni substrati, che permettono la rilevazione delle attività.

I. ATTIVITÀ PROTEOLITICA

Sull'opportuno terreno vengono posti degli spot (10 μ l) con le sospensioni di lievito da saggiare. Vengono quindi incubate a temperatura ambiente per 5 – 6 giorni. Come controllo positivo si utilizza il ceppo Na-14, *Cryptococcus Albidus*.

La presenza di liquefazione del terreno attorno alle colonie indica positività all'attività proteolitica.

II. ATTIVITÀ KILLER

Per valutare questo tipo di attività si utilizza, oltre al controllo positivo ed ai trentacinque lieviti testati, anche un ceppo sensibile, incubato per 48 ore a 25°C, come gli altri ceppi. Di questo lievito (il 6500, *S. cerevisiae*) si misura la densità ottica allo spettrofotometro, perché abbia un valore tra 0.08 - 0.06, corrispondente ad una concentrazione pari a circa 10⁶ cellule/ml. La sospensione in acqua sterile di questo ceppo si piastra per inclusione all'interno del terreno apposito. Dopodiché si fanno degli spot, di circa 10 μ l ciascuno, dei lieviti da testare e del controllo positivo, che in questo caso è il 3003, *Wickerhamomyces anomalus*.

A questo punto le piastre vengono incubate a 25°C per 48 ore, periodo dopo il quale si valuta l'attività.

L'attività killer viene misurata come il diametro dell'alone di inibizione attorno allo spot dopo 48 ore a 25 °C.

III. ATTIVITÀ ESTERASICA

La capacità dei lieviti di produrre esteri viene valutata incubando per 6 giorni a 25°C, sul terreno apposito, i ceppi; in questo caso non è impiegato il ceppo di controllo, poiché la positività è visibile con la produzione di precipitato attorno alle colonie, come alone opaco attorno alla colonia.

IV. CRESCITA A 37°C E NEI SALI BILIARI

Si valuta in questo caso la capacità di sopravvivenza dei lieviti, 2,5 ul per ciascun ceppo aliquotati in microtiter, posti a 37°C. La crescita viene visualizzata dopo 24 ore e dopo 120 ore.

Allo stesso modo si agisce per la valutazione della crescita dei lieviti nei Sali biliari.

V. ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

Determinata su cellule di lievito utilizzando il radicale 1,1-difenile-2-picrylhydrazyl (**DPPH**, Sigma) con il metodo descritto da Chen et al. (2010).

- Coltivare il lievito per 24 ore in brodo YPD a 25°C
- Centrifugare 1 ml di cultura a 12000 rpm per 5 minuti
- Recuperare il pellet e lavarlo due volte con una soluzione sterile di NaCl 0,8% e risospendere in 1 ml della stessa soluzione
- Prelevare 800 µl di sospensione cellulare e aggiungere 1 ml di radicale DPPH
 - o (0,2 mM in etanolo) e vortexare
- Preparare la soluzione del bianco con 1 ml di DPPH e 800 µl di acqua deionizzata
- Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente e al buio
- Centrifugare a 12000 rpm per 5 minuti
- Misurare l'assorbanza a 517 nm prelevando 1 ml di supernatante
- La percentuale di riduzione del DPPH viene calcolata come segue:

$$[1 - A_{517\text{nm}}(\text{campione}) / A_{517\text{nm}}(\text{bianco})] \times 100\%$$

Capitolo quarto

RISULTATI

4.1 Biodiversità Microbica nei caseifici campionati

La tecnica della conta su piastra su terreni specifici per la crescita di determinati microrganismi, associata all'analisi macroscopica, ha permesso di evidenziare la biodiversità presente in ogni caseificio preso in esame ed ha fornito i risultati che, in termini di \log_{10} di Unità Formanti Colonie (UFC) per cm^2 , sono riportati nella tabelle che seguono.

Le analisi rivolte al caseificio MM hanno condotto verso risultati rilevanti in termini di eterogeneità e quantità. Dai numeri sotto riportati si denota una vasta gamma di microrganismi che popola e contribuisce a rendere il formaggio Pecorino qui prodotto caratteristico e distinguibile.

Nello specifico si rilevano sia nei formaggi che negli ambienti campionati maggiormente lieviti e batteri lattici, seguiti da le altre

classi di batteri con una minore percentuale di Enterobatteriacee; non sono presenti muffe, come riportato nei grafici 1 e 2.

AMBIENTI UFC/cm ²	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCHI E STREPTOCOCCHI	ENTEROBATTERIACEE	BATTERI PSICROFILI 10°C	BATTERI MESOFILI 37°C	MUFFE
Muro locale unico	2,84509804	6,8195439	3,380211242	3,184691431	3,342422681	3,176091259	
Tavola 2 locale unico	6,643452676	5,5563025	5,431363764	1,903089987	5,472756449	5,10720997	
Tavola 1 locale unico	6,164352856	3,7403627	5,431363764	1,301029996	5,089905111	4,812913357	
Telo cotone locale unico	5,857332496	5,0899051	5,11058971	3,62324929	5,204119983	4,986771734	
Stanza sin tavole	2,698970004	2,60206	2,301029996	2,447158031	0	4,494154594	
Cella stagionatura muro	3,544068044	0	2	0	2,301029996	0	
Cella stagionatura griglia appoggio	5,612783857	4,5314789	4,556302501	0	5,214843848	3,851258349	

Tab.2: risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica ambientale nel caseificio MM

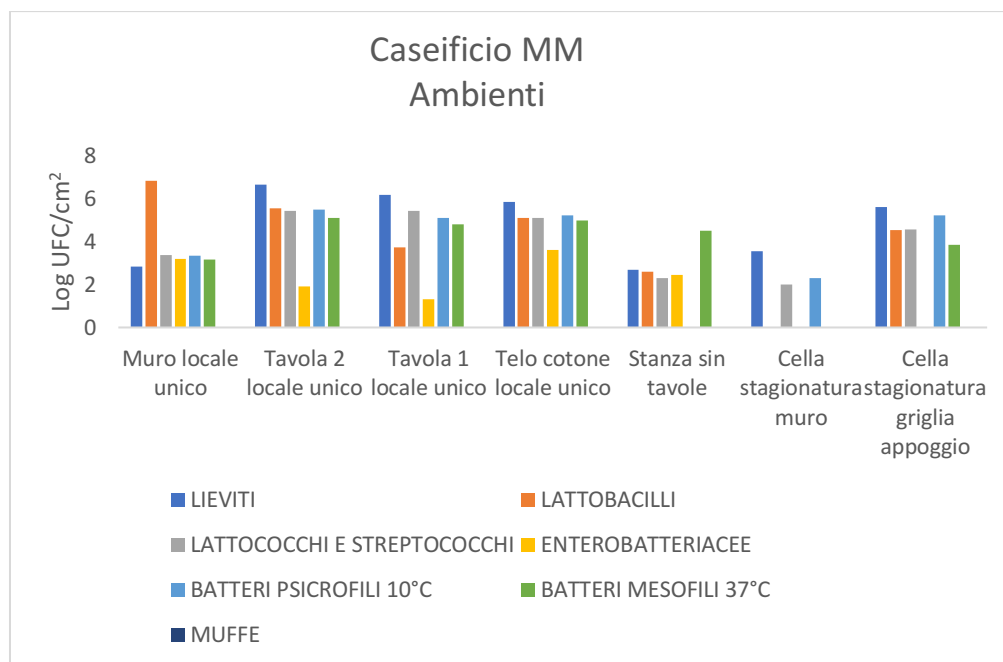


Grafico 1: Biodiversità Microbica ambientale nel caseificio MM

FORMAGGI UFC/g	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCHI E STREPTOCOCCHI	ENTEROBATTERIACEE	BATTERI PSICROFILI 10°C	BATTERI MESOFILI 37°C
Fresco 30 gg	6,264503317	8,3901587	8,407290258	6,331426117	8,396615668	8,391053918
Intermedio 3 mesi	6,435348229	7,9460473	7,998605791	5,161109647	7,801528861	7,990476258
Stagionato più di 6 mesi	6,220604985	6,2228021	7,760045164	3,265994776	6,630750387	5,986956285

Tab.3: risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio MM

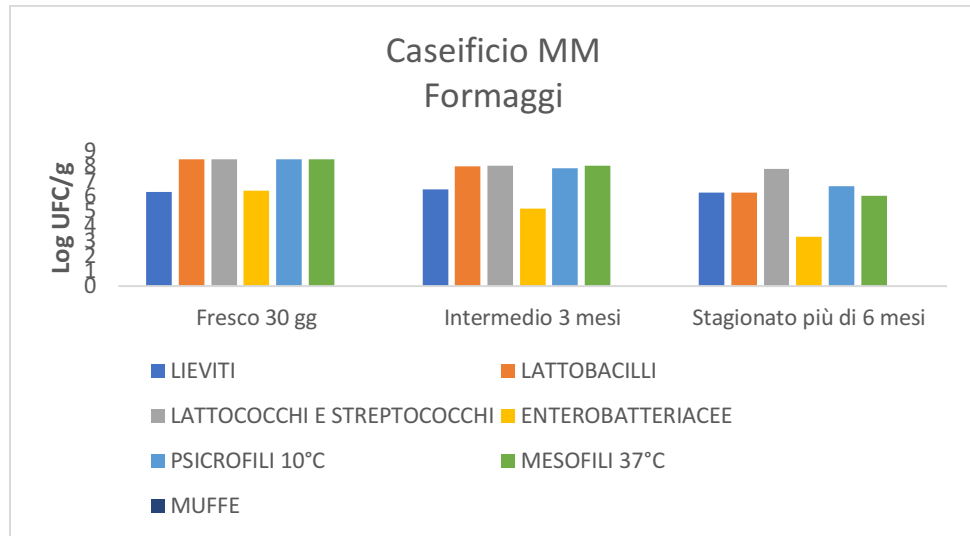


Grafico 2: Risultati Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio MM

Dai dati ottenuti nel Caseificio BB si può notare la presenza di enterobatteri, indice di contaminazione fecale, nei carelli di stazionamento delle forme e in piccola percentuale anche nei formaggi. Evidente è l'importanza che lieviti e lattobacilli ricoprono nel processo di realizzazione del prodotto finale, con una presenza più o meno rilevante dei Lattococchi, Streptococchi e batteri psicrofili e mesofili, oltre ad una leggera nota rivolta alle muffe riscontrate in una delle griglie di conservazione dei lavorati.

Nei grafici e tabelle sottostanti vengono riportati in maniera specifica i risultati ottenuti per ambienti e formaggi, relativi al caseificio BB.

AMBIENTI UFC/cm ²	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCI E STREPTOCOCCI	ENTEROBATTERIACEE	BATTERI PSICROFILI 10°C	BATTERI MESOFILI 37°C	MUFFE
Griglia sopra	4,130333768	3	2,903089987	0	3,653212514	2,602059991	1,954243
Griglia sotto	3,322219295	4	2,77815125	0	0	2,954242509	0
Muro plastica	0	2	2,477121255	0	0	2	0
Muro cemento	2,740362689	0	0	0	0	2	0
Carrello formaggi del 21/03	0	3	3,041392685	2,602059991	3,278753601	3,113943352	0
Carrello formaggi del 15/03	5,252853031	4,029383778	5,017033339	3,806179974	4,935003151	5,113943352	0

Tab.4: risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica negli ambienti nel caseificio BB

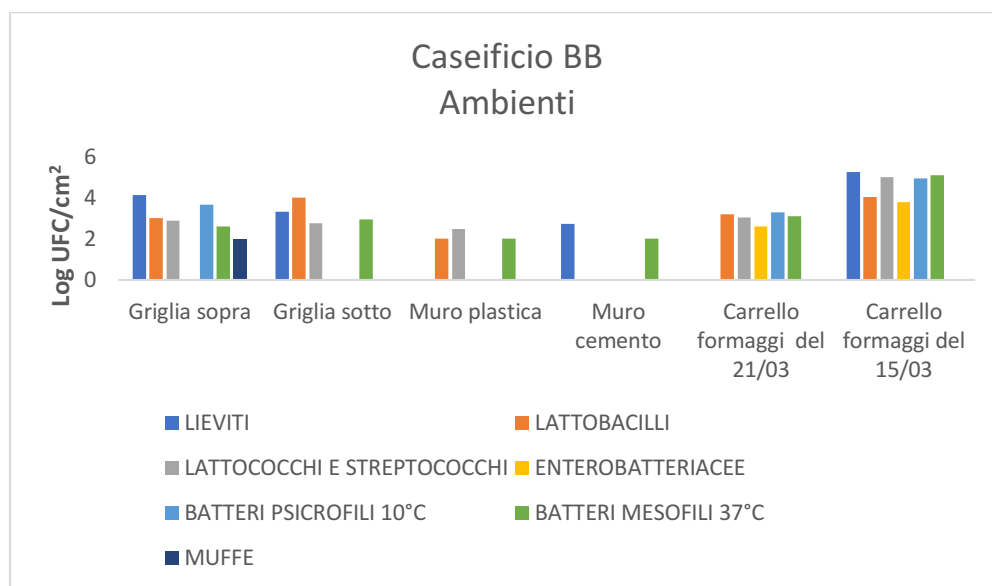


Grafico 3: Risultati Biodiversità Microbica negli ambienti nel caseificio BB

FORMAGGI UFC/g	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCI E STREPTOCOCCI	ENTEROBATTERIACEE	PSICROFILI 10°C	MESOFILI 37°C
Batassa 16.1	5,217412148	7,441830718	7,462854534	1,539590623	5,743851932	6,648358914
Becerica misto gennaio	6,264792166	6,907788874	7,313077761	1,650514998	6,370753071	6,946047301
Becerica sarda settembre	5,680485942	5	0	1,150514998	4,451544993	4,301029996

Tab.5: risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio BB

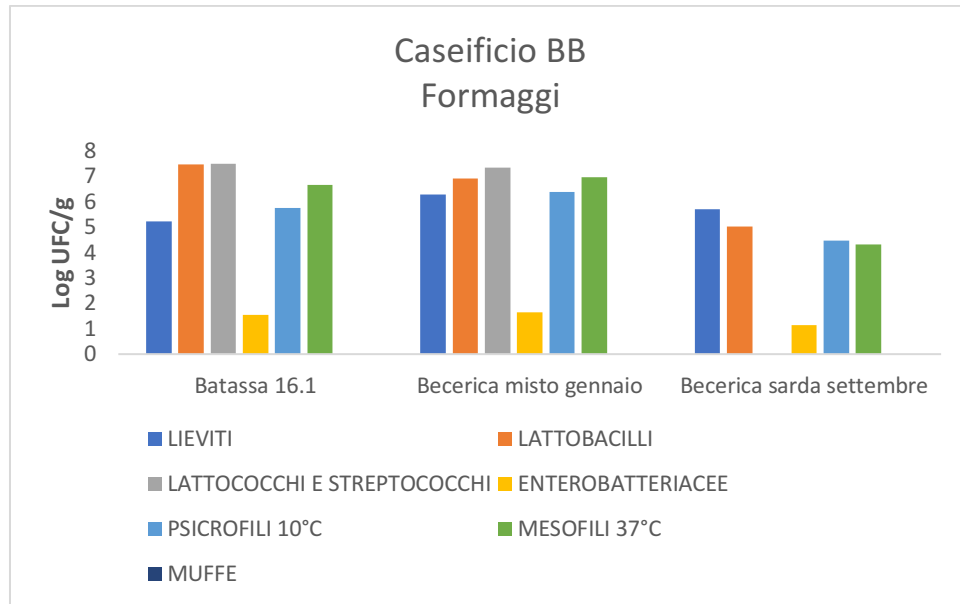


Grafico 4: Risultati Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio BB

Il caseificio AN è stato sottoposto solo ad analisi microbiologiche negli ambienti di lavoro, non essendo presenti al momento del campionamento formaggi finiti da poter prelevare ed esaminare. Relativamente agli ambienti, si evidenzia una notevole asetticità nei cesti di deposito e nei muri dei locali di lavorazione e stagionatura, mentre nelle griglie di deposito si riscontra una maggior presenza di microrganismi coinvolti nei processi di affinatura dei formaggi, come mostrato nel grafico 5.

AMBIENTI UFC/cm ²	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCHI E STREPTOCOCCHI	ENTEROBATTERIACEE	TERI PSICROFILI 10°C	TERI MESOFILI 37°C
Cesti	0	0	2	0	0	0
Muro loc. lavoraz.	0	0	0	0	0	0
Muro cella stagion.	0	0	3,397940009	0	0	0
Griglia1 cella stagion.	5,255	4,949390007	5,220108088	3,06069784	4,748188027	4,53147892
Griglia 2	5,681	4,806179974	5,209515015	2,51851394	0	4,47712125

Tab.6: Risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio

AN

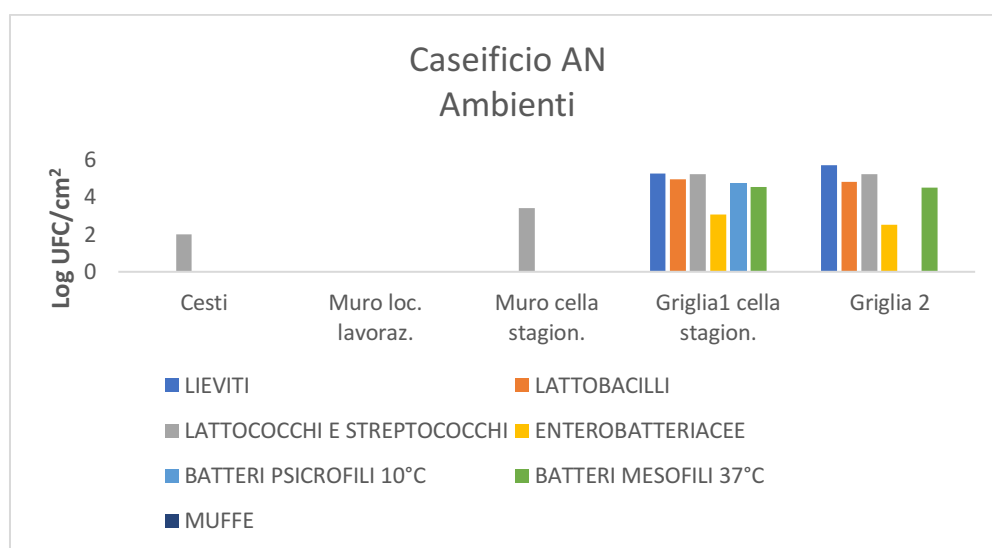


Grafico 5: Risultati Biodiversità Microbica negli ambienti nel caseificio AN

Il caseificio LAI mostra la quasi assenza di batteri e lieviti nei locali di stagionatura e quella completa di microrganismi rilevabili nella zona di lavorazione. I dati per i formaggi evidenziano, invece, una più alta presenza di lieviti e batteri, in minoranza le enterobatteriacee e non si registrano muffe.

AMBIENTI UFC/cm ²	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCHI E STREPTOCOCCHI	ENTEROBATTERIACEE	TERI PSICROFILI 10°C	BATTERI MESOFILI 37°C	MUFFE
Muro locale lavorazione	0	0	0	0	0	0	
Muro locale stagionatura	1,477121255	0	0	0	2	3	
Griglia locale stagionatura	5,748188027	0	5,939519253	1,602059991	5,716003344	5,029383778	

Tab.7: Risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica negli ambienti nel caseificio LAI

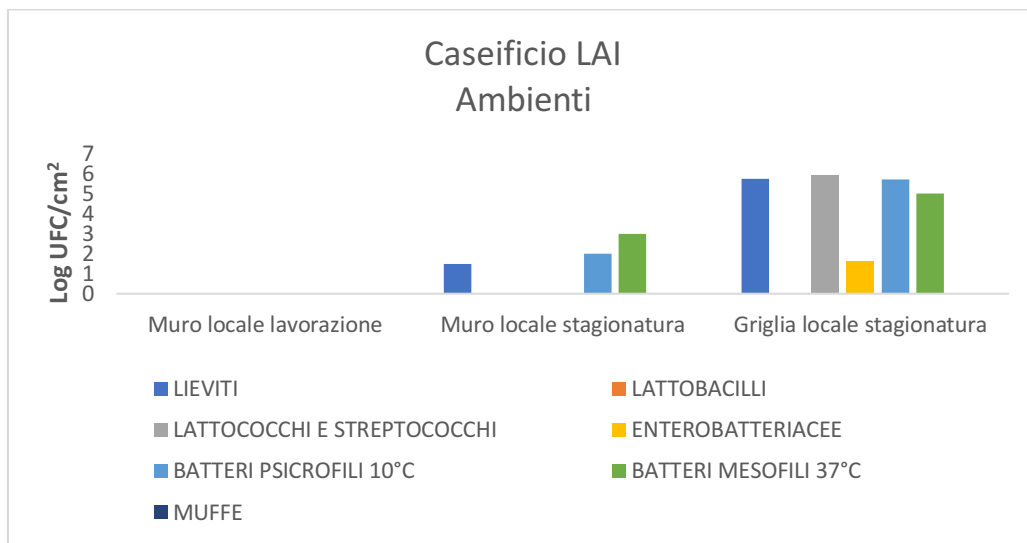


Grafico 6: Risultati Biodiversità Microbica negli ambienti nel caseificio LAI

FORMAGGI UFC/g	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCHI E STREPTOCOCCHI	ENTEROBATTERIACEE	PSICROFILI 10°C	MESOFILI 37°C	MUFFE
Formaggio 20gg	6,544952556	8,37804407	8,416901739	5,351834804	8,195899652	8,260071388	0

Tab.8: Risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio LAI

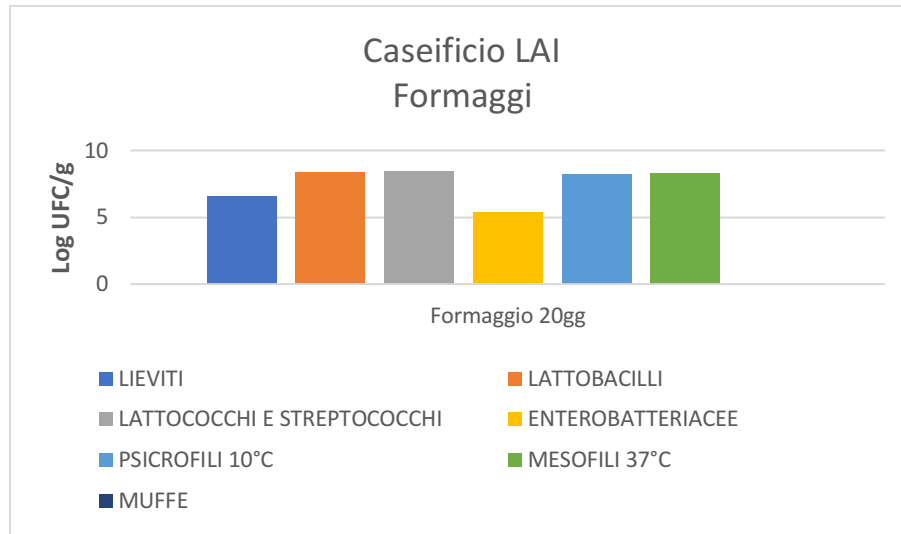


Grafico 7: Risultati Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio LAI

Nel caseificio PC si denota eterogeneità in termini di batteri soprattutto nelle griglie di appoggio delle forme situate nella sala di stagionatura, minore negli altri ambienti analizzati. Nei formaggi è allo stesso modo evidenziabile la vasta gamma di microrganismi coinvolti nei processi di lavorazione e stagionatura. È importante sottolineare che, oltre all'assenza di muffa, sono state rilevate Enterobatteriacee in quantità esigue solo in due dei formaggi campionati e completamente assenti nei locali di lavoro; questo denota buone condizioni igieniche a cui gli ambienti e di conseguenza anche i prodotti sono sottoposti.

AMBIENTI UFC/cm ²	LIEVITI	LATTOBACILLI	ATTOCOCCHI E STREPTOCOCCHI	ENTEROBATTERIACEE	BATTERI PSICROFILI 10°C	BATTERI MESOFILI 37°C	MUFFE
Sala stagionatura muro	3,178976947	0	0	0	0	0	
Sala stagionatura griglia	4,064457989	4,120573931	3,255272505	0	3,84509804	3,477121255	
Salamoia	1,477121255	0	2,602059991	0	2,602059991	0	
Sala maturazione muro	0	0	2,301029996	0	0	4,903089987	
Sala maturazione griglia	4,225309282	4,267171728	5,235528447	0	4	3	

Tab.9: Risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica negli ambienti nel caseificio PC

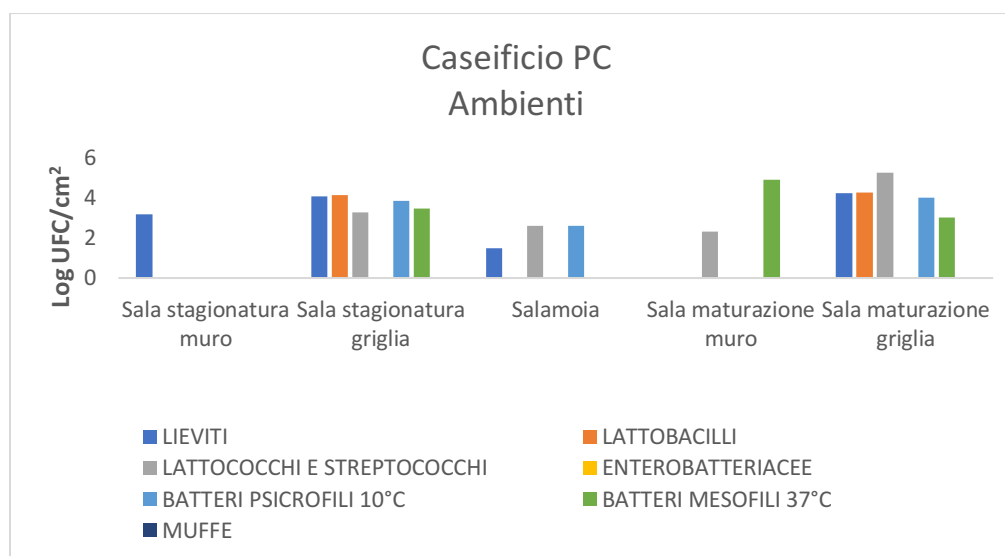


Grafico 8: Risultati Biodiversità Microbica negli ambienti nel caseificio PC

FORMAGGI UFC/g	LIEVITI	LATTOBACILLI	LATTOCOCCHI E STREPTOCOCCHI	ENTEROBATTERIACEE	PSICROFILI 10°C	MESOFILI 37°C	MUFFE
Fresco 2 gg	4,115352157	2,5	0	2,451544993	5,079181246	4,698970004	
Intermedio 25 gg	6,311024075	7,959041392	7,983586711	1,840620619	7,908485019	7,431363764	
Stagionato 18 mesi	6,210686779	6,477843875	6,56192582	0	6,285557309	6,568201724	

Tab.10: Risultati in log₁₀ della Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio PC

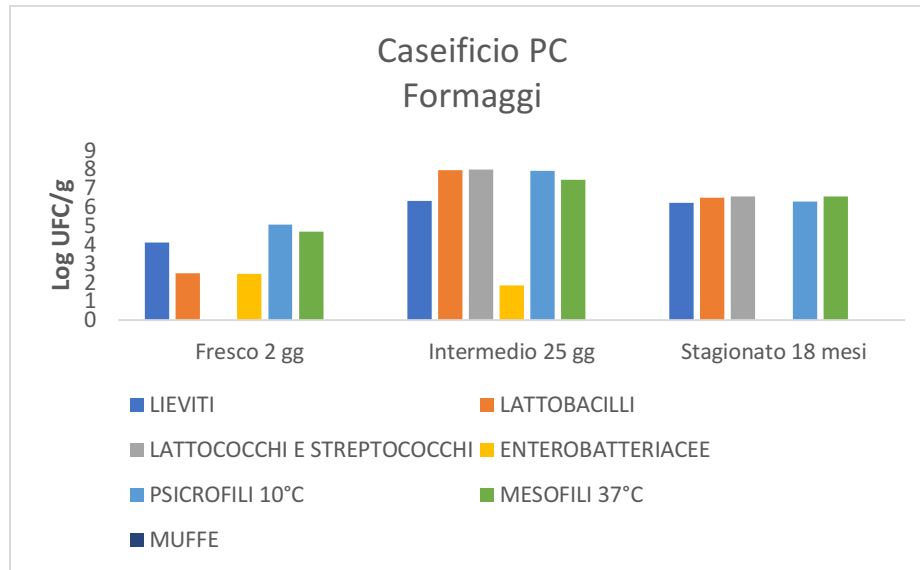


Grafico 9: Risultati Biodiversità Microbica nei formaggi nel caseificio PC

4.2 Identificazione dei lieviti

Dai 500 ceppi di lievito isolati ne sono stati selezionati 152, sottoposti poi a processi di estrazione del Dna, PCR ITS, Elettroforesi su gel d'Agaroso e Sequenziamento per arrivare alla loro identificazione.

Ogni lievito è associato ad un codice numerico, alla matrice da cui origina e al caseificio di appartenenza, come mostrato nella Tab.11.

È evidente come dei 92 ceppi identificati vi siano 3 specie maggiormente riscontrate in tutti i caseifici presi in esame : *Debaryomyces hansenii*, *Candida Zeylanoides* e *Yarrowia lipolitica*.

D. hansenii rappresenta il 57% , seguita da *C. zeylanoides* con il 25% e infine *Y. lipolitica* presente per il 6,5%.

Caseificio	Matrice	Codice	Specie
PC	Formaggi	27	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		28	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		29	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		30	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		31	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		32	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		33	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		34	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		35	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		36	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	37	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
	38	<i>Debaryomyces hansenii</i>	
	80	<i>Kluyveromyces lactis</i>	
	Ambienti	39	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		40	<i>Debaryomyces hansenii</i>
41		<i>Debaryomyces hansenii</i>	
42		<i>Debaryomyces hansenii</i>	
43		<i>Debaryomyces hansenii</i>	
44		<i>Debaryomyces hansenii</i>	
45		<i>Debaryomyces hansenii</i>	
BB	Formaggi	3	<i>Candida parapsilosis</i>
		25	<i>Candida zeylanoides</i>
		49	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		50	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		51	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		52	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		53	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		54	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		68	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		74	<i>Debaryomyces hansenii</i>
81	<i>Kluyveromyces lactis</i>		

		82	<i>Moniliella spp.</i>
		83	<i>Moniliella spp.</i>
		87	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	Ambienti	2	<i>Candida parapsilosis</i>
		26	<i>Candida zeylanoides</i>
		73	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		75	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		79	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		84	<i>Moniliella spp.</i>
		86	<i>Yamadazyma triangularis</i>
		88	<i>Yarrowia lipolytica</i>
	Formaggi	9	<i>Candida zeylanoides</i>
		10	<i>Candida zeylanoides</i>
		11	<i>Candida zeylanoides</i>
		12	<i>Candida zeylanoides</i>
		18	<i>Candida zeylanoides</i>
		19	<i>Candida zeylanoides</i>
		20	<i>Candida zeylanoides</i>
		23	<i>Candida zeylanoides</i>
		24	<i>Candida zeylanoides</i>
		55	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		72	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		89	<i>Yarrowia lipolytica</i>
		90	<i>Yarrowia lipolytica</i>
		92	<i>Yarrowia lipolytica</i>
MM	Ambienti	1	<i>Candida friedrichii</i>
		13	<i>Candida zeylanoides</i>
		14	<i>Candida zeylanoides</i>
		15	<i>Candida zeylanoides</i>
		16	<i>Candida zeylanoides</i>
		17	<i>Candida zeylanoides</i>
		21	<i>Candida zeylanoides</i>
		22	<i>Candida zeylanoides</i>
		56	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		57	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		58	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		59	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		60	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		61	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		62	<i>Debaryomyces hansenii</i>

		63	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		64	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		65	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		66	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		67	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		69	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		70	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		85	<i>Rhodotorula laryngis</i>
		91	<i>Yarrowia lipolytica</i>
AN	Ambienti	8	<i>Candida zeylanoides</i>
		71	<i>Debaryomyces hansenii</i>
LAI	Formaggi	4	<i>Candida zeylanoides</i>
		5	<i>Candida zeylanoides</i>
		6	<i>Candida zeylanoides</i>
		7	<i>Candida zeylanoides</i>
		46	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		47	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		48	<i>Debaryomyces hansenii</i>
	Ambienti	76	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		77	<i>Debaryomyces hansenii</i>
		78	<i>Debaryomyces hansenii</i>

Tab.11: Lieviti identificati

4.2.1 Diversità di specie

Per una migliore visualizzazione dei risultati ottenuti dalle analisi svolte in laboratorio è stata effettuata una distinzione per ogni caseificio delle varie specie di lievito individuate.

Nel caseificio MM sono apparse preponderanti sia nei formaggi che negli ambienti le specie *Debaryomyces hansenii* e *Candida zeylanoides*, quest'ultima soprattutto nelle tre le forme di Pecorino prese in esame. Sono seguite poi da una modesta presenza di *Yarrowia lipolytica*, come è possibile notare dai grafici 10 e 11.

I lieviti, come mostrato nella Tab.12, appaiono in quantità maggiori sulle tavole e il telo, zone dove vengono posti a riposare i formaggi.

Log AMBIENTI Log UFC/cm ²	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Rhodotorula laryngis</i>	<i>Candida friedrichii</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Muro locale unico	2,00	2,70		2,00	
Tavola 2 loc. unico	6,40	6,28			
Tavola 1 loc. unico	6,16				
Telo cotone loc. unico	4,85	5,81			4,00
Stanza sx tavole	2,70				
Muro cella stagionat.	3,52		2,30		
Griglia appoggio cella stagionat.	5,61				

Tab.12 :Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² negli ambienti del caseificio MM

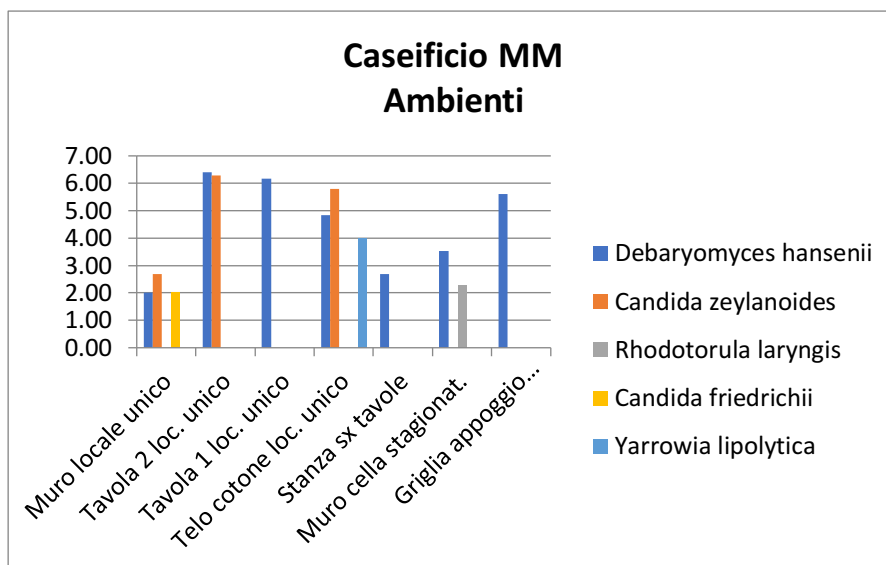


Grafico 10: Diversità di specie negli ambienti del caseificio MM

Nelle tre forme di Pecorino a vari stadi di maturazione è presente in maniera costante la specie *C. zeylanoides*, mentre *D. hansenii* risulta assente nel formaggio a media stagionatura come anche la *Y. lipolytica* in quello maggiormente stagionato [Tab.13].

Log Medie FORMAGGI MM	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
Fresco 30 gg	4,60	6,26	2,70
Intermedio 3 mesi		6,43	4,70
Stagionato 6 mesi	4,54	6,23	

Tab.13 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² nei formaggi del caseificio MM

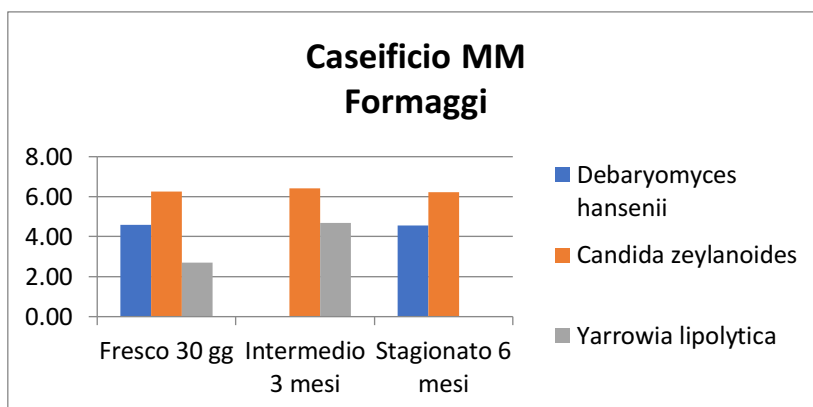


Grafico 11: Diversità di specie nei formaggi del caseificio MM

Lo stabilimento caseario BB ha registrato la specie *Debaryomyces hansenii* in maggior quantità sia nei luoghi di lavorazione che nei formaggi, seguita poi da *Yarrowia lipolytica* e *Candida Zeylanoides*.

La specie *D. hansenii* è presente in quasi tutti gli ambienti di lavorazione campionati, come mostrato in Tab.14 Grafico 12.

Log AMBIENTI BB	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Moniliella spp.</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Yamadazyma triangulus</i>
Griglia sopra	4,10	2,48	2,30	2,70		
Griglia sotto	2,60				2,00	3,20
Muro plastica						
Muro cemento	2,74					
Carrello formaggi 21/03						
Carrello formaggi 15/03	5,25					

Tab.14 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² negli ambienti del caseificio BB

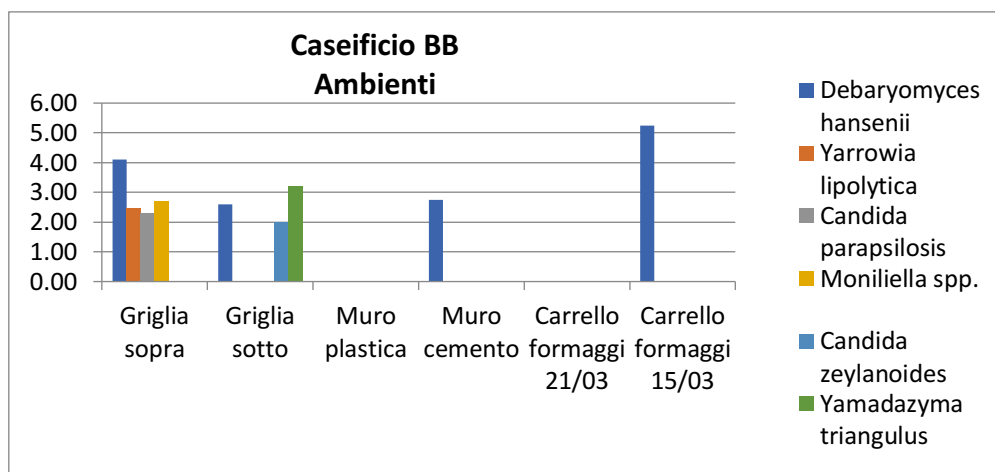


Grafico 12: Diversità di specie negli ambienti del caseificio BB

In questo caso mostra una certa eterogeneità in termini di specie, si è infatti riscontrata una leggera presenza di *Candida parapsilosis* e *Moniliella spp.* ed anche alcune non rilevate in altre aziende agricole campionate, come la *Yamadazyma triangulus*. Come riportato in Tab.15, questa vasta gamma di specie deriva principalmente da un formaggio BAT 16.01 da cui i ceppi sono stati isolati.

Log Medie Formaggi	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Moniliella spp.</i>
BAT 16.1	5,10	4,20	4,28	2,70	3,60	
BEC. MISTO GENNAIO	6,27					4,18
BEC. SARDA SETTEMBRE	5,64					4,40

Tab.15 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² nei formaggi del caseificio BB

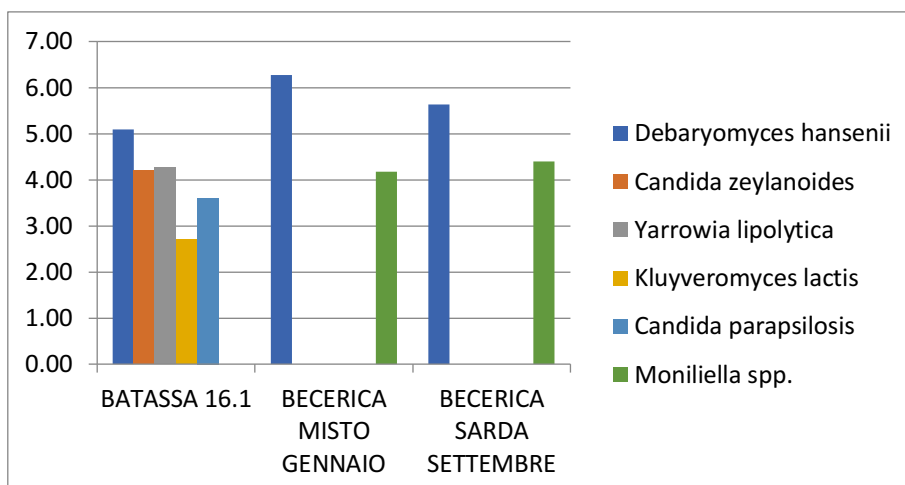
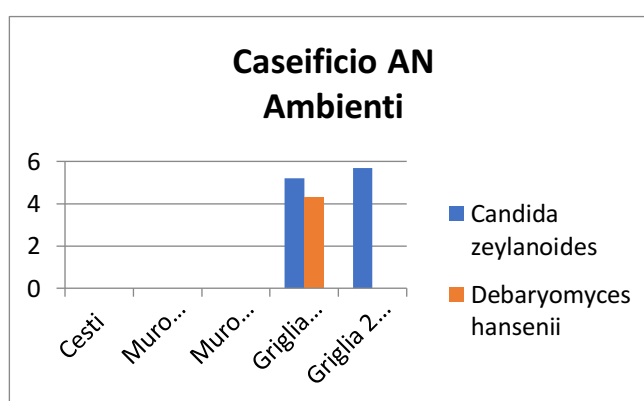


Grafico 13: Diversità di specie nei formaggi del caseificio BB

Il caseificio AN ha permesso la sola analisi degli ambienti di lavoro dove si è riscontrata assenza di microrganismi rilevabili in alcune zone e le uniche specie di lievito individuate sono state *Debaryomyces hansenii* e *Candida zeylanoides* [Tab.16] [Grafico 14].

Log AMBIENTI	<i>Candida zeylanoides</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Cesti		
Muro locale lavoraz.		
Muro cella stagionat.		
Griglia cella stagionat.	5,20	4,30
Griglia 2 cella stagionat.	5,68	

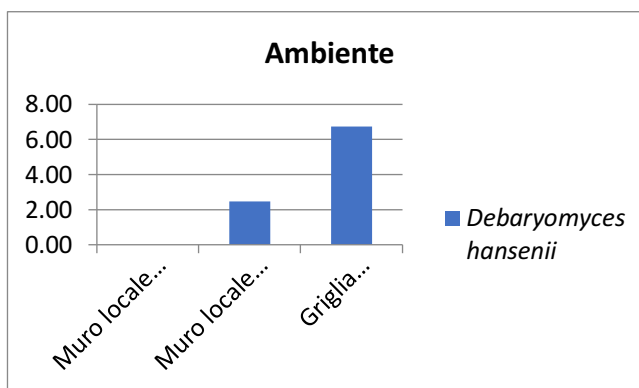


Tab.16 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² negli ambienti del caseificio AN

Grafico 14: Diversità di specie negli ambienti del caseificio AN

Nel caso dell'azienda agricola LAI l'unica specie rilevata durante i campionamenti ambientali è stata *Debaryomyces hansenii*, come raffigurato nel Grafico 15.

Log AMBIENTI LAI	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Muro locale lavoraz.	
Muro locale stagionat.	2,48
Griglia locale stagionat.	6,72

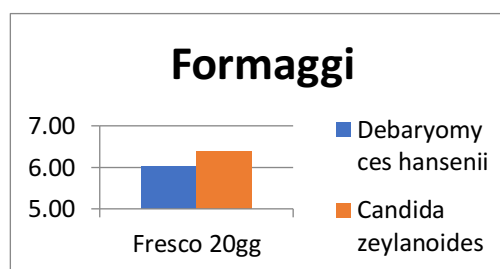


Tab.17 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² negli ambienti del caseificio L

Grafico 15: Diversità di specie negli ambienti del caseificio LAI

D. hansenii è stata isolata anche dalla matrice alimentare, oltre alla specie *C.zeylanoides*; in termini quantitativi le due specie non mostrano molta differenza come dimostrato dai dati riportati in Tab. 18 e nel Grafico 16.

Log Medie Formaggi	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Candida zeylanoides</i>
Fresco 20gg	6,03	6,39

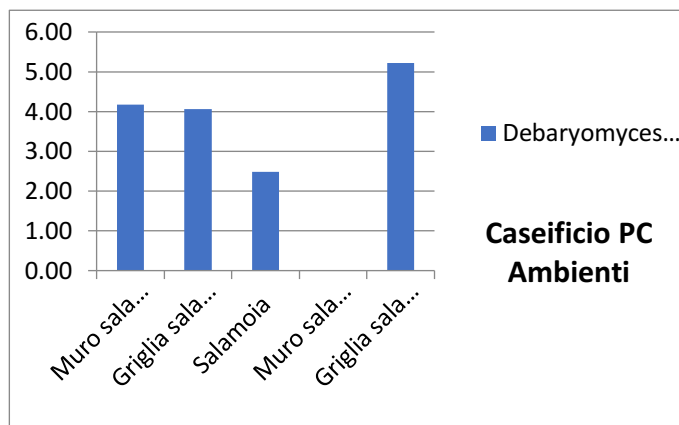


Tab.18 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² nei formaggi del caseificio LAI

Grafico 16: Diversità di specie nei formaggi del caseificio LAI

Nel caseificio PC è stata riscontrato un preponderante presenza di *Debaryomyces hansenii* nei locali di lavorazione e deposito, come evidente in Tab.19 e nel Grafico 17.

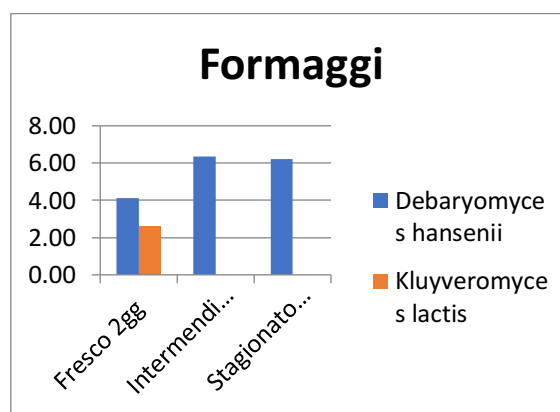
Log AMBIENTI	<i>Debaryomyces hansenii</i>
Muro sala stagionat.	4,18
Griglia sala stagionat.	4,06
Salamoia	2,48
Muro sala maturaz.	0,00
Griglia sala maturaz.	5,23



Tab.19 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² negli ambienti del caseificio PC

Grafico 17: Diversità di specie negli ambienti del caseificio PC

Log FORMAGGI	<i>Debaryomyces hansenii</i>	<i>Kluyveromyces lactis</i>
Fresco 2gg	4,10	2,60
Intermedio 25gg	6,33	0,00
Stagionato 18 mesi	6,21	0,00



Tab.24 : Diversità di specie in Log₁₀ UFC/cm² nei formaggi del caseificio PC

Grafico 18: Diversità di specie nei formaggi del caseificio PC

4.3 Risultati prove di attività enzimatiche

4.3.1 Valutazione dell'attività proteolitica, killer, lipolitica ed esterasica

Dai risultati relativi ai saggi per la valutazione delle attività enzimatiche, si è desunto che solo la specie *Yarrowia lipolytica* e un caso di *Candida zeylanoides* hanno attività esterasica. Ogni risultato ottenuto per una determinata specie è messo in confronto con quelli ottenuti per la stessa nei differenti caseifici.

Per quanto concerne l'attività proteolitica le tre specie di lievito maggiormente riscontrate hanno portato a esiti diversi: *Yarrowia lipolytica* ha condotto ad esito negativo per l'attività proteolitica, al contrario di *Debaryomyces hansenii* e *Candida zeylanoides* risultate positive a tale prova.

Si possono poi annoverare alcuni casi specifici riguardanti *Yamadazyma triangulus* e *Candida friedrichii* che non presentano positività a nessuna delle attività per cui sono state testate; *Moniliella spp.* è risultata avere sia attività killer che lipolitica ma non proteolitica ed esterasica.

	Specie	Proteolitica	Killer	Lipolitica	Esterasica
Formaggi MM	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-
	<i>Candida zeylanoides</i>	±	+	-	-
	<i>Candida zeylanoides</i>	±	±	-	-
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	-	+	+
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	±	-
Ambienti MM	<i>Candida zeylanoides</i>	+	-	-	+
	<i>Candida friedrichii</i>	-	-	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	±	+	+
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-	-
Formaggi PC	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	±	-	-
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	±	±	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	±	-	±	-
Ambienti PC	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-
Formaggi BB	<i>Debaryomyces hansenii</i>	±	-	-	-
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	+	+	+
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	+	-	-
	<i>Candida parapsilosis</i>	-	-	±	-
	<i>Candida zeylanoides</i>	-	+	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+	-	±
	<i>Moniliella spp.</i>	-	+	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-
	<i>Moniliella spp.</i>	-	+	±	-
Ambienti BB	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	±	+	-
	<i>Candida parapsilosis</i>	±	-	-	-
	<i>Moniliella spp.</i>	-	+	±	-
	<i>Yamadazyma triangulus</i>	-	-	-	-
	<i>Candida zeylanoides</i>	-	+	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	±	-	-
Ambienti AN	<i>Candida zeylanoides</i>	+	-	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-
Formaggi LAI	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	±	-
	<i>Candida zeylanoides</i>	±	+	-	-
Ambienti LAI	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	±	-	-

Tab.25: Valutazione delle attività enzimatiche

4.3.2 Valutazione dell'attività antiossidante

Nel valutare la capacità di riduzione dei radicali liberi dei ceppi di lievito selezionati si è notata una forte incidenza legata a *Kluyveromyces lactis* con una capacità antiossidante pari al 40% e soprattutto alla specie *Candida parapsilosis* con una percentuale ancora più elevata, tra il 53 e il 60%.

Le tre specie maggiormente presenti (*D. hansenii*, *C. zeylanoides* e *Y. lipolytica*), tranne per alcune eccezioni, hanno riportato in termini di capacità antiossidante con risultati compresi tra il 20 e il 40%.

Il ceppo *Yamadazyma triangulus*, riscontrata esclusivamente nel caseificio BB, ha portato ad un esito nettamente più basso rispetto alle altre specie esaminate con una percentuale del 5%.

Nella Tab.26 sono riportati dati che permettono di mettere in evidenza tali valori.

	Specie	Antiossidante % riduzione DPPH
Formaggi MM	<i>Debaryomyces hansenii</i>	24
	<i>Candida zeylanoides</i>	39
	<i>Candida zeylanoides</i>	24
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	32
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	13
Ambienti MM	<i>Candida zeylanoides</i>	31
	<i>Candida friedrichii</i>	23
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	25
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	35
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	22
Formaggi PC	<i>Debaryomyces hansenii</i>	19
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	44
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	27
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	18
Ambienti PC	<i>Debaryomyces hansenii</i>	36
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	21
Formaggi BB	<i>Debaryomyces hansenii</i>	0
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	30
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	40
	<i>Candida parapsilosis</i>	53
	<i>Candida zeylanoides</i>	30
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	19
	<i>Moniliella spp.</i>	21
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	25
	<i>Moniliella spp.</i>	22
Ambienti BB	<i>Yarrowia lipolytica</i>	40
	<i>Candida parapsilosis</i>	60
	<i>Moniliella spp.</i>	28
	<i>Yamadazyma triangulus</i>	5
	<i>Candida zeylanoides</i>	64
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	21
Ambienti AN	<i>Candida zeylanoides</i>	28
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	21
Formaggi LAI	<i>Debaryomyces hansenii</i>	13
	<i>Candida zeylanoides</i>	10
Ambienti LAI	<i>Debaryomyces hansenii</i>	29

Tab. 26: Valutazione dell'attività antiossidante

4.4 Valutazione della sopravvivenza a 37°C e ai Sali Biliari

Nel valutare la capacità di crescita a 37°C dei lieviti selezionati è evidenziabile come la maggior parte di questi mostrino positività al test solo dopo 120 ore, ad eccezione di alcuni ceppi di *Candida zeylanoides* e *Debaryomyces hansenii* che risultano dare esito negativo sia dopo 24 che 120 ore.

Le specie che al contrario hanno mostrato un grado di sopravvivenza superiore, riuscendo a crescere in entrambi i casi sono *Candida parapsilosis* e *Kluyveromyces lactis*. Differenti sono stati i dati ottenuti per *Moniliella spp.* e *Yamadazyma triangulus* in cui non è stata rilevata capacità di sopravvivere a 37°C nei due tempi considerati.

Attraverso l'uso di microtiter e di sali biliari provenienti da fegato animale è stato effettuato, inoltre, uno studio in vitro che ha permesso di individuare quali specie siano in grado di sopravvivere in tali condizioni.

La gran parte delle specie prese in analisi ha risposto negativamente, tranne due casi anomali di *Yarrowia lipolytica* e *Debaryomyces hansenii* che però sono stati annoverati con \pm in segno di incertezza del risultato ottenuto.

	Specie	37°C 24h	37°C 120h	Sali biliari
Formaggi MM	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	-
	<i>Candida zeylanoides</i>	-	+	-
	<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-
Ambienti MM	<i>Candida zeylanoides</i>	-	+	-
	<i>Candida friedrichii</i>	-	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	±	-
Formaggi PC	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	-
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	±	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	±	-
Ambienti PC	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	±	±	-
Formaggi BB	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	±	-
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	+	-
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	±	+	±
	<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	±
	<i>Candida zeylanoides</i>	-	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	-
	<i>Moniliella spp.</i>	-	+	±
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	-	-
	<i>Moniliella spp.</i>	-	-	±
Ambienti BB	<i>Yarrowia lipolytica</i>	±	+	±
	<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	-
	<i>Moniliella spp.</i>	-	-	-
	<i>Yamadazyma triangulus</i>	-	-	+
	<i>Candida zeylanoides</i>	+	+	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	-
Ambienti AN	<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	-
Formaggi LAI	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	±
	<i>Candida zeylanoides</i>	-	-	-
Ambienti LAI	<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	+	-

Tab.27: Valutazione della sopravvivenza a 37°C e ai Sali Biliari

Capitolo quinto

CONCLUSIONI E CONSIDERAZIONI

Per questo lavoro sperimentale sono stati selezionati caseifici artigianali che non usano starters commerciali. I lieviti presenti negli ambienti di lavoro e nei formaggi sono stati isolati e successivamente identificati. La maggior parte degli studi classici sul microbioma dei formaggi tradizionali ha posto particolare attenzione sulla caratterizzazione dei batteri lattici considerando i lieviti come deterioranti, indipendentemente dal tipo di formaggio. L'origine e il ruolo dei lieviti in questa matrice sono tuttavia abbastanza complessi e non ben definiti. I lieviti sono ampiamente dispersi nell'ambiente lattiero-caseario e per questo sono spesso considerati responsabili delle contaminazioni di latte crudo, aria, attrezzature, superfici ma questi non sempre svolgono un ruolo negativo nel formaggio. Essi potrebbero essere coinvolti nel processo di maturazione e fermentazione del lattosio residuo e nella formazione di metaboliti e aromi benefici (Atanassova et al., 2016).

Nel presente lavoro, è stata confermata la colonizzazione dei lieviti nel formaggio e nei caseifici. La concentrazione di lievito nei formaggi variava da 10^4 a 10^7 CFU g / l, in linea con quelli riportati da Borelli, Ferreira, Lacerda,

Franco e Rosa (2006) e Andrade, Melo, Genisheva, Schwan e Duarte (2017) che evidenziavano l'esistenza di un gran numero e grande variabilità dei lieviti coltivabili in campioni di formaggi a pasta dura. Per quanto riguarda l'abbondanza del lievito durante la fase di maturazione del formaggio, i risultati hanno mostrato chiaramente un aumento della concentrazione a media maturazione (formaggi di 6 mesi) con una conseguente riduzione durante il successivo periodo di stagionatura (formaggi di oltre 12-18 mesi).

Questa tendenza è in linea con i risultati di Addis, Fleet, Cox, Kolak e Leung (2001) che hanno evidenziato come alcuni fattori abiotici tra cui temperatura, concentrazione di sale e valore del pH insieme all'interazione lievito-lievito hanno regolato la crescita di ceppi colonizzanti in fase di maturazione.

Per quanto riguarda gli ambienti lattiero-caseari, è stato riscontrato un valore medio di colonizzazione del lievito, di circa 10^4 CFU / cm² per tutti i caseifici analizzati, risultato paragonabile a quello riportato da Viljoen (2001) che ha osservato la presenza di un numero costante di lieviti nell'aria, nelle attrezzature e negli ambienti di lavorazione. L'unica eccezione era rappresentata dal caseificio PC che mostrava una presenza di lieviti inferiore rispetto agli altri caseifici dovuta alle eccellenti pratiche igieniche applicate nell'azienda, supportate da un piano di autocontrollo HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point) ben strutturato e diretto. Diversi lavori hanno in merito attribuito

l'elevata contaminazione delle attrezzature a cattive procedure sanitarie (Marchand et al., 2012; Schön et al., 2016).

Le specie più frequentemente riscontrate sono *D. hansenii*, *C. zeylanoides* e *Y. lipolytica*, seguite da specie occasionali come patogeni opportunistici *C. parapsilosis* e *Y. triangularis* (Ceugniez, Drider, Jacques e Coucheney, 2015).

Alcuni studi hanno individuato diversi fattori estrinseci che risultano legati alle fasi della lavorazione tecnologica, ma anche al livello di igiene e ai fattori che influenzano la presenza e la dinamica del lievito (Achi & Ukwuru, 2015; Johansen, Owusu-Kwarteng, Parkouda, Padonou e Jespersen, 2019).

La standardizzazione dei parametri tecnologici unita al raggiungimento di un'igiene adeguata nelle condizioni di lavorazione contribuisce invece a minimizzare il rischio di contaminazione con lieviti deterioranti. Sebbene sia stata accertata un'ampia variabilità sia nei formaggi che negli ambienti lattiero-caseari, la presenza di *D. hansenii* è stata costante: probabilmente l'affinità di questa specie di lievito con l'alta concentrazione di sale e la forte resistenza sia ai disinfettanti commerciali che ai composti detergenti, sono la spiegazione più probabile del suo dominio (Shikano, Kuda, Takahashi e Kimura, 2017). Questo lievito è una delle più abbondanti specie di lievito isolate da molti habitat e alimenti naturali (Breuer & Harms, 2006; Bourdichon et al. 2012), ed è stato provato recentemente come esso abbia esercitato effetti benefici,

utilizzato come applicazione probiotica, nei pesci (Tovar-Ramírez et al 2004; Trotta et al. 2012). Il *D. hansenii* è approvato dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ed è incluso nell'elenco dei microrganismi in stato di Presunzione Qualificata di Sicurezza (EFSA, 2008). Nel mercato degli alimenti e delle bevande fermentate, si promuove la ricerca di ceppi di *D. hansenii* con comprovate proprietà probiotiche, in particolare nei prodotti in cui rimangono vivi durante la shelf life (Breuer & Harms 2006).

I risultati della PCR hanno evidenziato la presenza di diversi ceppi di *D. hansenii*. Tuttavia, come previsto, solo una piccola parte di essi è sopravvissuta alle pressioni selettive esercitate dall'habitat gastrointestinale. Le caratteristiche tecnologiche aggiuntive sin qui considerate, li rendono inoltre essenziali durante la maturazione del formaggio. In effetti, negli ultimi anni il ruolo positivo di alcuni lieviti è stato accertato durante la stagionatura dei formaggi a pasta dura, poiché essi contribuiscono a migliorarne l'aroma, la consistenza e le note fragranti (Bertuzzi et al., 2017; Biagiotti et al., 2018; Yuvaşen, Macit e Dertli, 2018).

Un altro lievito sicuro conosciuto in entrambi i campi della ricerca e della biotecnologia, è il *K. lactis*, già utilizzato per la produzione di proteine e metaboliti (come la β -galattosidasi applicata in prodotti senza lattosio) e recentemente sfruttato per il suo potenziale probiotico (di Oliveira Coelho et

al, 2019). Sebbene in questo lavoro non fosse un lievito dominante, il *K. lactis* ha mostrato promettenti proprietà probiotiche e tecnologiche. La specie *C. zeylanoides* è stata isolata dalla ricotta viziata di Brocklehurst e Lund (1985) e dal latte di diversa origine animale da Corbo, Lanciotti, Albenzio e Sinigaglia. (2001). Nello stesso lavoro, il *C. zeylanoides* era risultato presente nel formaggio solo quando veniva isolato nell'ambiente: un segno evidente della sua presenza come contaminante, specialmente nei formaggi semi stagionati.

Sebbene siano ancora necessarie ulteriori indagini sui benefici che i lieviti comportano per la salute, i risultati sin qui ottenuti dovrebbero comunque essere utili per lo sviluppo di nuovi candidati probiotici o funzionali. Su 235 lieviti isolati, 5 ceppi selezionati appartenenti ai generi *C. zeylanoides*, *D. hansenii*, *K. lactis* e *Y. lipolitica*, provenienti da formaggi artigianali, possiedono caratteristiche funzionali e proprietà tecnologiche adeguate. Tuttavia, *C. zeylanoides* e *Y. lipolitica*, pur presentando un potenziale applicativo interessante, non sono GRASS o presenti nell'elenco QPS; per tale ragione il probabile marketing come starters rimane un'azione subordinata alla dimostrazione della loro sicurezza sulla salute del consumatore. Saranno quindi necessari ulteriori studi per escludere sia la possibile produzione di composti indesiderati che le eventuali interazioni negative con i batteri lattici e per stabilire inoltre il ruolo specifico di ciascun lievito. Una delle possibili

applicazioni potrebbe in effetti essere quella di creare un consorzio di diversi lieviti ben diversificati tra loro in cui ognuno si specializzi in base a caratteristiche particolari quali tratti probiotici, aromi, odori specifici o cambiamento di consistenza, al fine di migliorare il prodotto caseario standard, contribuendo in tal modo ad esaltarne le qualità organolettiche.

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

- Acquilanti L., Silvestri G., Zannini E., Osimani A., Santarelli S., Clementi F. (2007). *Phenotypic, genotypic and technological characterization of predominant lactic and bacteria in Pecorino cheese from central Italy*. *Journal of Applied Microbiology* ISSN 1364-5072.
- Achi, O. K., Ukwuru, M. (2015). Cereal-based fermented foods of africa as functional foods. *International Journal of Applied Microbiology*, 2, 71–83.
- Addis, E., Fleet, G. H., Cox, J. M., Kolak, D., & Leung, T. (2001). The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 25-36.
- Andrade, R. P., Melo, C. N., Genisheva, Z., Schwan, R. F., & Duarte, W. F. (2017). Yeasts from Canastra cheese production process: Isolation and evaluation of their potential for cheese whey fermentation. *Food Research International*, 91, 72-79.
- Atanassova, M. R., Fernández-Otero, C., Rodríguez-Alonso, P., Fernández-No, I. C., Garabal, J. I., & Centeno, J. A. (2016). Characterization of yeasts isolated from artisanal short-ripened cows' cheeses produced in Galicia (NW Spain). *Food Microbiology*, 53, 172-181.
- Avondo M., Restuccia C. (2011-2013). *Ruolo di batteri lattici isolati da paste acide siciliane nell'idrolisi delle gliadine antigeniche del glutine*. Dottorato di Ricerca in Produzioni e Tecnologie Alimentari.
- Biagiotti, C., Ciani, M., Canonico, L., & Comitini, F. (2018). Occurrence and involvement of yeast biota in ripening of Italian Fossa cheese. *European Food Research and Technology*, 244(11), 1921-1931.
- Breuer, U., & Harms, H. (2006). *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23(6), 415-437.
- Borelli, B. M., Ferreira, E. G., Lacerda, I. C., Franco, G. R., & Rosa, C. A. (2006). Yeast populations associated with the artisanal cheese produced in the region of Serra da Canastra, Brazil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(11), 1115-1119.

Capece A., Romaniello R., Pietrafesa A., Siesto G., Pietrafesa R., Zambuto M., Romano P. (2018). *Use of Saccharomyces cerevisiae var. boulandii in co-fermentations with S. cerevisiae for the production of craft beers with potential healthy value added*. *International Journal of Food Microbiology* 284, 22–30.

Ceugnietz, A., Drider, D., Jacques, P., & Coucheney, F. (2015). Yeast diversity in a traditional French cheese “Tomme d'orchies” reveals infrequent and frequent species with associated benefits. *Food Microbiology*, 52, 177-184.

Guerzoni E., Losi G. (2009). *Studio della maturazione di formaggi Pecorino stagionati in stabilimento e in grotta*. Dottorato di Ricerca in Biotecnologie degli Alimenti, Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

Yuvaşen, A., Macit, E., & Dertli, E. (2018). Microbial species playing roles for the production of traditional Kasar cheese during pre-maturation period. *LWT*, 91, 406-413.

Randazzo C.L., Pitino I., Ribbera A., Caggia C. (2009). *Pecorino Crotonese cheese: Study of bacterial population and flavour compounds*. *International Journal of Food Microbiology* 27, 363-374.

Shikano, A., Kuda, T., Takahashi, H., & Kimura, B. (2017). Effect of quantity of food residues on resistance to desiccation, disinfectants, and UV-C irradiation of spoilage yeasts adhered to a stainless steel surface. *LWT*, 80, 169-177.

Tovar-Ramírez, D., Mazurais, D., Gatesoupe, J. F., Quazuguel, P., Cahu, C. L., & Zambonino-Infante, J. L. (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture*, 300(1-4), 142-147.

Viljoen, B. C. (2001). The interaction between yeasts and bacteria in dairy environments. *International Journal of Food Microbiology*, 69(1-2), 37-44.

<https://www.fondazione Slow Food.com/it/presidi-slow-food/pecorino-dei-monti-sibillini/>

https://www.clal.it/?section=quadro_italia

www.assolatte.it

www.parks.it/parco.nazionale.monti.sibillini/d

RINGRAZIAMENTI

Per l'elaborazione di questa tesi devo ringraziare, innanzitutto, la relatrice, professoressa Francesca Comitini. Ringrazio Alice, che mi ha seguito e supportato in ogni passo e mi ha insegnato come gestire al meglio ogni lavoro. Grazie a tutti i punti di riferimento trovati in laboratorio: Laura, Edoardo ed Enrica, sempre pronti a fornirmi consigli indispensabili e un aiuto nei momenti di difficoltà.

È stato un percorso breve ma intenso condiviso con altri testisti che ringrazio per il supporto morale e non solo. Grazie a Valentina, Valeria, Massimo e soprattutto Giulia che mi ha ascoltata, supportata e molte volte dato una mano ad uscire da pratiche confuse e burocratiche.

Per tutto il mio percorso universitario è doveroso un ringraziamento a tutta la mia famiglia, soprattutto alla mia mamma, mia ancora e mio punto fermo nei momenti bui. A te devo molto e forse anche di più. Spero di averti reso fiero di me, non solo per questo importante risultato, ma per la donna che sono diventata e che hai cresciuto.

Ringrazio le mie amiche Naomi, Elena, Arianna, Alessandra, Isabella e Beatrice per starmi accanto ogni giorno e per avermi supportato e sopportato

in questi anni universitari e in quelli precedenti. Spero con tutto il cuore che sia così anche per tutti quelli che verranno. Siete le persone che ho scelto per condividere i momenti più belli della mia vita e non avrei potuto fare scelta migliore. Avervi qui con me in questo mio traguardo significa molto, spero di aver reso fiere anche voi. Grazie per tutto.

Ringrazio infinitamente tutto il resto degli amici vicini e lontani che non potrei stare qui ad elencare ed anche chi ha condiviso con me questo cammino solo per breve tempo.

Ringrazio, in ultimo, me stessa per aver perseguito con impegno e costanza gli obiettivi preposti senza mai mollare.

