



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

**DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E
DELL'AMBIENTE**

Corso di Laurea Magistrale

Biologia Molecolare e applicata
Scienze della Nutrizione

**KEFÍR TRADIZIONALE: STUDIO COMPARATIVO PER
L'IDENTIFICAZIONE DI LIEVITI E BATTERI PRESENTI NEI
GRANI**

TRADITIONAL KEFÍR: COMPARATIVE STUDY FOR THE
IDENTIFICATION OF YEASTS AND BACTERIA PRESENT IN KEFIR
GRAINS

Tesi di:
Alessandra Pia Niro

Relatore:
Prof.ssa Francesca Comitini

Correlatore:
Dott.ssa Alice Agarbati

Sessione straordinaria
Anno 2019/2020

INDICE

| | |
|-------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUZIONE | 4 |
| 1.1 Alimentazione e salute | 4 |
| 1.2 Alimenti funzionali | 6 |
| 1.2.1 Alimenti funzionali a base di latte | 9 |
| 1.2.2 Regolamentazione latti fermentati | 12 |
| 1.3 Microrganismi probiotici | 13 |
| 1.3.1 Batteri lattici..... | 16 |
| 1.3.2 Bifidobatteri | 19 |
| 1.3.3 Lieviti come probiotici emergenti | 20 |
| 1.4 Kefir: storia e tradizione | 22 |
| 1.5 Caratteristiche del kefir..... | 23 |
| 1.6 Composizione microbiologica del kefir..... | 25 |
| 1.6.1 Kefir industriale | 26 |
| 1.6.2 Metodi di produzione..... | 27 |
| 1.7 Proprietà del kefir..... | 28 |
| 1.7.1 Effetto ipocolesterolemizzante | 29 |
| 1.7.2 Effetto antimicrobico | 29 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.7.3 Effetto antitumorale | 30 |
| 1.7.4 Attività β -galattosidasica | 31 |
| 1.7.5 Attività immuno-stimolatoria | 31 |
| 1.7.6 Proprietà antiallergiche | 32 |
| 2. SCOPO DELLA TESI | 33 |
| 3. MATERIALI E METODI | 34 |
| 3.1 Campioni di kefir artigianale e industriale | 34 |
| 3.2 Terreni di coltura..... | 34 |
| 3.3 Enumerazione ed isolamento di lieviti e batteri..... | 36 |
| 3.4 Identificazione di lieviti e batteri a livello di specie..... | 38 |
| 3.4.1 Estrazione del DNA da lieviti..... | 38 |
| 3.4.2 PCR-ITS per l'identificazione dei lieviti..... | 39 |
| 3.4.3 Estrazione del DNA da batteri..... | 42 |
| 3.4.4 PCR per l'identificazione dei batteri | 43 |
| 3.4.5 Elettroforesi su gel di agarosio | 44 |
| 3.4.6 Sequenziamento e identificazione degli isolati | 45 |
| 4. RISULTATI..... | 46 |
| 4.1 Enumerazione ed isolamento della popolazione microbica..... | 46 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2 Differenze qualitative e quantitative riscontrate tra i kefir artigianali e industriali..... | 48 |
| 4.3 Risultati sequenziamento | 49 |
| 5. CONCLUSIONI..... | 53 |
| 6. BIBLIOGRAFIA..... | 57 |
| 7. SITOGRAFIA..... | 72 |

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 Alimentazione e salute

Negli ultimi decenni, grazie anche allo sviluppo socioeconomico, l'interesse rivolto ad una sana alimentazione si è esteso ad una fascia della popolazione sempre più ampia, con conseguente adozione di un corretto stile di vita, atto alla prevenzione di quelle malattie legate ad un inadeguato introito di nutrienti. Infatti, una cattiva alimentazione può portare all'insorgenza di numerose patologie, come ad esempio diabete di tipo 2, malattie dell'apparato cardiocircolatorio, osteoporosi e ipertensione arteriosa. Inoltre, incide fortemente sul benessere psico-fisico dell'individuo.

Secondo la World Health Organization (WHO) “la malnutrizione è lo squilibrio tra apporto di nutrienti ed energia e la quantità di questi necessaria a garantire la crescita, il mantenimento e le funzioni specifiche dell'organismo”

Una frequente conseguenza di malnutrizione è la Sindrome Metabolica (SM), definita come un insieme di fattori di rischio associati all'aumento dell'insorgenza di malattie cardiovascolari. Fattori di rischio quali sovrappeso e obesità, insulino-resistenza, ipertensione arteriosa ed elevati valori ematici di trigliceridi (Luggetti et al., 2008).

Una cattiva alimentazione, inoltre, può influire fortemente anche sulla composizione del microbiota umano; quest'ultimo è l'insieme dei microrganismi che vivono in simbiosi con il nostro organismo, compresi quelli che popolano il tratto intestinale (Cillari, 2017).

Il microbiota, essendo in stretta relazione con il sistema immunitario, concorre al benessere psico-fisico dell'uomo. Quando l'equilibrio del microbiota intestinale (e cioè la sua composizione) viene alterato si parla di disbiosi intestinale. Causa di disbiosi intestinale possono essere l'utilizzo di antibiotici, stress e cattiva alimentazione.

1.2 Alimenti funzionali

Gli alimenti funzionali, a differenza di quelli tradizionali, oltre a fornire il normale apporto di nutrienti al consumatore, possono avere effetti benefici mirati su una o più funzioni dell'organismo apportando un miglioramento generale dello stato di salute e di benessere e/o una riduzione del rischio di insorgenza di malattie.

Il termine “alimento funzionale” è stato introdotto per la prima volta in Giappone nel 1980 (Hilliam,1998), dove questa tipologia di alimenti è stata denominata FOSHU (Food for Specified Health Uses). Gli alimenti funzionali sono stati regolamentati dal punto di vista legislativo a partire dal 1991 e vengono considerati come una categoria di alimenti a sé stante. In particolare, un alimento per ottenere la licenza di “alimento ad uso specifico per la salute” deve possedere le seguenti caratteristiche:

1. deve contribuire al miglioramento della dieta, al mantenimento e al miglioramento della salute.
2. gli effetti di un alimento (o dei suoi componenti nutrizionali) devono avere rilevanza medica o nutrizionale.
3. il livello appropriato di consumo dell'alimento deve essere basato su conoscenze mediche o nutrizionali.
4. l'alimento in questione deve essere sicuro per la salute.

5. I componenti dell'alimento dovrebbero essere ben definiti in termini di proprietà fisicochimiche mediante metodi di determinazione qualitativa e quantitativa.
6. la composizione dell'alimento in componenti nutritivi non dovrebbe essere troppo diversa rispetto ad alimenti simili.
7. l'alimento deve essere consumato secondo i normali schemi dietetici, piuttosto che consumato solo occasionalmente.
8. l'alimento deve avere la forma di alimenti ordinari.
9. l'alimento e i relativi componenti non devono essere utilizzati esclusivamente come farmaci. (Kojima, 1995)

A differenza del Giappone, in Europa non esiste una normativa legislativa che regola gli alimenti funzionali.

In genere, un alimento può essere considerato 'funzionale' se, oltre ad avere effetti nutrizionali adeguati, ne è scientificamente dimostrata la sua influenza positiva su una o più funzioni dell'organismo, tanto da aumentare lo stato di benessere e di salute o ridurre il rischio di malattia (Action, 1999).

Gli alimenti funzionali possono essere divisi in classi a seconda della loro origine o delle modifiche a questi apportate:

1. Materie prime alimentari migliorate dall'incremento di specifici componenti grazie alla modificazione dell'alimentazione animale (ad esempio, uova o carne con alto contenuto di omega 3).
2. Alimento modificato nella sua composizione originaria attraverso tecniche di coltura o tramite selezione genetica.
3. Alimento arricchito di componenti in grado di apportare benefici all'organismo, come ad esempio arricchito di probiotici, fibre, etc.
4. Alimenti in cui alcuni componenti sono stati rimossi per far fronte alle esigenze del consumatore come, ad esempio, il latte magro o delattosato oppure alimenti privi di glutine.
5. Alimenti i cui componenti sono stati modificati chimicamente ad esempio per ridurre il rischio allergenico.
6. Alimenti in cui è stata migliorata la biodisponibilità dei componenti.

Quindi, gli alimenti tradizionali fortificati con ingredienti che (anche da soli) apportano benefici allo stato di salute generale, possono essere definiti funzionali. Al contrario, gli alimenti tradizionali contenenti naturalmente componenti benefici per l'organismo non possono essere definiti come alimenti funzionali (Holm, 2003; Sirò et al., 2008; Klimas et al., 2008, e Saiz, 2011).

I primi alimenti con attività funzionale consumati nel corso della storia sono i cibi e le bevande fermentate.

1.2.1 Alimenti funzionali a base di latte

Tra gli alimenti funzionali, fanno parte anche quelli a base di latte, che soddisfano ampiamente la grande richiesta da parte del consumatore con una ampia gamma di prodotti presenti nel mercato e anche nella grande distribuzione.

Il latte oltre a proteine, minerali e vitamine, contiene elementi bioattivi presenti in piccole quantità che svolgono funzioni biologiche particolarmente utili. Questi elementi bioattivi includono immunoglobuline, ormoni, fattori di crescita, citochine, nucleotidi, poliammine, enzimi e peptidi. In particolare, i peptidi bioattivi, che derivano dai processi di proteolisi delle proteine, contribuiscono a ridurre i valori pressori e aiutano a combattere le malattie cardiovascolari e rafforzano il sistema immunitario. Per questi motivi, i peptidi bioattivi possono essere aggiunti come fortificazione agli alimenti funzionali (Patterson et al, 2008).

Negli ultimi decenni, con lo scopo di soddisfare specifiche esigenze dietetiche del consumatore, sono comparsi nel mercato i cosiddetti “latte speciali”, ottenuti per modificazioni chimico-fisiche del latte naturale. Ne sono un esempio il latte senza lattosio, il latte con ridotto contenuto di grassi, il latte arricchito con omega 3 e proteine. Lo scopo di queste modificazioni è quello di aumentare la potenzialità benefica del latte naturale.

Tra gli alimenti funzionali a base di latte, quelli maggiormente conosciuti sono i prodotti lattiero caseari contenenti microorganismi probiotici (Siró et al., 2008). I principali microorganismi probiotici sono rappresentati dai batteri lattici i quali, rimanendo vitali nell'alimento fino al suo consumo, possono interagire positivamente con i microorganismi della flora microbica intestinale. Inoltre, è stato evidenziato che anche i prodotti di fermentazione dei batteri lattici possono apportare benefici alla salute del consumatore (Granier et al., 2013). Questi sono i motivi per i quali gli alimenti lattiero caseari funzionali hanno suscitato grande interesse sia nel consumatore che nell'industria casearia.

Per favorire la sopravvivenza, la crescita e la funzionalità degli organismi probiotici o dei batteri benefici presenti nel colon vengono utilizzati alimenti contenenti prebiotici.

Il termine prebiotico è definito come “un ingrediente alimentare non digeribile che influisce positivamente sull'ospite stimolando selettivamente la crescita e/o l'attività di uno o di un numero limitato di batteri presenti nel colon” (Gibson et. Roberfroid, 1995).

La definizione si riferisce alle le sostanze nutritive, come le fibre alimentari solubili contenute in alcuni tipi di frutta e verdura, che attraversano indigerite il primo tratto gastrointestinale, resistendo all'azione dei succhi gastrici, dei sali

biliari e degli enzimi digestivi, diventando nutrimento selettivo dei batteri presenti nel colon.

La combinazione negli alimenti di organismi probiotici e di elementi prebiotici definiscono il concetto di alimento simbiotico.

Questa associazione oltre a migliorare la sopravvivenza, la replicazione e l'attività dei microrganismi probiotici presenti nell'alimento grazie alla presenza di substrati prontamente disponibili per il loro metabolismo (Gibson et al., 1995), hanno un effetto stimolante anche sulla crescita e sul metabolismo dei batteri endogeni.

Esempi di alimenti simbiotici sono i lattici fermentati contenenti organismi probiotici con aggiunta di fibre che fungono da substrato per la sopravvivenza degli organismi probiotici.

1.2.2 Regolamentazione latti fermentati

La World Health Organization (WHO) e la Food and Agriculture Organization (FAO) nel 2001 hanno proposto una definizione di latti fermentati, categoria a cui appartiene il kefir, basata su parametri composizionali e microbici descritti in Tabella 1.

| DEFINIZIONE DEI LATTI FERMENTATI SECONDO IL CODEX STANDARD (CODEX STAN 243-2003) | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| COMPOSIZIONE | |
| Proteine (%m/m) | 2,70% |
| Grassi (w/w) | <10% |
| Acidità titolabile in % di acido lattico (%m/m) | ≤0,6% |
| Etanolo (%g/l) | ≤0,5% |
| CARICA TOTALE MICRORGANISMI DELLA COLTURA STARTER (UCF/ml) | |
| Fermenti lattici vivi (UCF/ml) | |
| Specie batteriche (UCF/ml) | |
| <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>leuconstoc spp.</i> , | |
| <i>Lactococcus spp.</i> , <i>Acetobacter spp.</i> | ≥10 ⁷ |
| Lieviti (UCF/ml) | |
| <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Saccharomyces unisporus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , | |
| <i>Saccaromices exiguus</i> | ≥10 ⁴ |

Tabella 1. Codex Codex Alimentarius (2003)

1.3 Microrganismi probiotici

Il benessere psico-fisico è in stretta relazione con il microbiota intestinale, quest'ultimo infatti produce composti neuro-attivi in grado di influenzare il benessere dell'intero organismo e le capacità cognitive (Messaoudi et al., 2001). Una dieta squilibrata, l'abuso di alcool, lo stress e/o l'utilizzo di antibiotici spesso portano ad una condizione di disbiosi che se protratta per lungo tempo può influire negativamente sulla salute.

Per ripristinare l'equilibrio della flora microbica intestinale ed ovviare alle conseguenze di disbiosi è possibile intervenire a livello del microbiota attraverso l'assunzione di alimenti funzionali prebiotici e ricchi di probiotici che nel loro insieme stimolano il rafforzamento della normale microflora intestinale, fornendo ad essa gli elementi nutritivi necessari.

Il ricercatore inglese Fuller, nel 1989 definisce con il termine probiotico (dal greco "*pro bios*", per la vita) "un microrganismo vivente in grado di esercitare un generale effetto positivo sulla salute dell'ospite, con il risultato di rafforzare l'ecosistema intestinale".

I microrganismi probiotici per essere definiti tali devono possedere dei requisiti minimi, devono innanzitutto essere sicuri per la salute dell'ospite; devono essere capaci di resistere ai diversi ostacoli che il tratto gastrointestinale oppone, come ad esempio l'azione dei succhi gastrici e l'azione tensioattiva dei

sali biliari e arrivare così all'intestino vivi e vitali, in grado di colonizzare le pareti intestinali aderendo alla mucosa e alle cellule epiteliali, in modo da favorire l'equilibrio fisiologico del microbiota.

Per poter colonizzare il tratto intestinale e quindi espletare i loro effetti benefici sull'organismo, i probiotici devono essere assunti a stomaco vuoto e il numero delle cellule vive e vitali dovrebbe essere almeno di 10^6 UFC/ml, poiché la dose minima raccomandata giornalmente è di $10^8/10^9$ cellule (Toma e Pokrotnieks, 2006; Mercenier et al., 2008, Saarela et al., 2000, Sanders, 2008).

I microrganismi probiotici sono inoltre capaci di aumentare l'assorbimento di vitamine e sintetizzarne di altre, in particolare quelle del gruppo B e la vitamina K.

Grazie alla loro capacità di fermentare i carboidrati, i probiotici producono anidride carbonica (CO_2) e acidi organici, come acido acetico e acido lattico, responsabili dell'abbassamento del pH dell'ambiente circostante rendendo ostile la proliferazione dei patogeni. Quest'ultimi, se presenti in concentrazioni eccessive, sono responsabili della produzione di composti tossici, come ad esempio ammoniaca, nitrosammine e acidi biliari, in grado di provocare un'alterazione della permeabilità della mucosa intestinale, favorendone l'infiammazione. Inoltre, i probiotici contrastano la proliferazione di batteri

patogeni anche grazie ad un meccanismo di competizione per i siti di adesione a livello delle mucose e alla produzione di molecole battericide.

Alcuni tra i più comuni batteri probiotici, come i bifidobatteri e i lattobacilli, sono capaci di degradare alcune N-nitrosamine cancerogene, e sintetizzano acidi grassi a corta catena che rappresentano la fonte principale di nutrimento delle cellule della mucosa del colon, favorendone così anche la differenziazione cellulare., Sono capaci di metabolizzare la bilirubina, di scindere i sali biliari e di intervenire nel metabolismo degli ormoni steroidei.

I microrganismi probiotici aumentano poi il valore nutrizionale degli alimenti, controllano e riducono i livelli di colesterolo, migliorano le difese immunitarie, prevengono le infezioni intestinali e vengono spesso utilizzati per contrastare stati diarroici dovuti a terapie antibiotiche (Kechagia et. al., 2013).

I microorganismi probiotici sono anche capaci di scindere il lattosio favorendo così la digestione del latte anche da parte di quei soggetti che presentano un deficit nella produzione dell'enzima lattasi, necessario per la digestione del lattosio. In questo modo sono in grado quindi di ridurre tutti quei sintomi legata alla mancata digestione del lattosio, quali meteorismo, flatulenza e dolore addominale.

Diversi studi (Cildir et al., 2009; Shimauchi et al., 2008; Masdea et al., 2012; Yesilova et al., 2012) hanno mostrato effetti benefici dei probiotici sia sulla

salute della pelle, dimostrandosi efficaci nel miglioramento dell'eczema atopico e nella guarigione delle ferite e sia su quella del cavo orale, nella prevenzione della carie dentale, della malattia parodontale e dell'alitosi.

I più comuni microrganismi probiotici appartengono ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Reid et al., 1988). Recentemente, anche alcuni lieviti hanno mostrato attività probiotica, come nel caso del lievito *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (Buts, 2009).

1.3.1 Batteri lattici

Batteri lattici sono definiti quei batteri che dalla fermentazione dei carboidrati producono prevalentemente acido lattico. Sono specie gram-positivo e catalasi negative. Possono essere a forma di cocco o bastoncino. Essi sono cellule immobili e sono asporigeni. Sono anaerobi o microaerofili, cioè si moltiplicano bene in assenza totale o parziale di ossigeno. Molti di essi però lo tollerano senza utilizzarlo nei processi di produzione di energia.

I batteri lattici si distinguono in batteri omofermentativi, e cioè che producono quasi esclusivamente acido lattico come prodotto della fermentazione lattica oppure batteri eterofermentativi, che oltre all'acido lattico, producono anche acido acetico, anidride carbonica ed etanolo come sottoprodotti di

fermentazione. Tra i batteri eterofermentanti possiamo distinguere quelli facoltativi e quelli obbligati.

I batteri eterofermentanti facoltativi, dalla fermentazione degli esosi producono quasi interamente acido lattico, ma in carenza di zuccheri fermentano gli esosi con produzione di acido lattico, acido acetico, acido formico ed etanolo, mentre dalla fermentazione dei pentosi vengono prodotti acido lattico e acetico.

I batteri eterofermentanti obbligati, dalla fermentazione degli esosi, producono acido lattico, acido acetico, CO₂ e/o etanolo, mentre i pentosi vengono fermentati con produzione di acido lattico e acido acetico. (Vincenzini et al., 2005)

Tra i batteri lattici quelli più comunemente utilizzati appartengono al genere *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* ed *Enterococcus*. Le specie appartenenti al genere *Lactobacillus* sono quelle di gran lunga più impiegate in diversi settori industriali. In particolare, le specie di *Lactobacillus* possono essere divise in tre gruppi in relazione al loro metabolismo:

- Omofermentativi obbligati (Gruppo I) → *L. acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*
- Eterofermentativi facoltativi (Gruppo II) → *L. casei*, *L. curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. sakei*

- Eterofermentativi obbligati (Gruppo III) → *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri* (Vincenzini et al., 2005).

I batteri lattici sono microrganismi normalmente presenti nei prodotti alimentari e intervengono in numerosi processi fermentativi naturali. Essi trovano largo impiego anche a livello industriale per la produzione di una grande varietà di alimenti fermentati; ne sono un esempio quelli derivanti dal latte, dalla carne e dai vegetali, i prodotti da forno e gli insilati. In particolare, la presenza di batteri lattici negli alimenti contribuisce alla peculiarità delle loro caratteristiche chimico-fisiche e alla loro stabilità. Infatti, grazie alle numerose attività metaboliche, i batteri lattici sono in grado di concorrere alle caratteristiche strutturali, aromatiche e nutrizionali del prodotto finito, rendendolo al contempo più gradevole e digeribile.

Questi batteri possono inoltre essere assunti dall'uomo come probiotici per la loro capacità acidificante, bioprotettiva e di produrre metaboliti antimicrobici e antifungini con azione antagonista nei confronti di microrganismi indesiderati.

I batteri lattici possono influenzare direttamente la fisiopatologia dell'organismo ospite ed esercitare su di esso effetti benefici migliorando ad esempio l'assimilazione dei nutrienti, riducendo il colesterolo sierico,

modulando il sistema immunitario e controllando malattie derivanti da infezioni enteriche.

Il ceppo di batterio lattico più comunemente usato per la fermentazione del latte è lo *Streptococcus thermophilus* che di solito viene usato in associazione ad alcune specie di bifidobatteri come ad esempio *Bifidobacterium breve* C50, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium animalis*, oppure in associazione ad alcune specie di lactobacilli come *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii* e *Lactobacillus casei* (Granier et al., 2013).

1.3.2 Bifidobatteri

I Bifidobatteri sono microorganismi procarioti gram-positivi, principalmente saccarolitici ed in grado di metabolizzare le fibre prebiotiche, come ad esempio l'inulina, i GOS e i FOS.

Alcune specie appartenenti al genere *Bifidobacterium*, come ad esempio *Bifidobacterium longum infantis*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium breve*, sono in grado di metabolizzare i glicani della mucina e gli oligosaccaridi del latte materno (Turroni et al., 2018). Nei bambini, fino all'anno di età, i Bifidobatteri sono fisiologicamente abbondanti e dovrebbero essere presenti anche nelle donne incinte, le quali li trasmettono ai bambini durante il parto e

l'allattamento. Nell'intestino dei neonati, la loro assenza favorisce la crescita dei batteri gram-negativi, appartenenti al phylum dei *Proteobacteria*, con conseguente incremento del rischio infettivo.

I Bifidobatteri concorrono al ripristino dell'equilibrio del microbiota intestinale. Influenzando la fisiopatologia dell'organismo ospite apportandone benefici, riducono i livelli di colesterolo sierico, riducono il rischio di cancro al colon, modulano il sistema immunitario e alleviano i sintomi del malassorbimento (intolleranza al lattosio).

Le specie più comunemente utilizzate per la produzione di alimenti probiotici comprendono *Bifidobacterium animalis*, *B.breve*, *B.infantis*, *B.longum*, *B.adolascens*, *B.lactis* e *B.bifidum*.

1.3.3 Lieviti come probiotici emergenti

I lieviti sono microorganismi eucarioti unicellulari diffusi in tutti gli ambienti naturali. Essi sono presenti sulle piante, nell'acqua, nei prodotti alimentari, nella normale flora microbica degli esseri umani e in molte altre nicchie ecologiche.

Sono coinvolti in molte interazioni con altri microrganismi con rapporti di simbiosi, mutualismo, parassitismo e competizione.

Tra i lieviti appartenenti al phylum *Ascomycota*, il genere *Saccharomyces* è il più studiato. La specie maggiormente studiata è il lievito *Saccharomyces cerevisiae* che grazie alle sue interessanti caratteristiche pro-tecnologiche è divenuto il lievito più utilizzato a livello industriale, determinandone un consistente impatto economico (Pretorius et al., 2003).

Un altro lievito ampiamente studiato è *Saccharomyces cerevisiae var. baulardii* grazie al suo potenziale utilizzo come probiotico (Buts, 2009). Infatti, questo lievito viene utilizzato nella prevenzione e nel trattamento di gastroenteriti nei bambini e negli adulti (Kurugöl and Koturoglu., 2005; Htwe et al., 2008). Ad oggi, questa specie di lievito è l'unica ad essere disponibile nel mercato come lievito probiotico.

Attualmente i lieviti probiotici possono essere assunti mediante i cibi fermentati o sottoforma di colture liofilizzate. Nonostante il lievito *Saccharomyces cerevisiae var. baulardii* sia l'unico ad essere riconosciuto come vero e proprio lievito probiotico, recenti studi hanno dimostrato la presenza di interessanti attitudini probiotiche in lieviti non-*Saccharomyces* come *Debaryomyces hansenii*, *Torulaspora delbrueckii* (Psani and Kotzekidou, 2006; Agarbati et al., 2020), *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* (Chen et al., 2010; Agarbati et al., 2020), *Kluyveromyces marxianus* e *Kluyveromyces lodderae* (Kumura et al., 2004). Per questi lieviti è stata dimostrata la capacità di resistere

al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale e l'azione antagonista nei confronti di batteri patogeni, questi sono i motivi per i quali queste “nuove” specie di lievito potrebbero rappresentare nuove fonti di lieviti probiotici.

1.4 Kefir: storia e tradizione

Il kefir è una bevanda fermentata dalla consistenza cremosa e dal sapore acidulo, le cui origini vengono attribuite alle regioni montuose del Caucaso. Il termine kefir deriva infatti dalla parola armena *keif* che significa benessere o dal turco *keyif* che significa delizia. Il kefir viene ottenuto dalla fermentazione del latte di pecora, di vacca o di capra per azione dei grani di kefir, costituiti da lieviti e batteri intrappolati in una matrice polisaccaridica in cui coesistono in condizioni di simbiosi. Per avviare la produzione del kefir è necessario che i grani vengano donati, infatti ad oggi non si è riusciti a riprodurre le condizioni necessarie alla loro formazione in laboratorio.

La natura misteriosa dei grani di kefir ha alimentato miti e leggende come, ad esempio, quella secondo cui fu il profeta Maometto a donare i primi grani di kefir alle popolazioni caucasiche, venendo per questo chiamati “Grani del Profeta”. Questi grani erano gelosamente custoditi in quanto si credeva che se il segreto del loro uso fosse diventato noto, avrebbero perso la loro potenza. Pertanto, i grani di kefir venivano segretamente passati da una

generazione all'altra, strettamente sorvegliati come parte della ricchezza di ogni famiglia.

La limitatezza delle informazioni sul meccanismo di formazione dei grani ha portato alla formulazione di ipotesi sulla loro formazione. Una di queste descrive che inizialmente il batterio *Lactobacillus kefiranofaciens* e il lievito *Saccharomyces turicensis* si autoaggregano e co-aggregano in piccoli grani. L'aggregazione aumenta quando il pH scende intorno a 4.6. A questo punto, microrganismi produttori di biofilm quali *Lactobacillus kefir*, *Kluyveromyces marxianus* e *Pichia fermentans* aderiscono alla superficie di questi piccoli grani e dopo la formazione del biofilm, i lieviti e il *Lactobacillus* continuano ad aggregarsi ai grani diventando così una struttura mucillaginosa tridimensionale. Esiste una relazione simbiotica tra i microrganismi presenti nei grani di kefir, infatti i batteri e i lieviti presenti vivono insieme condividendo fonti di energia, fattori di crescita e i loro prodotti del metabolismo microbico. (Witthuhn et al., 2005; Wang et al.; 2012; Hamet et al., 2013)

1.5 Caratteristiche del kefir

Il kefir viene prodotto a partire da latte di vacca, bufala, capra o pecora, grazie all'azione combinata di batteri lattici, acetici e cellule di lievito che coesistono immobilizzate in una matrice proteica polisaccaridica, il kefirian (grani di

kefir). Quando i microrganismi vengono isolati dai grani mostrano una ridotta attività metabolica (Farnworth and Mainville, 2008), sottolineando l'intensa relazione simbiotica esistente fra di loro.

I principali prodotti di fermentazione del latte da parte dei microrganismi presenti nei grani di kefir sono acido lattico, etanolo e CO₂ che conferiscono al fermentato acidità, basso contenuto alcolico e il tipico sapore frizzante. Seppur in quantità inferiore, possono essere presenti anche altri sottoprodotti di fermentazione come acetaldeide, diacetile e amminoacidi che contribuiscono alla complessità aromatica della bevanda. I microrganismi contenuti nei grani producono anche acidi organici, batteriocine e antibiotici in grado di contrastare la proliferazione di microrganismi patogeni (Angulo et al., 1993).

I grani di kefir, le cui dimensioni variano dai 0.3 ai 3 cm di diametro, presentano morfologie variabili. La più comune è una forma simile a quella dei fiocchi di latte e il loro colore varia dal bianco al giallino. Durante la fermentazione, i grani di kefir diventano via via più numerosi e aumentano del 5-7% la loro biomassa.

La produzione artigianale di kefir prevede che il latte venga inoculato con i grani di kefir in rapporto 1:10 per un periodo di 18-24 ore a 20-25°C. Alla fine del processo fermentativo, mediante l'utilizzo di un colino in plastica o acciaio

inox, i grani verranno setacciati per essere separati dal fermentato. I grani a questo punto possono essere utilizzati per una nuova fermentazione oppure possono essere conservati nel latte fresco.

1.6 Composizione microbiologica del kefir

Le specie microbiche che si trovano nei grani di kefir si differenziano in base all'origine dei grani, in base al substrato utilizzato nel processo di fermentazione e al metodo di coltura.

La composizione delle specie microbiche vede la predominanza di batteri lattici, acetici e lieviti (Zhou et al., 2009; Pogačić et al., 2013).

In base al loro metabolismo possiamo dividere i microrganismi presenti nei grani in quattro gruppi: batteri lattici omofermentanti ed eterofermentanti e lieviti che assimilano o meno il lattosio (Cheirsilp and Radchabut, 2011).

Le specie batteriche presenti in maggiore quantità sono: *Lactobacillus paracasei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. plantarum* e *L. kefirifaciens*.

Tuttavia, queste specie rappresentano solo il 20% dei *Lactobacillus* presenti nel fermentato con il resto costituito da *L. kefir* (80%) (Yüksekdağ et al., 2004; Zanirati et al., 2015).

Tra i batteri acetici presenti nel kefir sono stati descritti *Acetobacter aceti* e *Acetobacter rasens*.

Per quanto riguarda i lieviti, più di 23 diverse specie sono state isolate dai grani di kefir e da bevande fermentate di diversa origine. Tuttavia, le specie predominanti sono *S. cerevisiae*, *Saccharomyces unisporus*, *Candida kefir* e *K. marxianus* (Witthuhn et al., 2004; Diosma et al., 2014; Zanirati et al., 2015).

1.6.1 Kefir industriale

Il kefir industriale viene prodotto a partire da colture starter a composizione definita costituita dai lieviti e batteri isolati dai grani utilizzati per la produzione artigianale. Il prodotto ottenuto a partire dalle colture starter non possiede le stesse caratteristiche organolettiche e terapeutiche del kefir artigianale, a causa della bassa eterogeneità delle specie microbiche che compongono gli starter. La CO₂ prodotta dalla fermentazione e dalla proliferazione dei lieviti porterebbe le bottiglie, in cui il kefir arriva sul mercato, all'esplosione. La produzione di acido acetico inoltre andrebbe ad alterare le caratteristiche organolettiche del prodotto. Le aziende per i suddetti motivi sono costrette a sopprimere o arrestare il metabolismo microbico con conseguente perdita di biodiversità, motivo per cui il kefir industriale non è frizzante, caratteristica che contraddistingue il kefir artigianale.

Inoltre, per permetterne un tempo di conservazione di 28 giorni a 4°C, il kefir industriale viene pastorizzato con conseguente perdita di batteri e lieviti vivi e vitali.

Le limitazioni a cui le aziende devono sottostare, influiscono ulteriormente sulla biodiversità del prodotto finito. Il tenore di alcol di una bevanda analcolica deve essere massimo dello 0,5%. Nella produzione artigianale non è possibile mantenere questa stabilità.

Inoltre, l'utilizzo dei grani sarebbe limitante nella produzione del kefir industriale in termini quantitativi, in quanto la quantità di prodotto finito sarebbe limitata dalla disponibilità dei grani, con conseguente perdita economica per l'azienda.

1.6.2 Metodi di produzione

I metodi di produzione differiscono tra le varie aziende. Alcune combinano i ceppi selezionati di batteri e lieviti per rendere il prodotto più affine al kefir artigianale. Altre utilizzano i grani per produrre il kefir di partenza che verrà utilizzato come starter.

1.7 Proprietà del kefir

Il kefir viene ampiamente utilizzato a livello mondiale per i suoi benefici sulla salute e per le sue proprietà nutritive, tanto da essere classificato come la maggiore fonte di probiotici (Yang et al., 2010).

Il consumo di questo latte fermentato apporta una varietà di benefici sulla salute del consumatore, non solo legati al pool microbico che lo compongono, ma anche grazie alla presenza di diversi metaboliti rilasciati dai microorganismi, come ad esempio gli acidi organici (Garrote et al., 2001; Ismaiel et al., 2011). Tra i vari effetti positivi sulla salute del consumatore sono stati descritti quello ipocolesterolemizzante, antimicrobico, antitumorale, stimolante del sistema immunitario e di alcune attività enzimatiche (Suresh Kumar et al., 2008; Bensmira et al., 2010; Piermaria et al., 2010).

1.7.1 Effetto ipocolesterolemizzante del kefir

Numerosi studi (Liu et al., 2006; Wang et al., 2009) hanno mostrato la capacità del kefir di promuovere l'abbassamento dei livelli di colesterolo nel sangue. Diversi sono i meccanismi d'azione attraverso cui i microrganismi possono influire sul colesterolo sierico:

- attraverso il legame e l'assorbimento del colesterolo da parte dei microrganismi prima che questo possa essere assorbito dal corpo;
- andando a sopprimere il riassorbimento degli acidi biliari tramite la deconjugazione enzimatica di questi ad opera dell'enzima idrolasi (BSH) e tramite l'inibizione dell'enzima HMG-CoA reduttasi (Wang et al., 2009).

1.7.2 Effetto antimicrobico

I microrganismi presenti nei grani di kefir e quindi nel kefir stesso rilasciano nel mezzo circostante i prodotti di fermentazione, tra i quali acido lattico, batteriocine e antibiotici in grado di inibire la proliferazione di microrganismi patogeni (Liu et al., 2002).

Il kefir sembra essere in grado di inibire lo sviluppo di batteri patogeni, quali *Salmonella*, *Helicobacter*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus*

luteus, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyrogenes*, (Lopitz et al., 2006), *Streptococcus faecalis* e *Fusarium graminearum* (Ismaiel et al., 2011). Inoltre, è stato osservato che un mix di lieviti e batteri isolati dal latte fermentato sembrano essere capaci di prevenire diarrea ed enterocoliti causate dal batterio *Clostridium difficile* (Bolla et al., 2013).

L'assunzione del kefir sembra contrastare anche lo sviluppo del lievito *Candida albicans* ed inibire l'azione di composti tossici quali spore e aflatossina B1 prodotte dal fungo *Aspergillus flavus* durante la conservazione degli alimenti (Ismaiel et al., 2011).

1.7.3 Effetto antitumorale del kefir

Le proprietà antitumorali del kefir e degli estratti di kefir sono implicati soprattutto nella riduzione del rischio di sviluppo del cancro al seno nelle donne. A differenza dei prodotti a base di latte fermentato, le cui proprietà anticancerogeniche sono attribuite alla presenza di composti bioattivi come proteine e piccoli peptidi, nel kefir queste proprietà vengono attribuite alla presenza di alcuni polisaccaridi. Anche gli aminoacidi solforati naturalmente presenti nel latte sembrano avere un ruolo importante nell'attività antitumorale associata al kefir e a prodotti simili. Ceppi di *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* (Hosono et al., 1990) e *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris*

(Miyamoto et al., 1991) si è visto possedere la capacità di legare composti mutageni.

Anche il kefirian, glucogalattano idrosolubile isolato dai grani di kefir o prodotto da *L. kefiranofaciens* ha mostrato attività antitumorale. Oltre alla natura e al dosaggio dei polisaccaridi, l'attività antitumorale associata al kefir dipende anche dal tipo di microrganismo implicato nella fermentazione (Liu et al., 2002).

1.7.4 Attività β -galattosidasica

L'enzima β -galattosidasi che è naturalmente presente nei grani di kefir va a ridurre il contenuto di lattosio grazie ai processi di idrolisi, permettendone l'assunzione anche per i soggetti intolleranti al lattosio (De Vrese et al., 1992) andando a ridurre i sintomi legati all'intolleranza come presenza dell'idrogeno nell'espriato e flatulenza (De Vrese et al., 1992; Hertzler and Clancy, 2003).

1.7.5 Attività immuno-stimolatoria del kefir

La formazione di peptidi bioattivi prodotti dal metabolismo microbico durante la fermentazione del latte o durante la digestione, sembrano essere in grado di influire positivamente sul sistema immunitario, stimolandone le funzionalità (Farnworth, 2005). Gli effetti sul sistema immunitario possono essere dovuti

all'azione degli esopolisaccaridi presenti nei grani di kefir e all'azione positiva di questo latte fermentato sull'equilibrio delle cellule immunitarie della mucosa intestinale (Farnworth, 2006; Furukawa *et al.*, 1992).

1.7.6 Proprietà antiallergiche

Il consumo regolare di kefir attenua la reazione delle IgE e delle IgG1 prodotte durante le reazioni allergiche. Con l'alterazione della microflora intestinale e quindi con il miglioramento della resistenza della mucosa intestinale all'infezione dei patogeni gastrointestinali, si possono quindi prevenire i sintomi legati alle allergie alimentari (Liu *et al.*, 2006). Un altro studio ha rivelato che il kefir inibisce l'eosinofilia indotta da ovoalbumina nel tessuto polmonare e l'ipersecrezione di muco mostrando un grande potenziale terapeutico per il trattamento dell'asma bronchiale allergico (Lee *et al.*, 2007).

Capitolo secondo

SCOPO DELLA TESI

L'adozione di uno stile di vita volto al mantenimento del benessere psico-fisico ha portato un'ampia fascia della popolazione a rivolgere l'attenzione agli alimenti funzionali, il cui utilizzo influisce positivamente sullo stato di salute. Anche gli alimenti contenenti probiotici, che agendo a livello del microbiota intestinale ne modificano positivamente la composizione, rientrano in questa categoria di alimenti.

Tra questi troviamo anche il kefir, bevanda a base di latte fermentato caratterizzata da un pool eterogeneo di lieviti e batteri che coesistono intrappolati in una matrice proteica polisaccaridica, in rapporto di simbiosi.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di mettere a confronto la diversità microbica del kefir artigianale, ricco in biodiversità e con caratteristiche organolettiche più pronunciate, rispetto alla composizione standardizzata del kefir prodotto a livello industriale, che differisce da quello artigianale soprattutto per quanto riguarda la composizione del pool di lieviti che nel prodotto industriale sono poco presenti per quanto dichiarato in etichetta.

Capitolo terzo

MATERIALI E METODI

3.1 Campioni di kefir artigianale e industriale

I campioni di kefir (K1, K2 e K3), provenienti da tre ambienti domestici differenti e i campioni di kefir industriale (X1, X2 e X3) sono stati campionati in condizioni di sterilità: 40 ml di fermentato è stato trasferito in falcon, posto in un contenitore refrigerante e trasportato subito in laboratorio per il processamento.

3.2 Terreni di coltura

- **WL nutrient agar (Wallerstain Laboratory Nutrient Agar):** terreno spesso utilizzato per la determinazione della flora lievitifforme nei processi di fermentazione e/o prodotti di fermentazione. Questo terreno contiene: estratto di lievito 4.0 g/L; Triptone 5.0 g/L; Glucosio 50.0 g/L; Agar 20.0 g/L; potassio fosfato monobasico 550.0 mg/L; potassio cloruro 425.0 mg/L; calcio cloruro 125.0 mg/L; magnesio solfato 125.0 mg/L; ferro cloruro 2.5 mg/L; manganese solfato 2.5 mg/L; verde di bromocresolo 22.0 mg/L. Nel caso specifico, alla normale composizione

è stato aggiunto lo 0,005% di cloramfenicolo, quest'ultimo impedisce la crescita dei batteri.

- **MRS Agar:** terreno utilizzato per il monitoraggio dei batteri, in particolare per quelli appartenenti al genere *Lactobacillus* ma anche *Pediococcus* e *Leuconostoc*. Questo terreno contiene per litro: peptone 10.0 g; estratto di carne 10.0 g; estratto di lievito 5.0 g; glucosio 20.0 g; idrogeno fosfato di potassio 2.0 g; acetato di sodio 5.0 g; ammonio citrato 2.0 g; magnesio solfato 0.2 g; manganese solfato 0.05 g; tween 80 1.0 g; agar 13.0 g. Nel caso specifico, alla normale composizione è stato aggiunto lo 0.05 % di L-cisteina e lo 0.01 % di cicloesimide. Quest'ultimo inibisce la crescita dei lieviti.
- **YPD agar:** terreno ricco usato comunemente per il mantenimento e la conservazione dei lieviti. Questo terreno contiene per litro: estratto di lievito 10.0 g; peptone 20.0 g; D-glucosio 20.0 g; Agar 18.0 g. In questo terreno i lieviti vengono mantenuti a 4 °C per breve termine. Nella sua forma liquida (senza agar) e con aggiunta del 50 % di una soluzione di glicerolo al 50 % viene utilizzato per la crioconservazione (- 80 °C) dei lieviti a lungo termine.

3.3 Enumerazione ed isolamento di lieviti e batteri

Ciascun campione di kefir (K1, K2, K3, X1, X2 e X3) è stato analizzato attraverso il metodo delle conte vitali su piastra con lo scopo di enumerare ed isolare le eventuali specie di lieviti e batteri presenti nei campioni. Per la conta dei microrganismi sono state eseguite diluizioni seriali in base dieci (Figura 1): 1 ml di campione (dopo averlo ben agitato con l'ausilio di un vortex) è stato trasferito in una provetta contenente 9 ml di H₂O sterile per ottenere una diluizione in rapporto 1:10 (10^{-1}). Da questa provetta è stato prelevato 1 ml di sospensione e trasferito in una seconda provetta contenente sempre 9 ml di H₂O sterile, per ottenere così una diluizione in rapporto 1:100 (10^{-2}). Si è proceduto allo stesso modo fino alla diluizione più opportuna.

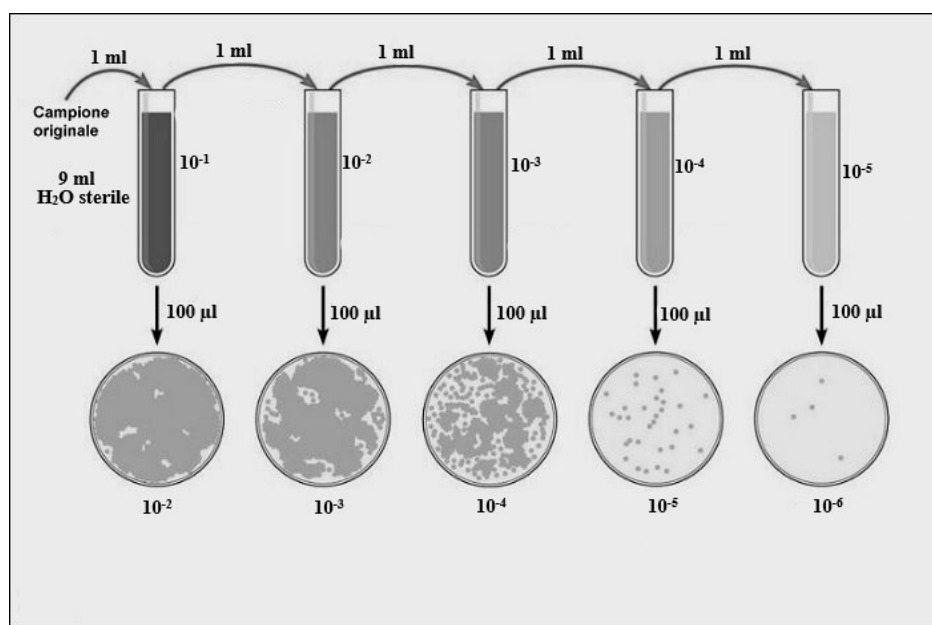


Figura 1. Diluizioni seriali (<https://www.esperimentanda.com/>)

Dopo aver vortexato la provetta contenente il campione diluito, 100 µl della diluizione più opportuna sono stati trasferiti e spatolati in piastre Petri contenenti i terreni descritti nella sezione 3.2: WL nutrient agar ed MRS agar.

Le piastre di WL nutrient agar sono state incubate a 25° C per permettere la crescita dei lieviti mentre quelle con MRS agar sono state incubate in condizioni di microaerofilia, a 37 °C, per permettere la crescita dei batteri

Le piastre di WL nutrient agar sono state incubate a 25° C per permettere la crescita dei lieviti mentre quelle con MRS agar sono state incubate in condizioni di microaerofilia, a 37 °C, per permettere la crescita dei batteri.

Dopo 3/4 giorni di incubazione, è stato possibile effettuare la conta microbica.

Sulla base della diversa morfologia macro e microscopica (utilizzando un microscopio ottico con ingrandimento 100 ×), le colonie diverse ed in numero rappresentativo per ciascuna morfologia, state isolate strisciandole su terreno appropriato, quale YPD per i lieviti (incubati a 25°C) e MRS agar per le colonie batteriche (incubate a 37°C in microaerofilia). Dopo 3/4 giorni di incubazione è stata verificata l'assenza di contaminazione e quindi la purezza di ciascun isolamento.

3.4 Identificazione dei lieviti e batteri a livello di specie

3.4.1 Estrazione del DNA da lieviti

I lieviti isolati e verificati per la loro purezza di coltura, sono stati processati per l'estrazione del DNA genomico, con lo scopo di arrivare all'identificazione di specie.

Tutti gli steps di estrazione del DNA genomico da lievito sono stati descritti di seguito:

- Dalla piastra di YPD contenente la coltura pura di lievito, prelevare con un'ansa di plastica ed in sterilità, 1/8 della superficie totale della coltura e trasferirla in un'epENDORF contenente 300 µl di tampone (Tris 0.1 M pH 8.5, EDTA 50 mM pH 8, SDS 1%).
- Aggiungere sferette di vetro per 1/3 del contenuto dell'epENDORF, e per tre volte, vortexare per 1 minuto e porre in ghiaccio per 1 altro minuto.
- Bollire l' epENDORF per 10 minuti.
- Porre in ghiaccio per 3 minuti.
- Aggiungere 20 µl di Tris HCl 1M, 15 di µl EDTA 0.5M, 50 µl di SDS 10% e 200 µl di Potassio Acetato 5M.
- Spipettare brevemente e porre in ghiaccio per 30 minuti.
- Centrifugare per 10 minuti a 14000 rpm

- Prelevare 500 µl di surnatante, trasferirlo in una nuova eppendorfe, in egual volume, aggiungere isopropanolo freddo (-20 °C).
- Incubare in ghiaccio l'eppendorf e centrifugare 10 min a 14000 rpm.
- Eliminare il surnatante ed aggiungere 500 µl di etanolo freddo al 70%.
- Centrifugare per 5 minuti ed eliminare l'etanolo.
- Risospendere il pellet in 100 µl di TE (pH 8) ed incubare in stufa a 30°C per 15 minuti.
- Spipettare, vortexare e conservare l'eppendorf contenente il DNA genomico a -20°C fino allo step successivo.

3.4.2 PCR-ITS per l'identificazione dei lieviti

Il DNA genomico ottenuto con lo step precedente è stato utilizzato per allestire una reazione di PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizzando specifici primers, in particolare ITS1 ed ITS4 (White et al., 1990), tramite i quali è stato possibile arrivare all'identificazione a livello di specie degli isolati.

La reazione a catena della polimerasi è una tecnica che permette l'amplificazione semiconservativa di frammenti di DNA grazie all'utilizzo dell'enzima DNA polimerasi estratto dal microrganismo *Thermophilus aquaticus*. Questo batterio possiede una DNA polimerasi

altamente termostabile in grado di resistere alla prima fase di denaturazione del DNA che avviene ad una temperatura di 95 °C.

La mix di reazione di PCR prevede l'utilizzo di primer specifici (sequenze oligonucleotidiche specifiche a singolo filamento) complementari alle estremità 5' e 3' del frammento di DNA da amplificare, che costituiscono l'innescò dell'attività della polimerasi.

Affinché la reazione di PCR avvenga in maniera adeguata, sono poi necessari tutti i desossiribonucleotidi (Adenina, A; Timina, T; Guanina, G; Citosina, C) per la sintesi delle nuove eliche, il cloruro di magnesio ($MgCl_2$) come cofattore indispensabile all'attività della Taq polimerasi e l'enzima stesso.

La reazione a catena della polimerasi prevede l'alternanza ciclica di tre fasi:

- La fase di denaturazione della doppia elica di DNA che avviene a 95°C
- La fase di appaiamento degli inneschi oligonucleotidici alle sequenze di DNA da amplificare che avviene generalmente ad una temperatura compresa tra i 50 e i 70 °C. Questa temperatura può variare a seconda della specificità del primer alla sequenza da amplificare.
- La fase di estensione in cui la Taq polimerasi, legata ai primer, sintetizza i nuovi filamenti di DNA.

Nel caso specifico, la coppia di primer utilizzati sono ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'). Questi amplificano la regione degli spaziatori presenti fra i geni codificanti gli rRNA (RNA ribosomiali) dei lieviti, e ne consentono l'identificazione a livello di specie. La mix di reazione di PCR è stata così formulata:

- Buffer + MgCl_2 10 ×
- mix di desossiribonucleotidi (dNTP) alla concentrazione di 10 μM ciascuno
- primers specifici (ITS1 e ITS4), utilizzando soluzioni alla concentrazione di 50 μM ciascuno
- enzima Taq Polymerase 5000U/ μl
- DNA genomico
- H_2O ultrapura

Per la preparazione della mix di reazione di PCR, in un'epENDORF è stata trasferita l' H_2O , il buffer 10 ×, i primers, i dNTP ed infine l'enzima. Una volta mixato il tutto, questa è stata aliquotata in eppENDORF da 0.2 ml, contenenti ciascuna il DNA genomico dei lieviti da identificare, separatamente.

Nelle eppendorf da 0.2 ml sono stati quindi aliquotati 5 μ l di DNA estratto da ciascun campione e 95 μ l di mix, ottenendo così un volume finale di reazione di 100 μ l.

Le eppendorf a questo punto sono state poste nel Termociclatore ed è stato avviato il ciclo di PCR seguendo la procedura descritta da White e collaboratori (1990).

3.4.3 Estrazione del DNA da batteri

Con lo scopo di arrivare all'identificazione di specie, i batteri isolati in colture pure, sono stati processati per l'estrazione del DNA genomico.

Gli steps di estrazione del DNA genomico da batteri sono stati descritti di seguito:

- Dalla piastra di MRS contenente la coltura pura batterica, prelevare in sterilità con un'ansa di plastica, 2-3 colonie e trasferirle in un'eppendorf contenente 1 ml di tampone TE 1 \times (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 Mm, pH 8)
- Centrifugare a 14000 rpm per 6 minuti a 4°C.
- Eliminare il surnatante, risospendere il pellet in 300 μ l di tampone TE 1 \times e vortexare per 1 minuto.
- Porre in Termoblock a 100 °C per 15 minuti.

- Trasferire in ghiaccio per 10 minuti.
- Centrifugare a 14000 rpm per 8 minuti a 4 °C.
- Recuperare il surnatante contenente il DNA genomico, trasferirlo in una nuova eppendorf e conservarlo a -20°C fino allo step successivo.

3.4.4 PCR per l'identificazione dei batteri

Per l'analisi della diversità batterica è stata utilizzata la coppia di primer universali P1 (5' - GCGGCGTGCCTAATACATGC - 3') e P2 (5' - TTCCCCACGCGTTACTCACC - 3') (Klijn et al., 1991) per l'amplificazione della regione V1 del gene che codifica per l'rRNA 16S.

La mix di reazione di PCR per l'amplificazione del DNA genomico estratto con lo step precedente è stata così formulata:

- Buffer + MgCl₂
- Mix di desossiribonucleotidi (dNTP) alla concentrazione di 10 mM ciascuno
- Primer specifici (P1 e P2) utilizzando soluzioni alla concentrazione di 50 μM ciascuno
- Enzima Taq Polymerase
- DNA genomico

- H₂O ultrapura

La mix di reazione è stata preparata aggiungendo in un'eppendorf l'H₂O, il buffer, i dNTP, i primer ed infine l'enzima.

Nelle eppendorf da 0.2 ml sono stati aliquotati 2 µl di DNA estratto da ciascun campione e 48 µl di mix, ottenendo un volume finale di reazione di 50 µl.

Le eppendorf sono state poste nel Termociclatore ed è stato avviato il ciclo di PCR come riportato da Klijn e collaboratori (1991).

3.4.5 Elettroforesi su gel di agarosio

I risultati delle amplificazioni del DNA dei lieviti e dei batteri sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica comunemente utilizzata per valutare i risultati delle amplificazioni e per controllare le dimensioni dei frammenti amplificati tramite PCR.

Grazie all'applicazione di un campo elettrico che andrà ad agire sulla carica netta positiva o negativa delle molecole biologiche, e in base alla dimensione delle maglie del reticolo del gel, si avrà la migrazione delle molecole che andranno a disporsi su bande precise in base alla loro dimensione. Nel caso specifico, gli amplificati sono stati fatti correre su gel d'agarosio al 1.5 % così preparato: in 35 mL di tampone TBE 0.5 × (Tris-Borato-EDTA) sono stati

sciolti 0.53 g di agarosio ed aggiunti 2.7 μ l di Sybr safe DNA gel stain (Invitrogen, California, USA) che ha la funzione di rendere il DNA visibile se esposto a radiazioni ultraviolette.

Prima del completo raffreddamento, la soluzione è stata versata in un'apposita vaschetta in cui è presente un pettine per la formazione dei pozzetti nei quali verranno posti 10 μ l di amplificato. In uno dei pozzetti è stato posto un marcatore di peso molecolare 100bp (base pair) per confrontare la grandezza dei frammenti di amplificazione ottenuti. A questo punto è stata avviata la migrazione elettroforetica, alla potenza di 80 volts per circa 1 ora.

Terminata la corsa elettroforetica, il gel è stato esposto a luce ultravioletta al fine di valutare la presenza e la dimensione degli ampliconi.

3.4.6 Sequenziamento e identificazione degli isolati

Gli ampliconi di tutti gli isolati, una volta verificata la presenza e la qualità in seguito ad elettroforesi su gel d'agarosio, sono stati inviati ad un servizio esterno di sequenziamento che sfrutta il metodo Sanger.

Una volta ottenute le sequenze, queste sono state comparate con quelle già presenti nelle banche dati, sfruttando il programma BLAST del database GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) per l'identificazione a livello di specie degli isolati (Altschul et al., 1997).

Capitolo quarto

RISULTATI

4.1 Enumerazione ed isolamento della popolazione microbica

L'analisi delle conte vitali ha permesso di enumerare ed isolare le colonie di lieviti e batteri sulla base delle diverse morfologie di colonia (Figura 2).



Figura 2. Conte microbiche K1, K2 e K3

Dai kefir artigianali sono stati isolate 15 colonie di lievito e 8 colonie di batteri apparentemente differenti. Ciascun isolato è stato indicato con un numero progressivo anticipato dalla lettera L per i lieviti e B per i batteri. Per ciascun isolato apparentemente differente, è stato riportato il valore delle cellule vitali in UFC/ml (Tabella 2).

Dai kefir industriali sulla base della morfologia di colonia sono state isolate 2 colonie di lievito e 14 colonie di batteri in apparenza differenti. Ogni isolato è stato identificato con un numero progressivo anticipato dalla lettera L per i lieviti e B per i batteri. Per ogni isolato apparentemente diverso, è stato riportato il valore delle cellule vitali in UFC/ml (Tabella 2)

| CAMPIONE | ID | UCF/ml | CAMPIONE | ID | UCF/ml |
|-----------|-------------------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------|
| K1 | L1 | $4,9 \times 10^6$ | X1 | LX1 | 9×10^4 |
| | L2 | 4×10^5 | | BX1 | 9×10^7 |
| | L3 | 6×10^4 | | BX2 | $3,7 \times 10^8$ |
| | L4 | 9×10^4 | | BX3 | 5×10^8 |
| | L5 | 2×10^4 | | BX4 | $2,6 \times 10^7$ |
| | L6 | $2,3 \times 10^6$ | | | |
| | B1 | $2,7 \times 10^7$ | | | |
| | B2 | $2,4 \times 10^6$ | | | |
| | B3 | 6×10^6 | | | |
| | B4 | $2,9 \times 10^6$ | | | |
| K2 | L7 | $3,2 \times 10^4$ | X2 | LX2 | 6×10^5 |
| | L8 | $5,9 \times 10^4$ | | BX5 | $4,6 \times 10^7$ |
| | L9 | 6×10^5 | | BX6 | 3×10^8 |
| | L10 | $2,7 \times 10^5$ | | BX7 | $4,8 \times 10^7$ |
| | L11 | $1,2 \times 10^4$ | | BX8 | $5,2 \times 10^8$ |
| | B5 | 3×10^4 | | | |
| | B6 | 3×10^4 | | | |
| B7 | $1,6 \times 10^5$ | | | | |
| K3 | L12 | 6×10^3 | X3 | BX9 | $4,7 \times 10^7$ |
| | L13 | 4×10^4 | | BX10 | 5×10^8 |
| | L14 | $2,8 \times 10^6$ | | BX11 | $2,7 \times 10^7$ |
| | L15 | $2,6 \times 10^5$ | | BX12 | $5,1 \times 10^7$ |
| | B9 | $7,3 \times 10^6$ | | BX13 | 6×10^9 |
| | | | BX14 | $3,2 \times 10^9$ | |

Tabella 2. Batteri e lieviti presenti nei Kefir artigianali (K1, K2 e K3) e nei Kefir industriali (X1, X2 e X3) con valore delle cellule vitali in UFC/ml.

4.2 Differenze qualitative e quantitative riscontrate tra i kefir artigianali e industriali

Nei campioni di kefir artigianali e di kefir industriali è stata osservata una differenza sostanziale nella composizione microbica. I campioni di kefir artigianale presentano una composizione eterogenea dei lieviti e batteri che coesistono nel fermentato, mentre nei campioni di kefir industriale osserviamo la quasi assoluta presenza di isolati batterici.

In particolare, nel campione K1 la concentrazione delle cellule batteriche in UFC/ml è maggiore di due ordini di grandezza rispetto alle cellule dei lieviti. Al contrario nel campione K3 le cellule vive e vitali di lievito superano di un ordine di grandezza le cellule batteriche. Nel campione K2 la distribuzione delle cellule di lieviti e delle cellule batteriche è omogenea.

4.3 Risultati sequenziamento

I risultati del sequenziamento sono stati utilizzati per identificare i batteri e i lieviti a livello di specie.

Nel campione K1 la specie di lievito presente in maggiore concentrazione è la *Kazachistania unispora*, seguita da *Debariomyces hansenii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kazachistania servazzii*. I batteri, presenti in concentrazione maggiore di un ordine di grandezza rispetto ai lieviti, appartengono alla specie *Acetobacter pastorianus*, seguiti dal *Lactobacillus kefir* e dallo *Staphylococcus epidermidis*.

Il campione K2 presenta una quantità omogenea di lieviti e batteri. I lieviti presenti in quantità maggiore appartengono al genere *Kazachistania* (*K. servazzii* e *K. unispora*) seguiti dal *Saccharomyces cerevisiae*. I batteri presenti in quantità maggiori appartengono alla specie *Lactobacillus kefir*, presenti in quantità superiori di un ordine di grandezza rispetto ai *L. buchneri*.

Il campione K3 ha una concentrazione equivalente di lieviti e batteri. Tra i primi prevalgono le specie *Kluveromyces marxianus* e *Kazachistania turicensis* minore di un ordine di grandezza rispetto ai primi. Le specie batteriche identificate appartengono alla specie *Lactobacillus kefir*.

I campioni di kefir industriali mostrano la quasi assoluta assenza di lieviti. La sola specie identificata, il *Saccaromyces cerevisiae*, è stata identificata dai campioni X1 e X2.

Nel campione X1 e X2 in concentrazione omogenea prevalgono i batteri lattici, tra cui *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus spp.* e *Leuconostoc spp.* insieme a batteri acetici, quali *Acetobacter spp.*

Nel campione X3 l'identificazione ha portato al riconoscimento di batteri lattici appartenenti ai generi *Lactococcus* (*L.lactis* e *L.cremosis*) e *Lactobacillus* (*L.acidophylus*, *L.helveticus* e *L. lactis*) e alla specie *Bifidobacterium lactis*.

I risultati del sequenziamento sono mostrati in dettaglio in Tabella 3 e in Figura 3.

| CAMPIONE | ID | SPECIE | CAMPIONE | ID | SPECIE |
|-----------|-----|-----------------------------------|-----------|-------------------------------|----------------------------------|
| K1 | L1 | <i>Kazachistania unispora</i> | X1 | LX1 | <i>Saccaromyces</i> |
| | L2 | <i>Debariomyces hansenii</i> | | BX1 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| | L3 | <i>Saccaromyces cerevisiae</i> | | BX2 | <i>Lactococcus</i> |
| | L4 | <i>K. unispora</i> | | BX3 | <i>Leuconostoc</i> |
| | L5 | <i>Kazachistania servazzii</i> | | BX4 | <i>Acetobacter</i> |
| | L6 | <i>K. unispora</i> | | | |
| | B1 | <i>Acetobacter pastorianus</i> | | | |
| | B2 | X | | | |
| | B3 | <i>Lactobacillus kefir</i> | | | |
| | B4 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | | | |
| K2 | L7 | <i>S.cerevisiae</i> | X2 | LX2 | <i>Saccaromyces</i> |
| | L8 | <i>S.cerevisiae</i> | | BX5 | <i>Lactobacillus casei</i> |
| | L9 | <i>K. unispora</i> | | BX6 | <i>Lactococcus</i> |
| | L10 | <i>K. servazzii</i> | | BX7 | <i>Leuconostoc</i> |
| | L11 | <i>K. unispora</i> | | BX8 | <i>Acetobacter</i> |
| | B5 | <i>Lactobacillus buchmeri</i> | | | |
| | B6 | X | | | |
| | B7 | <i>L. kefir</i> | | | |
| K3 | L12 | X | X3 | BX9 | <i>Lactococcus lactis</i> |
| | L13 | <i>Kluveromyces marxianus</i> | | BX10 | <i>Lactococcus cremosis</i> |
| | L14 | <i>K. marxianus</i> | | BX11 | <i>Lactobacillus acidophilus</i> |
| | L15 | <i>Kazachistania turicensis</i> | | BX12 | <i>Lactobacillus helveticus</i> |
| | B9 | <i>L. kefir</i> | | BX13 | <i>Lactobacillus lactis</i> |
| | | | BX14 | <i>Bifidobacterium lactis</i> | |

Tabella 3. Risultati identificazione dei kefir artigianali (K1, K2 e K3) e dei kefir industriali (X1, X2 e X3)

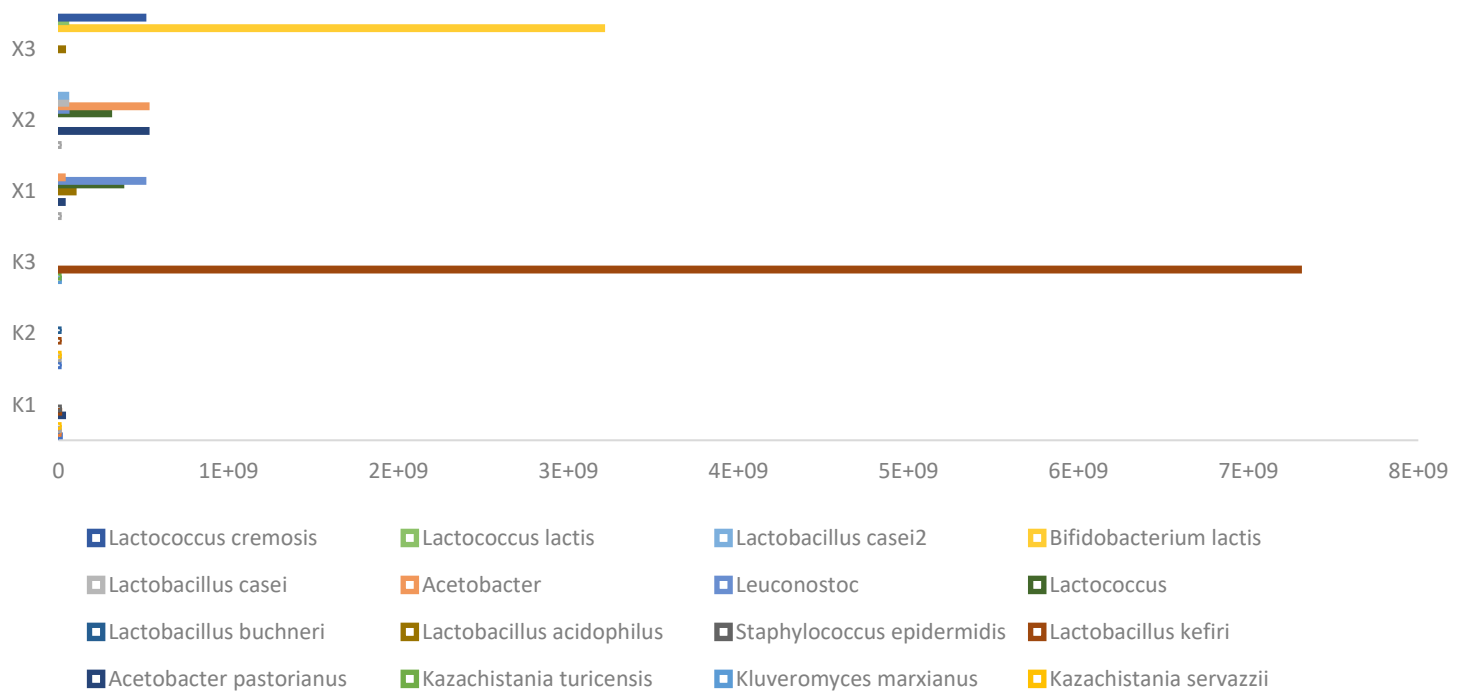


Figura 3. Rappresentazione grafica della concentrazione di specie di lieviti e batteri in UFC/ml identificati nei campioni K1, K2, K3, X1, X2 e X3.

Capitolo quinto

CONCLUSIONI

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che i kefir artigianali mostrano una composizione eterogenea dei microrganismi presenti nel prodotto finito (batteri e lieviti) rispetto alla prevalenza numerica dei batteri nei kefir industriali. Questa differenza potrebbe essere dovuta alla modalità di produzione e stoccaggio del prodotto finito. I kefir artigianali vengono gestiti in casa, manipolati a temperatura ambiente e utilizzando ciotole e attrezzi puliti ma non sterili. Tutto ciò permette una proliferazione microbica incontrollata e variabile a seconda della stagione (temperatura maggiore in estate, rispetto all'inverno) e una conseguente distribuzione eterogenea di lieviti e batteri che in sinergia attribuiscono al prodotto finito una ampia gamma di caratteristiche organolettiche e terapeutiche. L'assenza di pastorizzazione, non necessaria grazie alla produzione, da parte del microbiota che compone i grani di antibiotici e batteriocine, non va a intaccare la biodiversità microbica.

I kefir industriali vengono prodotti a partire da colture starter a composizione definita poiché la produzione del kefir a partire dai grani sarebbe limitata dalla quantità dei grani a disposizione, con conseguente perdita economica da parte delle aziende produttrici.

Le colture starter isolate direttamente dai grani vengono utilizzate in forma liofilizzata, congelata o essiccata e presentano una bassa biodiversità, portando alla produzione di prodotti le cui caratteristiche saranno pur benefiche, ma lontane dalle caratteristiche organolettiche e terapeutiche di un prodotto ottenuto a partire dai grani.

La composizione dei prodotti commerciali dovendo sottostare a numerose normative deve essere standardizzata, motivo per cui l'utilizzo diretto dei grani come starter porterebbe a un prodotto la cui composizione sarebbe problematica per la messa in commercio.

I kefir industriali derivano da latte che subisce un processo di pastorizzazione dovuta alla presenza intrinseca di lieviti e batteri spoilage (non desiderati) i quali si moltiplicherebbero in maniera incontrollata, a seconda delle condizioni ambientali, con possibili sviluppi di alterazioni del prodotto finito. D'altro canto, questa prassi porta ad un'ulteriore perdita di biodiversità, ritrovando nel prodotto finito solamente i microrganismi inoculati.

Durante la maturazione del prodotto, la produzione di acido acetico da parte dei batteri acetici conferirebbe caratteristiche organolettiche sgradevoli al prodotto finito.

L'aumento del contenuto di etanolo, prodotto di fermentazione dei lieviti, andrebbe a innalzare il tenore alcolico, che secondo normativa per la messa in

commercio di un prodotto analcolico non deve superare il limite dello 0,5%, limite che non è prevedibile nel fermentato prodotto dai grani. L'eccessiva produzione di anidride carbonica da parte dei lieviti, inoltre, porterebbe i contenitori, in cui i kefir industriali vengono commercializzati, all'esplosione. I kefir industriali, a differenza di quelli artigianali, non sono "frizzanti" proprio a causa della scarsissima presenza di anidride carbonica.

I kefir industriali vengono prodotti a temperatura controllata e stoccati a una temperatura, di circa 5°C, che permette il controllo della comunità di lieviti e batteri per permetterne la conservazione fino a 20-28 giorni, periodo che assicura la presenza di almeno 10^6 ufc/ml alla data di scadenza come previsto da normativa.

In commercio si trovano starter industriali per avviare la produzione del kefir.

I prodotti derivanti da questi starter avranno le caratteristiche dei lattici fermentati, che seppur benefiche sono lontane da quelle apportate dall'assunzione dei kefir artigianali. Con l'utilizzo degli starter industriali non si formeranno i grani, visto che ad oggi nemmeno in laboratorio è stato possibile ricreare le condizioni per la loro formazione. Il loro utilizzo è limitato a qualche fermentazione, per poi dover essere riacquistati.

È possibile affermare dai risultati ottenuti che le proprietà benefiche date dall'assunzione giornaliera dei kefir industriali, seppur si tratti di prodotti

salutari grazie al contenuto di organismi probiotici, quali batteri lattici e acetici, sono lontane dalle proprietà attribuibili all'assunzione di kefir prodotti in maniera artigianale.

La molteplice biodiversità dei batteri e dei lieviti immobilizzati nel kefirian dei kefir artigianali, non del tutto definita dal punto di vista tassonomico e mutando continuamente in base alla variazione dei parametri ambientali, al tipo di latte utilizzato e al tempo di fermentazione, apporta innumerevoli proprietà benefiche al consumatore e caratteristiche organolettiche al prodotto finito permettendone inoltre la produzione per un periodo di tempo illimitato.

Capitolo sesto

BIBLIOGRAFIA

- Action, E. C. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. *British journal of nutrition*, 81(1), 1-27.
- Agarbati, A., Canonico, L., Marini, E., Zannini, E., Ciani, M., & Comitini, F. (2020). Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods*, 9(3), 287.
- Ahmed, Z., Wang, Y., Ahmad, A., Khan, S. T., Nisa, M., Ahmad, H., & Afreen, A. (2013). Kefir and health: a contemporary perspective. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(5), 422-434.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
- Angulo, L., Lopez, E., & Lema, C. (1993). Microflora present in kefir grains of the Galician region (North-West of Spain). *Journal of Dairy Research*, 60(2), 263-267.

- Alimentarius, C. (2003). Codex Alimentarius. *Guidelines on Nutrition Labeling (CAC/GL 2-1985 (rev 1-1993))*. Available at: (http://www.codexalimentarius.net/download/standards/34/cxg_002e.pdf).
- Bensmira, M., Nsabimana, C., and Jiang, B. (2010). Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of Kefir. *Food Sci. Technol.* 43, 1180–1184.
- Bolla, P. A., Carasi, P., de los Angeles Bolla, M., De Antoni, G. L., & de los Angeles Serradell, M. (2013). Protective effect of a mixture of kefir-isolated lactic acid bacteria and yeasts in a hamster model of *Clostridium difficile* infection. *Anaerobe*, 21, 28-33.
- Buts, J. P. (2009). Twenty-five years of research on *Saccharomyces boulardii* trophic effects: updates and perspectives. *Digestive diseases and sciences*, 54(1), 15-18.
- Cheirsilp, B., & Radchabut, S. (2011). Use of whey lactose from dairy industry for economical kefir production by *Lactobacillus kefirifaciens* in mixed cultures with yeasts. *New biotechnology*, 28(6), 574-580.
- Chen, L. S., Ma, Y., Maubois, J. L., He, S. H., Chen, L. J., & Li, H. M. (2010). Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy science & technology*, 90(5), 537-548.

- Cildir, S. K., Germec, D., Sandalli, N., Ozdemir, F. I., Arun, T., Twetman, S., & Caglar, E. (2009). Reduction of salivary mutans streptococci in orthodontic patients during daily consumption of yoghurt containing probiotic bacteria. *The European Journal of Orthodontics*, 31(4), 407-411.
- Cillari, E. (2017). Il microbiota intestinale umano. *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio-Italian Journal of Laboratory Medicine*, 13(3-4), 135-138.
- De Vrese, M., Keller, B., & Barth, C. A. (1992). Enhancement of intestinal hydrolysis of lactose by microbial β -galactosidase (EC 3.2.1.23) of kefir. *British Journal of Nutrition*, 67(1), 67-75.
- Di Pasquale, J. (2009). Consumi alimentari e innovazione: gli alimenti funzionali. *Ancona: Università Politecnica delle Marche. Disponibile su: <http://www.agriregionieuropa.univpm.it/dettart.php>.*
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., & Garrote, G. L. (2014). Yeasts from kefir grains: isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(1), 43-53.
- Diplock A.T. et al: Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus Document, *British Journal of Nutrition* 1999).

- Farnworth, E. R. (2006). Kefir—a complex probiotic. *Food Science and Technology Bulletin: Fu*, 2(1), 1-17.
- Farnworth, E. R., & Mainville, I. (2003). Kefir: a fermented milk product. *Handbook of fermented functional foods*, 2, 89-127.
- Farr, D. R. (1997). Functional foods. *Cancer Letters*, 114(1-2), 59-63.
- Fuller, R., “Probiotics in man and animals,” *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 66, no. 5, pp. 365–378, 1989.
- Alimentarius, C. (2003). Codex Alimentarius. *Guidelines on Nutrition Labeling (CAC/GL 2-1985 (rev 1-1993))*. Available at:(http://www.codexalimentarius.net/download/standards/34/cxg_002e.pdf).
- Furukawa, N. (1992). The effect of oral administration of water soluble fraction from kefir grain on antibody production in mice. *Anim. Sci. Technol.(Jpn.)*, 63, 428-436.
- García-Burgos, M., Moreno-Fernández, J., Alférez, M. J., Díaz-Castro, J., & López-Aliaga, I. (2020). New perspectives in fermented dairy products and their health relevance. *Journal of Functional Foods*, 72, 104059.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2001). Chemical and microbiological characterisation of kefir grains. *The Journal of dairy research*, 68(4), 639.

- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Granier, A., Goulet, O., & Hoarau, C. (2013). Fermentation products: immunological effects on human and animal models. *Pediatric research*, 74(2), 238-244.
- Hamet, M. F., Londero, A., Medrano, M., Vercammen, E., Van Hoorde, K., Garrote, G. L., ... & Abraham, A. G. (2013). Application of culture-dependent and culture-independent methods for the identification of *Lactobacillus kefirifaciens* in microbial consortia present in kefir grains. *Food microbiology*, 36(2), 327-334.
- Hertzler, S. R., & Clancy, S. M. (2003). Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. *Journal of the American Dietetic association*, 103(5), 582-587.
- Hilliam, M. (1998): The Market for Functional Foods. *Int. Dairy Journal*, 8: 349-353.
- Holm F. New Functional Food Ingredients Cardiovascular Health. FoodGroup Denmark, Skødstrup, Denmark. pp. 8-31 (2003)

- Hosono, A., Tanabe, T., & Otani, H. (1990). Binding properties of lactic acid bacteria isolated from kefir milk with mutagenic amino acid pyrolyzates. *Milchwissenschaft*, 45(10), 647-651.
- Htwe, K., Yee, K. S., Tin, M., & Vandenplas, Y. (2008). Effect of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of acute watery diarrhea in Myanmar children: a randomized controlled study. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 78(2), 214-216.
- Ismaiel, A. A., Ghaly, M. F., & El-Naggar, A. K. (2011). Milk kefir: ultrastructure, antimicrobial activity and efficacy on aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus*. *Current microbiology*, 62(5), 1602-1609.
- Kaur, S., & Das, M. (2011). Functional foods: an overview. *Food Science and Biotechnology*, 20(4), 861.
- Kechagia, M., Basoulis, D., Konstantopoulou, S., Dimitriadi, D., Gyftopoulou, K., Skarmoutsou, N., & Fakiri, E. M. (2013). Health benefits of probiotics: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Klijn, N. I. C. O. L. E. T. T. E., Weerkamp, A. H., & de Vos, W. M. (1991). Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction-amplified variable regions of 16S rRNA and

- specific DNA probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3390-3393.
- Klimas, M. (2008). International market trends analysis for the functional foods and natural health products industry in the United States, Australia, the United Kingdom and Japan, George Morris Centre. *Nutri-Net Canada*, 2008.
 - Kojima, K. (1995). Control of health claim on foods in Japan. In *Proceedings of the First International Conference on Eat-West Perspectives on Functional Foods, Singapore* (pp. 75-76). Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., & Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of dairy science*, 87(12), 4050-4056.
 - Kurugöl, Z., & Koturoğlu, G. (2005). Effects of *Saccharomyces boulardii* in children with acute diarrhoea. *Acta Paediatrica*, 94(1), 44-47.
 - Lee, M. Y., Ahn, K. S., Kwon, O. K., Kim, M. J., Kim, M. K., Lee, I. Y., ... & Lee, H. K. (2007). Anti-inflammatory and anti-allergic effects of kefir in a mouse asthma model. *Immunobiology*, 212(8), 647-654.
 - Leite, A. M. D. O., Miguel, M. A. L., Peixoto, R. S., Rosado, A. S., Silva, J. T., & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological, technological and

therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(2), 341-349.

- Liu, J. R., Wang, S. Y., Chen, M. J., Chen, H. L., Yueh, P. Y., & Lin, C. W. (2006). Hypocholesterolaemic effects of milk-kefir and soyamilk-kefir in cholesterol-fed hamsters. *British journal of nutrition*, 95(5), 939-946.
- Liu, J. R., Wang, S. Y., Lin, Y. Y., & Lin, C. W. (2002). Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-bearing mice. *Nutrition and cancer*, 44(2), 183-187.
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol*, 23(2), 67-74.
- Lughetti, L., Bruzzi, P., Predieri, B., Vellani, G., & De Simone, M. (2008). La sindrome metabolica in età evolutiva. *Prospettive in pediatria*, 38(152), 215-220.
- María García-Burgos, Jorge Moreno-Fernández, María J.M. Alférez, Javier Díaz-Castro, Inmaculada López-Aliaga. New perspectives in fermented dairy products and their health relevance.
- Masdea, L., Kulik, E. M., Hauser-Gerspach, I., Ramseier, A. M., Filippi, A., & Waltimo, T. (2012). Antimicrobial activity of *Streptococcus*

- salivarius K12 on bacteria involved in oral malodour. *Archives of oral biology*, 57(8), 1041-1047.
- Mercenier, A., Lenoir-Wrjnkoop, I., & Sanders, M. E. (2008). Physiological and functional properties of probiotics. *Journal of Milk Science and Biotechnology*, 26(1), 53-57.
 - Messaoudi, M., Lalonde, R., Violle, N., Javelot, H., Desor, D., Nejdj, A., ... & Cazaubiel, J. M. (2011). Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition*, 105(5), 755-764.
 - Miyamoto, T., Morita, H., Nishioka, K., Kataoka, K., Izumimoto, M., & Kuyama, T. (1991). Constituent species of lactic acid bacteria from kefir and their desmutagenic properties. *Japanese Journal of Dairy and Food Science (Japan)*.
 - Patterson, C. A. (2008). Oat and Barley β -Glucans Unique Soluble Fibers. *Agr. Agri-Food Canada, Ontario, Canada*, 1-4.
 - Piermaria, J., Bosch, A., Pinotti, A., Yantorno, O., Garcia, M. A., & Abraham, A. G. (2011). Kefiran films plasticized with sugars and polyols: water vapor barrier and mechanical properties in relation to their microstructure analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy. *Food*

- Hydrocolloids*, 25(5), 1261-1269. Pogačić, T., Šinko, S., Zamberlin, Š., & Samaržija, D. (2013). Microbiota of kefir grains. *Mljekarstvo*, 63(1), 3-14.
- Prado, M. R., Blandón, L. M., Vandenberghe, L. P., Rodrigues, C., Castro, G. R., Thomaz-Soccol, V., & Soccol, C. R. (2015). Milk kefir: composition, microbial cultures, biological activities, and related products. *Frontiers in microbiology*, 6, 1177.
 - Pretorius, I. S., Du Toit, M., & Van Rensburg, P. (2003). Designer yeasts for the fermentation industry of the 21st century. *Food Technology and Biotechnology*, 41(1), 3-10.
 - Psani, M., & Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1329-1336. Toma, M. M., & Pokrotnieks, J. (2006). Probiotics as functional food: microbiological and medical aspects. *Acta Universitatis Latviensis*, 710, 117-129.
 - Reid, G. (1999). The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(9), 3763-3766.

- Reid, G., McGroarty, J. A., Angotti, R., & Cook, R. L. (1988). Lactobacillus inhibitor production against Escherichia coli and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 34(3), 344-351.
- Rima, H., Steve, L., & Ismail, F. (2012). Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3, 421.
- Roberfroid, M. B. (1998). Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *British journal of Nutrition*, 80(S2), S197-S202.
- Rogelj, I. (2000). Fermented milk as a functional food. *Animal products and human health*, (6-P), 105.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of biotechnology*, 84(3), 197-215.
- Saiz YH. Spanish Council for Scientific Research. Available from: [http://www.geoscopio.org/est/gmms/ott_en/Postharvest treatment of table grapes to increase the content of the antioxidant and anticarcinogenic component resveratrol using UV irradiation pulses CSIC AGRO012 4803.htm](http://www.geoscopio.org/est/gmms/ott_en/Postharvest_treatment_of_table_grapes_to_increase_the_content_of_the_antioxidant_and_antitumorogenic_component_resveratrol_using_UV_irradiation_pulses_CSIC_AGRO012_4803.htm). Accessed Apr. 15, 2011.

- Sanders, M. E. (2008). *Probiotics: definition, sources, selection, and uses. Clinical infectious diseases, 46(Supplement_2), S58-S61.*
- Shi, L. H., Balakrishnan, K., Thiagarajah, K., Ismail, N. I. M., & Yin, O. S. (2016). Beneficial properties of probiotics. *Tropical life sciences research, 27(2), 73.*
- Shimauchi, H., Mayanagi, G., Nakaya, S., Minamibuchi, M., Ito, Y., Yamaki, K., & Hirata, H. (2008). Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of clinical periodontology, 35(10), 897-905.*
- Siro, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite, 51(3), 456-467.*
- Soomro, A. H., Masud, T., & Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health—a review. *Pakistan Journal of Nutrition, 1(1), 20-24.*
- Suresh Kumar, A., Mody, K., & Jha, B. (2007). Bacterial exopolysaccharides—a perception. *Journal of basic microbiology, 47(2), 103-117.*

- Turrone, F., Milani, C., Duranti, S., Ferrario, C., Lugli, G. A., Mancabelli, L., ... & Ventura, M. (2018). Bifidobacteria and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cellular and molecular life sciences*, 75(1), 103-118.
- Valcheva, R., & Dieleman, L. A. (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1), 27-37.
- Vincenzini, M., Romano, P., & Farris, G. A. (2005). Microbiologia del vino. *Casa Editrice Ambrosiana*.
- Wang, S. Y., Chen, K. N., Lo, Y. M., Chiang, M. L., Chen, H. C., Liu, J. R., & Chen, M. J. (2012). Investigation of microorganisms involved in biosynthesis of the kefir grain. *Food microbiology*, 32(2), 274-285.
- Wang, Y., Xu, N., Xi, A., Ahmed, Z., Zhang, B., & Bai, X. (2009). Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84(2), 341-347.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322. Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T.

- J. (2004). Isolation and characterization of the microbial population of different South African kefir grains. *International Journal of Dairy Technology*, 57(1), 33-37.
- Witthuhn, R. C., Schoeman, T., & Britz, T. J. (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *International Dairy Journal*, 15(4), 383-389.
 - Yang, Z., Zhou, F., Ji, B., Li, B., Luo, Y., Yang, L., & Li, T. (2010). Symbiosis between microorganisms from kombucha and kefir: potential significance to the enhancement of kombucha function. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(2), 446-455.
 - Yeşilova, Y., Çalka, Ö., Akdeniz, N., & Berktaş, M. (2012). Effect of probiotics on the treatment of children with atopic dermatitis. *Annals of dermatology*, 24(2), 189.
 - Yüksekdağ, Z. N., Beyath, Y., & Aslım, B. (2004). Metabolic activities of *Lactobacillus* spp. strains isolated from kefir. *Food/Nahrung*, 48(3), 218-220.
 - Zanirati, D. F., Abatemarco Jr, M., de Cicco Sandes, S. H., Nicoli, J. R., Nunes, Á. C., & Neumann, E. (2015). Selection of lactic acid bacteria

from Brazilian kefir grains for potential use as starter or probiotic cultures. *Anaerobe*, 32, 70-76.

- Zendeboodi, F., Khorshidian, N., Mortazavian, A. M., & da Cruz, A. G. (2020). Probiotic: conceptualization from a new approach. *Current Opinion in Food Science*, 32, 103-123.
- Zhou, J., Liu, X., Jiang, H., & Dong, M. (2009). Analysis of the microflora in Tibetan kefir grains using denaturing gradient gel electrophoresis. *Food microbiology*, 26(8), 770-775. *Food Microbiol.* 26:770–775.

Capitolo settimo

SITOGRAFIA

- <https://enzoverga.it/v2/disintossicazione/ecosistema-intestinale/la-flora-batterica>
- <https://kefiritalia.it/kefir-artigianale-vs-kefir-industriale-quali-le-differenze/>
- <https://kefiritalia.it/la-storia/>
- <https://www.latticinellabirra.it/lacto-school/microbiologia-generale-lattici/>
- <https://www.ruminantia.it/benefici-degli-alimenti-lattiero-caseari-fermentati>
- <https://www.synalab.it/articoli/bifidobacterium-il-come-il-quando-e-il-perche-di-un-genere-batterico-che-si-trasmette-da-madre-a-figlio/>
- <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition>

RINGRAZIAMENTI

Arrivata al termine di questo percorso vorrei ringraziare tutte le persone che hanno fatto, fanno e faranno parte del mio percorso universitario e di vita.

In primis vorrei ringraziare la Prof.ssa Francesca Comitini, mia relatrice, per essere stata sempre disponibile e attenta sia nella ricerca di un argomento di tesi che nel prestare attenzione agli sviluppi della fase sperimentale come anche nelle fasi finali di stesura di questa tesi.

Grazie ad Alice, sempre disponibile nel chiarire qualsiasi mio dubbio, sempre pronta a darmi consigli e a tranquillizzarmi nel momento del bisogno. Porterò sempre con me la tua passione per il lavoro e i tuoi insegnamenti nel mio futuro lavorativo.

Ringrazio i membri del gruppo “Kefir mania e non solo” che mi hanno guidato durante il mio primo approccio alla preparazione del kefir artigianale. Grazie ai vostri preziosi consigli sono riuscita ad entrare ne vivo della mia tesi.

Ringrazio “Molino Casillo” che grazie all’esperienza di stage mi ha permesso di acquisire conoscenze che mi torneranno utili in un futuro lavorativo. In particolare, ringrazio Eleonora e Roberta che sono state sempre disponibili a chiarire qualsiasi mio dubbio.

Grazie a tutti i miei amici, alle mie coinquiline presenti e passate alla mia grande famiglia e a tutte le persone che fanno parte della mia vita, che per motivi di spazio non posso citare, che mi hanno accompagnato in questo percorso di vita, sia dentro che fuori dall’università, poiché mi hanno resa quella che sono oggi.

In particolar modo ringrazio Francesca, Joseph, Valentina, Bud, Beatrice, Kim, Antonio, Stefania e Michele, punti fissi nella mia vita che sanno essere sempre una spalla su cui contare, nei momenti brutti ma soprattutto in quelli belli. Con voi ho riscoperto il significato della vera amicizia.

Ringrazio Sabrina per il supporto morale per gli scleri avuti in questi ultimi due anni di università. Facendoci forza a vicenda siamo finalmente arrivate alla conclusione di questo percorso e a Laura, Lucia e Ilaria con cui ho trascorso questo percorso dal suo inizio. Grazie alle lezioni, alle pause pranzo e all’aiuto reciproco siamo riuscite a superare qualsiasi scoglio.

Una dedica speciale va a Papà e Mamma che durante tutto il mio percorso, come nella mia vita, sono stati e sono costantemente presenti, accompagnandomi e spronandomi in ogni mia scelta. Insieme, in ogni momento bello o brutto, sempre pronti a farci forza l’un l’altro per affrontare con coraggio e dedizione ogni momento difficile, uscendone sempre vincitori e più forti e uniti di prima. Sarete sempre la mia forza.

Un grazie speciale è per Agostino, la persona che condivide con me, da 13 anni, ogni singolo momento della mia vita come io della sua. Spronandomi e sostenendomi in ogni momento, mi hai aiutato a superare i miei limiti. È soprattutto grazie a te che oggi sono quella che sono.

In fine ringrazio me stessa, per non aver mai mollato, per aver superato le mie paure e i momenti di sconforto, sempre pronta a rialzarmi anche dopo vari fallimenti e alla me del passato che mi ha resa la me di oggi. Mi auguro di non perdere mai di vista le cose belle e importanti della vita, quali amore, amicizia e rispetto.

