



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE ALIMENTARI E AMBIENTALI

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN: SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

ATTIVITÀ ANTIFUNGINA DI SANIFICANTI
INDUSTRIALI SU ISOLATI DI LIEVITO
DA CREME DI FARCITURA

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF INDUSTRIAL
SANITIZERS ON YEAST ISOLATES
FROM FILLING CREAMS

TIPO TESI: sperimentale

Tesi di Laurea di:
JONIDA VELIU

Relatore:
PROF. ANDREA OSIMANI

Correlatore:
DOTT.SSA FEDERICA CARDINALI

ANNO ACCADEMICO 2020-2021

SOMMARIO

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO 1 SCOPO DEL LAVORO	9
CAPITOLO 2 MATERIALE E METODI	11
2.1 Estrazione del DNA	11
2.1.1 Quantizzazione spettrofotometrica del DNA estratto	12
2.2 Analisi di PCR-DGGE	13
2.3 Isolamento e identificazione molecolare dei lieviti	14
2.4 Tipizzazione molecolare dei lieviti	15
2.5 Suscettibilità dei lieviti ai disinfettanti.....	16
CAPITOLO 3 RISULTATI E DISCUSSIONE	19
CONCLUSIONI	27
BIBLIOGRAFIA	29

ELENCO DELLE TABELLE E DELLE FIGURE

Tabella 1: Primer utilizzati e condizioni di PCR.....	15
Tabella 2: Miscela per PCR con primer M13 E OPA02.....	16
Tabella 3: Disinfettanti commerciali codificati testati contro gli isolati di lievito.....	16
Tabella 4: Conte microbiche e risultati del sequenziamento delle bande asportate dal gel della DGGE applicata alle creme dei prodotti cotti farciti.....	20
Tabella 5: risultati di test di suscettibilità di isolati di <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (Z1-Z21) ai disinfettanti (D1-D7).....	24
Figura 1: Schema di allestimento della prova di suscettibilità ai disinfettanti.....	18
Figura 2: Profili PCR-DGGE dei lieviti presenti nelle creme da farcitura ottenuti con i primer NL1 _{GC} e LS2.....	19
Figura 3: Disinfettanti commerciali codificati testati contro gli isolati di lievito.....	23
Figura 4: ANOVA eseguita per testare i seguenti principali effetti: disinfettanti (A) e isolati di <i>Zygosaccharomyces bailii</i> (B).....	25

INTRODUZIONE

Ogni materia prima rappresenta l'habitat naturale per un determinato microbiota, diventando una potenziale fonte di contaminazione. Dalla fonte primaria i microrganismi possono essere trasferiti ad altri habitat tramite acqua, aria, insetti ecc., diventando prima colonizzatori e poi deterioranti a seguito della loro moltiplicazione. La fonte microbica primaria in tutte le fasi di lavaggio, produzione, trasformazione e confezionamento di un alimento è rappresentata dalle materie prime, inoltre, l'acqua concorre a determinare le condizioni favorevoli di disponibilità di acqua per il loro sviluppo.

Oggi giorno è soprattutto la contaminazione secondaria a rappresentare il maggior rischio microbico in un alimento, aumentata a causa della tendenza a prolungare la shelf-life dei prodotti. La mescolanza tra materie prime, alimenti processati e ingredienti determina inoltre anche la combinazione delle diverse popolazioni microbiche, portando alla formazione di nuove associazioni, in seguito alle quali prenderanno il sopravvento i microrganismi dotati della maggior capacità di adattamento e di rapido sviluppo alle nuove condizioni chimico-fisiche (Farris et al., 2016).

Le fonti ambientali di contaminazione di un prodotto alimentare sono varie e comprendono:

- le materie prime (microrganismi da concimazione, stoccaggio e trasporto; microrganismi superficiali/intestinali degli animali ecc);
- l'aria confinata (bioaerosol);
- le superfici (pareti, tubature, piani di lavoro, macchinari, utensili ecc.);
- il personale (microrganismi di superficie o intestinali; non corrette norme di comportamento; abbigliamento).

Anche i fattori intrinseci dell'alimento, ovvero le sue caratteristiche chimico-fisiche, giocano un ruolo importante nel favorire o inibire lo sviluppo di uno o più tipi di microrganismi contaminanti (Farris et al., 2016), fra questi:

- pH, a valori $< 5,5$ crescono solo microrganismi acidofili, tra cui i lieviti, ed a valori > 8 i basofili.

- Attività dell'acqua, per prevenire la crescita microbica, si può eliminare l'acqua o diminuire la sua disponibilità nell'alimento. Le muffe crescono a valori di a_w minimo di $\approx 0,7$, i lieviti a $\approx 0,75$ e i batteri a $\approx 0,85$.
- Contenuto d'ossigeno: i microrganismi aerobi obbligati, come i lieviti, necessitano di O_2 per crescere e produrre energia; altri possono modificare il loro metabolismo a seconda della presenza o assenza di O_2 nel mezzo.
- Contenuto di nutrienti, utilizzati dai microrganismi per la crescita.

➤ In base al ruolo assunto nell'alimento, i microrganismi possono essere classificati in quattro principali categorie (Farris et al., 2016):

1. Microrganismi banali, indicatori di qualità della pulizia e dell'igiene delle tecniche di manipolazione e conservazione del prodotto.
2. Microrganismi tecnologici, naturalmente presenti nell'alimento o aggiunti come colture starter, indicatori di tipicità che comportano modificazioni desiderate.
3. Microrganismi patogeni, indicatori di salubrità (sicurezza al consumo), che causano malattie a trasmissione alimentare quali infezione, intossicazione e tossinfezione.
4. Infine, sono detti microrganismi alterativi coloro che svolgono attività deterioranti, determinando una perdita di qualità nella materia prima o nel prodotto finito.

Tra questi ultimi abbiamo: batteri coliformi, lieviti, muffe, batteri lattici eterofermentanti e batteri proprionici. Tali microrganismi non sono nocivi per la salute dell'uomo, ma quando sono presenti in elevate concentrazioni, causano alterazioni delle proprietà organolettiche del prodotto con: variazione di colore, texture e forma, accumulo di gas o formazione di schiuma, formazione di biofilm e di off-flavour. Comunque sia, per causare cambiamenti rilevanti, tali microrganismi devono raggiungere il cosiddetto "livello rilevabile di contaminazione", parametro che dipende dalla natura specifica dei microrganismi stessi e può variare da 10^6 a 10^8 cellule/g o mL di prodotto (Farris et al., 2016).

Il presente studio ebbe inizio in seguito a reclami dei consumatori riguardo sapori atipici in dolci da forno farciti con creme prodotti in un panificio industriale (Osimani et al., 2017).

L'industria della panificazione offre giornalmente sul mercato un ampio range di prodotti come pane, dolci ed altri prodotti. Dal punto di vista del consumatore, la qualità dei prodotti da forno può essere valutata in base ad odore, sapore e aspetto. I fattori che possono contribuire

alla produzione di prodotti di buona qualità sono la qualità delle materie prime, la tecnologia produttiva utilizzata e l'igiene dell'impianto (Marić et al., 2009).

I prodotti da forno possono essere ottenuti dalla miscela di ingredienti base quali farina, acqua, o altri liquidi ad uso alimentare autorizzati, e agenti lievitanti; inoltre, si possono utilizzare farciture addizionali, composte da vari ingredienti dolci o salati, inclusi frutta secca, sciroppi e creme (Osimani et al., 2017).

Le creme da farcitura ottenute da un mix di grassi cristallizzati con zucchero e altri ingredienti (es. cacao, cioccolato, vaniglia, frutta, etc.) possono essere usate in molti alimenti confezionati come biscotti e wafer o aggiunti ai prodotti da forno lievitati prima o dopo la loro cottura. Solitamente, a queste creme vengono aggiunti conservanti tra cui l'alcool, l'acido sorbico e l'acido benzoico (Marvig et al., 2014). Come nel caso di molti altri alimenti aventi alte concentrazioni di zucchero (40-70%), le creme da farcitura possono fornire un substrato ideale per i lieviti alterativi che sono capaci di tollerare condizioni di bassa a_w ed elevato stress osmotico presenti in questi prodotti (Martorell et al., 2007).

➤ Oggetto del nostro studio saranno i lieviti alterativi.

I lieviti sono costituiti da cellule eucariotiche unicellulari con morfologia eterogenea (sferiche, ellittiche, allungate) e si possono disporre singolarmente, in gruppo o andare a formare il cosiddetto pseudomicelio (cellule separate, non comunicanti). Per la crescita hanno un pH ottimale acido e valori di a_w minori rispetto ai batteri e maggiore rispetto alle muffe. Per quanto riguarda la temperatura, sono microrganismi per lo più mesofili o psicrotrofi, alcuni anche psicrofili, e non resistenti ai trattamenti termici di pastorizzazione. Sono aerobi facoltativi la cui via metabolica principale è rappresentata dalla respirazione, che porta ad una completa ossidazione del glucosio (Farris et al., 2016). Sono ubiquitari e si ritrovano in ambienti quali suoli, piante, acqua, animali e insetti (Salo e Wirtanen, 2005).

I lieviti di interesse alimentare sono per la maggior parte ascomiceti, asporigeni o sporigeni, conosciuti per il loro ruolo nella produzione di alimenti fermentati e del pane. Essi possono proliferare in un'ampia gamma di alimenti, quali: derivati del latte e della carne, zucchero, miele, frutta e vegetali, succhi, bevande analcoliche, bevande alcoliche e vino, marmellate e pane (Déak, 1991; Pitt e Hocking, 1997; Loureiro e Querol, 1999).

Dati raccolti da varie ricerche (Déak, 1991, 2007; Deák and Beuchat, 1996; Fleet, 1992; Tudor and Board, 1993) hanno permesso di arrivare alle conclusioni che delle circa 1500 specie di lievito riconosciute nell'attuale classificazione tassonomica, solo 100-150 sono di

solito isolate da cibi e bevande e solo il 10% di queste sono frequentemente implicate nella comparsa di alterazioni (Osimani et al., 2017).

In genere, gli alimenti non sono considerati veicoli di infezioni causate da lieviti, anche se sono stati riportati casi sporadici di gastroenteriti o reazioni allergiche nei quali si sospettava che i lieviti fossero gli agenti responsabili (Loureiro e Querol, 1999).

Tuttavia, una crescita abbondante di lieviti indesiderati durante la produzione di un alimento può comportare problemi di qualità e sicurezza con conseguenti perdite economiche significanti (Salo e Wirtanen, 2005). Gli effetti più comuni di tale alterazione sono: la produzione di off-flavours (es. amarezza); produzione di gas con discolorazione del prodotto e rigonfiamento del contenitore; cambiamenti di texture (es. formazione di sedimenti e crescita superficiale) (Loureiro e Querol, 1999).

Secondo Pitt e Hocking (1997) solo le specie di *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Debaryomyces hansenii*, *Kloeckera apiculata*, *Pichia membranoefaciens*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulopsis holmii*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Zygosaccharomyces bisporus* e *Zygosaccharomyces rouxii* sono quelle da ritenere significative come agenti alterativi, quando l'alimento non è prodotto seguendo la prassi delle buone norme igieniche di produzione.

I lieviti utilizzano i componenti degli alimenti come substrato di crescita trasformandoli in una vasta gamma di prodotti metabolici finali, con conseguente cambiamento delle proprietà chimico-fisiche e sensoriali dell'alimento stesso. Nello specifico, le specie alterative sono in grado di convertire gli zuccheri presenti nelle creme da farcitura in etanolo, composti volatili solforati e acidi organici (Fleet, 2011). Questi ultimi composti possono essere responsabili del cambio di acidità e del profilo aromatico del prodotto, con l'acido acetico avente il più grande impatto sensoriale (Radler et al., 1993).

Alcuni studi hanno indicato il deperimento da lieviti in prodotti ad alto contenuto di zucchero, inclusa la frutta candita, succhi di frutta concentrati, paste farcite, sciroppi e torrone (Martorell et al., 2007; Wang et al., 2016). In questi studi, sono stati valutati metodi per controllare la contaminazione microbica ambientale mediante l'uso di sanificanti specifici, mentre altre ricerche si sono concentrate sul monitoraggio dei lieviti alterativi durante il processo produttivo (Bubnová et al., 2014; Lanciotti et al., 1998; Martorell et al., 2005).

Le specie di lieviti tipicamente osmotolleranti appartengono ai generi *Debaryomyces*, *Pichia* e *Zygosaccharomyces* (Bubnová et al., 2014), il più comunemente associato al deterioramento di prodotti ad alto contenuto zuccherino. Inoltre, membri dei generi

Brettanomyces, *Candida*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* e *Torulopsis* sono da ben considerare come agenti alterativi quando gli alimenti non vengono prodotti nel rispetto delle buone norme di produzione (Salo e Wirtanen, 2005).

La contaminazione da lieviti nei prodotti ad alto contenuto di zucchero è ancora un problema irrisolto, specialmente in quei prodotti da forno in cui le creme da farcitura sono aggiunte dopo la cottura; tale contaminazione è particolarmente insidiosa in quanto alcuni lieviti sono capaci di formare biofilm sulle superfici da lavoro sia a temperature basse che elevate (Salo e Wirtanen, 2005).

Il biofilm è dato da una matrice biologicamente attiva con un elevato livello di organizzazione, dove cellule microbiche di uguale o diversa specie sono adese ad una superficie solida sulla quale trovano i nutrienti necessari per vivere e moltiplicarsi. Esso rappresenta sia un problema dal punto di vista tecnologico, che un rischio igienico-sanitario per l'eventuale presenza di microrganismi alterativi e/o patogeni e la diminuzione dell'efficacia dei disinfettanti convenzionali (Farris et al., 2016).

Nello specifico, le specie del genere *Zygosaccharomyces* sono lieviti sporigeni che si moltiplicano per gemmazione multilaterale. Le cellule sono prevalentemente aploidi, con morfologia sferoidale, ellipsoidale o elongata, e possibile formazione di pseudoife. Essi causano deterioramento di alimenti con elevata acidità (salse, ketchup, conserve sotto aceto, mostarde, maionese, condimenti per insalate). Nove specie appartenenti a questo genere presentano alcol-tolleranza, osmotolleranza ed alto vigore fermentativo, sono: *Z. bailii*, *Z. bisporus*, *Zygosaccharomyces cidri*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Zygosaccharomyces florentinus*, *Zygosaccharomyces mellis*, *Zygosaccharomyces microellipsoideus*, *Zygosaccharomyces mrakii* e *Z. rouxii*. La specie di *Z. bailii* è utilizzata in alimentare, soprattutto in enologia. Questo lievito è caratterizzato da un' elevata resistenza alla pressione osmotica che gli permette perciò di tollerare alte concentrazioni zuccherine. Inoltre, è resistente ad elevate dosi di anidride solforosa e all'alta gradazione alcolica ed è uno dei pochi lieviti che sopravvivono in assenza di ossigeno. (Farris et al., 2016).

Capitolo 1

SCOPO DEL LAVORO

Il seguente progetto di Tesi di Laurea si inserisce in uno studio realizzato con l'obiettivo di identificare la causa dei sapori atipici e quindi del deterioramento di dolci da forno farciti con creme, prodotti in un panificio industriale. In particolare, le creme da farcitura rappresentano un substrato ideale per la crescita di lieviti alterativi, capaci di tollerare condizioni di bassa attività dell'acqua e di elevato stress osmotico, caratteristiche dei prodotti in questione. Per tracciare i microrganismi alterativi dei dolci da forno, sono stati analizzati sette lotti di prodotti finiti tramite metodi coltura-dipendenti, quali conte vitali e isolamento, e coltura-indipendenti, quali la reazione a catena della polimerasi accoppiata all'elettroforesi su gel a gradiente denaturante (PCR-DGGE). Per identificare la fonte di contaminazione, le analisi sono state effettuate anche sulle materie prime e sui campioni ambientali delle diverse aree in cui è stato suddiviso lo stabilimento del panificio industriale (zona di miscelazione dell'impasto, stanza di lievitazione, zona cottura, zona farcitura) sulla base delle varie attività produttive.

Antecedentemente alle ricerche che verranno descritte in dettaglio nei capitoli successivi, sono state svolte alcune analisi da Osimani et al. (2017).

- ❖ Analisi microbiologiche sulla qualità dell'aria delle quattro aree di produzione del panificio prese in esame. Da tali analisi è emersa la presenza di lieviti, tra cui *S. cerevisiae*, *Aspergillus sydowii*, *Alternaria alternata*, e muffe, tra cui *Penicillium* spp. e *Cladosporium* spp.
- ❖ Analisi microbiologiche sulle superfici da lavoro. Dai tamponi effettuati sono state rilevate le specie *S. cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium citrinum*, *Arthrinium pterospermum*, *Clavispora lusitaniae*, *Cladosporium sphaerospermum* e *Mucor plumbeus*.
- ❖ Misurazione del pH di vari prodotti finiti e delle materie prime. I prodotti finiti hanno mostrato dei valori compresi tra $4,35 \pm 0,02$ e $5,89 \pm 0,01$.
- ❖ Analisi microbiologiche (conte vitali) su creme da farcitura e prodotti da forno. I risultati delle conte vitali sui prodotti cotti prima della farcitura hanno mostrato una

carica di lieviti $< 1 \log \text{ ufc g}^{-1}$ in tutti i lotti, mentre, dopo la farcitura, le conte vitali di lieviti eseguite sulla crema variavano da $1,40 \pm 0,01$ a $4,72 \pm 0,03 \log \text{ ufc g}^{-1}$.

- ❖ Ottenimento dei bulk cellulari dalle piastre utilizzate per le analisi microbiologiche sulle creme da farcitura.

Le ricerche effettuate nella presente Tesi di Laurea si focalizzano su:

- ❖ identificazione e caratterizzazione molecolare degli isolati ottenuti dalle analisi condotte da Osimani et al. (2017);
- ❖ analisi tramite PCR-DGGE del DNA fungino estratto dai bulk cellulari e dalle matrici ottenuti da Osimani et al. (2017);
- ❖ studio dell'efficienza di sette disinfettanti comunemente utilizzati nell'industria alimentare sui lieviti isolati dalle matrici in questione.

Capitolo 2

MATERIALE E METODI

2.1 Estrazione del DNA

❖ Il DNA fungino è stato estratto dai bulk cellulari preparati precedentemente da Osimani et al. (2017) e dalle colture pure di lieviti isolati dalle matrici (creme da farcitura) seguendo la metodica descritta da Makimura e collaboratori (1999).

Il materiale utilizzato comprende:

- bulk cellulari e isolati di lievito cresciuti in terreno Yeast Extract Peptone D-glucose (YEPD) modificato, composto da estratto di lievito (10 g L^{-1}); peptone (10 g L^{-1}); D-glucosio (20 g L^{-1}), Rosa Bengala (0.025 g L^{-1}); agar (17 g L^{-1}) e cloramfenicolo (100 mg L^{-1})
- micropipetta con puntali sterili;
- 30 microprovette Eppendorf contrassegnate;
- diluenti;
- centrifuga;
- sferette di vetro (glass beads);
- vortex + adattatore per microprovette;
- vaschetta con ghiaccio;
- cappa a flusso laminare;
- stufa.

Il protocollo di estrazione consiste nei passaggi sottoelencati.

1. Prelevare le cellule fungine (bulk cellulare o coltura pura) e sospendere nella microprovetta in cui abbiamo precedentemente posto $300 \mu\text{L}$ di TE ($1 \text{ mM EDTA} + 10 \text{ mM Tris-HCl}$ a pH 8.0).
2. Centrifugare a 14000 rpm per 3 min .
3. Risospendere il pellet in $30 \mu\text{L}$ di *DNA extraction buffer* ($0,1 \text{ M Tris-HCl}$ a pH 8,0 + 50 mM EDTA a pH 8,0 + $1\% \text{ SDS}^*$) in una microprovetta da $1,5 \text{ mL}$; inserire sferette di vetro fino occupare $\approx 2/3$ del contenuto della microprovetta.
4. Agitare al vortex per 1 min .

5. Porre nella vaschetta contenente il ghiaccio per 1 min.
6. Vortexare per altri 3 min.
7. Porre l'estratto cellulare in acqua bollente per 10 min al fine di denaturare le DNAsi.
8. Aggiungere alla sospensione: 20 μL di di Tris-HCl (1 M) + 1,5 μL di EDTA (0,5 M) + 50 μL di 10% SDS* (mescolare con la pipetta per staccare il pellet) + 200 μL di acetato di potassio (5 M) (rimescolare brevemente) per far precipitare le proteine, mantenendo in ghiaccio per 30 min.
9. Centrifugare a 14000 rpm per 10 min.
10. Prelevare 500 μL di surnatante ed aggiungere 500 μL di isopropanolo e trasferire in nuove provette.
11. Porre il campione a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 15 min.
12. Centrifugare a 14000 rpm per 10 min.
13. Eliminare il surnatante ed aggiungere 500 μL di etanolo al 70%.
14. Se il pellet si è staccato, centrifugare a 14000 rpm per 5 min.
15. Eliminare l'etanolo del lavaggio e lasciare asciugare le microprovette (senza tappo) a temperatura ambiente sotto cappa a flusso laminare per una notte.
16. Risospendere il pellet in 100 μL di tampone TE (Tris-EDTA), mescolando con la pipetta per agevolare il distacco.
17. Porre in stufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ per ≈ 30 min.
Conservare il DNA estratto a -20°C .

*SDS (Sodio Dodecil Solfato), solubilizzante.

❖ L'estrazione diretta del DNA microbico dalle creme da farcitura e dai prodotti da forno è stata effettuata utilizzando il PowerFood Microbial DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) secondo le istruzioni fornite dal produttore.

2.1.1 Quantizzazione spettrofotometrica del DNA estratto

Per valutare la quantità del DNA estratto, sono state svolte misurazioni ottiche a $\lambda = 260$ nm, utilizzando uno spettrofotometro Shimadzu UV-1800 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Nelle cuvetta in quarzo dal cammino ottico di 1 cm sono stati posti 5 μL di campione + 495 μL di acqua deionizzata sterile in modo da ottenere una diluizione 1:100.

Utilizzando delle cuvette in quarzo, a 1 unità di assorbimento (u.a.260) corrisponde una concentrazione di DNA pari a $50\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Dato questo, la concentrazione di DNA di ciascun estratto è stata calcolata utilizzando la seguente proporzione:

$$1:50 \mu\text{g mL}^{-1} = A_{260\text{nm}} : Y \mu\text{g mL}^{-1}$$

Moltiplicando il valore di $Y \mu\text{g mL}^{-1} \cdot 100$ (fattore di diluizione) si ottiene la concentrazione di DNA espressa in $\mu\text{g mL}^{-1}$ o $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$.

Dopo la lettura, i DNA estratti da tutti i campioni sono stati diluiti ad una concentrazione di $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$.

2.2 Analisi di PCR-DGGE

- ❖ Il DNA fungino (100 ng), estratto direttamente dalle matrici e i bulk cellulari è stato amplificato mediante PCR utilizzando il ciclatore termico MyCycler Thermal Cycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) in un volume finale di 25 μL . Per la PCR sono stati utilizzati i primers NL_{GC} e LS2 (Tabella 1), producendo un frammento di 240 nucleotidi del gene 26S dell'rRNA (Cocolin et al., 2000). Inoltre, il primer NL1 è stato addizionato da una GC clamp come proposto da Sheffield et al. (1989). La miscela e le condizioni per la PCR sono riportate nella Tabella 1 (Osimani et al., 2015).

I prodotti di PCR sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 1.5% (p/v) contenente 10 mg mL^{-1} di bromuro di etidio seguendo il metodo descritto da Osimani et al. (2015). La corsa elettroforetica è stata condotta ad un voltaggio di 6 V/cm per 45 minuti affiancando ai campioni il marcatore molecolare HyperLadder™ 100 bp (Bioline, Meridian Bioscience, London, UK) contenente una scala di DNA di dimensioni note. Gli ampliconi sono stati visualizzati agli UV ($\lambda = 260 \text{ nm}$) mediante transilluminatore ed il gel è stato fotografato impiegando il sistema COMPLETE PHOTO XT101 (Explera, Jesi, Ancona).

- ❖ L'analisi DGGE è stata eseguita con un sistema DCode verticale (Bio-Rad Laboratories) come descritto da Osimani et al. (2015). In dettaglio, aliquote di 20 μL dei prodotti di PCR ottenuti con i primers NL_{GC}-LS2 sono state addizionate di 4 μL di loading buffer e successivamente caricate su gel di poliacrilammide contenente un gradiente denaturante 30-60% (urea-formamide) crescente in direzione della elettroforesi (Osimani et al., 2017). La corsa elettroforetica è stata eseguita a 130 V per 4,5 ore. Terminata la corsa, il gel è stato rimosso dai vetri e lasciato in colorazione per circa 10 minuti in 300 mL di TAE 1X (0.04 mol L^{-1} Tris-acetato; 0.001 mol L^{-1} EDTA) addizionato di 30 μL di SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain 1X (Lonza,

USA). Al termine, il gel è stato visualizzato agli UV mediante transilluminatore ed è stato fotografato impiegando il sistema COMPLETE PHOTO XT101 (Explera).

- ❖ Le bande della DGGE sono state tagliate dai gel, il DNA è stato eluito in 50 μL di acqua deionizzata per tutta la notte a 4 $^{\circ}\text{C}$ e in seguito amplificato sotto le stesse condizioni descritte precedentemente, ma utilizzando il primer NL1 senza il GC clamp. Gli ampliconi della PCR sono stati spediti al Beckman Coulter Genomics (London, UK) per la purificazione e il sequenziamento. Le sequenze sono state comparate con quelle depositate nel GenBank DNA database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) attraverso il Basic Local Alignment Search Tool (Altschul et al., 1990).

2.3 Isolamento e identificazione molecolare dei lieviti

- ❖ Il 10% delle colonie di lieviti cresciute nelle piastre contenenti YEPD agar modificato sono state selezionate in base alla loro morfologia, isolate e successivamente purificate mediante strisci di purificazione. La morfologia delle cellule è stata osservata con un microscopio ottico (x100) e il DNA è stato estratto come descritto nel paragrafo 2.1 (Makimura et al., 1999). La quantità del DNA estratto è stata accertata con analisi spettrofotometrica come sopra descritto. Gli isolati di lievito sono stati conservati a -80 $^{\circ}\text{C}$ in una miscela di glicerolo-YEPD in rapporto 1:1 (Osimani et al., 2017).
- ❖ Il DNA estratto dalle colture pure di lieviti isolati dalle matrici è stato amplificato come descritto precedentemente utilizzando il primer NL1 privo di GC clamp. Gli isolati sono stati soggetti a identificazione molecolare mediante sequenziamento di una porzione della regione del gene 26S dell'rRNA seguendo il protocollo descritto precedentemente (paragrafo 2.2.). Dato che il sequenziamento di questa regione del gene 26S dell'rRNA non ha permesso un'identificazione inequivocabile, il DNA estratto dagli isolati è stato ulteriormente amplificato mediante PCR utilizzando i primer degenerati fRPB2-5F e fRPB2-7cR (Tab. 1), disegnati per amplificare circa 1200 nucleotidi della regione 5-7 della seconda più ampia subunità (RPB2) della RNA polimerasi II (Liu et al., 1999). Il DNA stampo (100 ng) è stato amplificato in un volume di reazione di 50 μL contenente 1,25 U della Taq DNA polimerasi (SibEnzyme Ltd, Novosibirsk, Russia), 1X buffer, 0,2 mmol L^{-1} dNTPs e 0,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ di ogni primer, utilizzando il programma ciclico riportato in Tab. 1.

- ❖ I prodotti della PCR sono stati purificati e sequenziati come sopra descritto (paragrafo 2.2.). Gli isolati sono stati identificati attraverso ricerche nel GenBank DNA database utilizzando l'Algorithm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul et al., 1990).

2.4 Tipizzazione molecolare dei lieviti

Per la tipizzazione molecolare dei lieviti è stata svolta l'analisi RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) utilizzando i primer M13 e OPA02 come descritto nella Tab. 1 (Osimani et al., 2015).

Nella Tab. 2 sono, invece, riportate le miscele per le PCR.

Il DNA genomico (100 ng) è stato sottoposto alla PCR in un volume di reazione pari a 25 μ L (4 μ L di DNA + 21 μ L di mix). Successivamente, ogni prodotto della PCR (10 μ L) è stato analizzato mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2.5% (p/v) come descritto da Osimani et al. (2015). I profili elettroforetici di tutti isolati ottenuti sia con il primer M13 che con il primer OPA2, sono stati visualizzati agli UV ($\lambda = 260$ nm) mediante transilluminatore e fotografati utilizzando il sistema COMPLETE PHOTO XT101 (Explera). I profili della RAPD sono stati sottoposti all'analisi dei cluster utilizzando il software Phoretix 1D, versione 11.4 (Nonlinear Dynamics, Durham, NC, USA) come descritto da Osimani et al. (2015).

Tabella 1: Primer utilizzati e condizioni di PCR

Primer		Condizioni di PCR			
Nome	Sequenza	Denaturazione iniziale	Ciclo	N° cicli	Estensione finale
NL1gc	5'-GCCATATCAATAAGCGGAAAAG-3'	95°C per 5 min	D: 95°C, 1 min A: 52°C, 45 sec E: 72°C, 1 min	30	72°C per 7 min
LS2	5'-ATTCCCAAACAACCTCGACTC-3'				
fRPB2-5F	5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3'	95°C per 5 min	D: 95°C, 1 min A: 55°C, 2 min E: 72°C, 2 min	30	72°C per 10 min
fRPB2-7cR	5'-CCCATRGCTTGYYTTRCCCAT-3'				
M13	5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'	94°C per 5 min	D: 94°C, 1 min A: 45°C, 1 min E: 72°C, 2 min	40	72°C per 5 min
OPA02	5'-TGCCGAGCTG-3'	94°C per 5 min	D: 94°C, 1 min A: 45°C, 1 min E: 72°C, 2 min	40	72°C per 10 min

D = denaturazione; A = annealing; E = estensione

Tabella 2: Miscela per PCR con primer M13 e OPA02

	Ci	Cf	Vf (µL)
Buffer	10x	1x	2.5
MgCl₂	25 mM	1,5 mM	1.5
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0.5
M13	10 µM	2 µM	5
Taq-polimerasi*	5 U/µL	0,625 U/25 µL	0,125
H₂O sterile	-	-	11.38

	Ci	Cf	Vf (µL)
Buffer	10 x	1x	2,5
MgCl₂	25 mM	3 mM	3
dNTPs	10 mM	0,2 mM	0.5
OPA02	10 µM	4 µM	10
Taq-polimerasi*	5 U/µL	0,625 U/25 µL	0,125
H₂O sterile	-	-	4.88

* SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

2.5 Suscettibilità dei lieviti ai disinfettanti

Sette disinfettanti commerciali (denominati D1, D2, D3, D4, D5, D6 e D7) comunemente utilizzati nell'industria alimentare sono stati studiati per la loro efficienza contro lieviti isolati dalle matrici. Essi sono stati forniti dal panificio sotto esame, da un impianto di catering collettivo e da un grande distributore di generi alimentari. Più specificamente, il disinfettante D3, costituito per il 10% di alchil dimetil benzil ammonio cloruro e utilizzato al 0,5% di concentrazione, era quello impiegato dal panificio durante la produzione di tutti i lotti sottoposti allo studio.

Nella Tab. 3 sono elencati i composti antimicrobici testati e le rispettive concentrazioni usate.

Tabella 3: Disinfettanti commerciali codificati testati contro gli isolati di lievito

Disinfettanti	Composizione*	Concentrazione usata*
D1	20–30% alcool isopropilico; 0,005% didecil dimetil ammonio cloruro	100%
D2	30–50% alcool isopropilico	100%
D3	10% alchil dimetil benzil ammonio cloruro	0,5%
D4	<25% etanolo; <0,5% didecil dimetil ammonio cloruro	25%
D5	3% cloro attivo	1%
D6	1,5% alchil dimetil benzil ammonio cloruro	100%
D7	0,5–0,6 benzalconio cloruro; 9–14% alcool isopropilico	100%

*Le composizioni e le concentrazioni usate sono basate su informazioni fornite dai produttori

La preparazione delle diluizioni per ottenere date concentrazioni dei disinfettanti è stata svolta all'inizio di ogni test per prevenire una qualsiasi evaporazione dei composti attivi e la conseguente perdita di efficacia (Osimani et al., 2017).

In totale sono stati testati 21 isolati.

❖ Materiale utilizzato per testare 1 campione:

- provetta contenente il campione in brodocoltura;
- 7 provette contenenti 9 mL di ciascuno dei 7 disinfettanti;
- provetta contenente 9 mL di Dey/Engley (D/E) brodo neutralizzante;
- provetta contenente 9 mL di acqua peptonata setrile;
- pipetta e micropipetta automatica con puntali sterili;
- piastra Petri contenente terreno di coltura YEPD modificato;
- spatola di vetro;
- becco Bunsen;
- cronometro.

Tutte le provette (vuote), provviste di tappo, sono state sterilizzate in autoclave a 121°C per 15 minuti prima di essere utilizzate.

❖ La suscettibilità degli isolati di lievito ai disinfettanti è stata comprovata seguendo la metodologia di Salo e Wirtanen (2005) ed è illustrata schematicamente nella Fig. 1.

1. Con l'ausilio della pipetta, prelevare 1 mL di brodocoltura (dopo 16–18 h di crescita) ed inoculare in 9 mL della soluzione acquosa della formulazione disinfettante per ottenere all'incirca 5–6 log ufc mL⁻¹; far partire il cronometro.
2. Dopo un'esposizione a 20°C per 5 min, trasferire 1 mL campione in 9 mL di D/E brodo neutralizzante (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).
3. Dalla soluzione neutralizzata prelevare 1 mL e diluire in 9 mL di acqua peptonata sterile.
4. Con la micropipetta, prelevare 0.1 mL di campione così diluito e seminare mediante spatolamento nel mezzo YEPD modificato entro 15–30 min dal trattamento.
5. Infine, procedere con un'incubazione a 25 °C per 4-5 giorni.

Ad ogni passaggio è necessario cambiare il puntale della pipetta per evitare contaminazioni.

Il lavoro è stato svolto in un microambiente sterile creato da un becco bunsen e la parte superiore delle provette è stata passata sopra la fiamma prima e dopo la loro apertura.

Il test della sospensione è stato eseguito in doppio per ogni isolato.

L'analisi statistica della varianza (ANOVA) è stata effettuata per testare i) l'effetto dei disinfettanti contro i lieviti e ii) la suscettibilità di isolati ai disinfettanti, utilizzando JMP, versione 11.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Il valore $P > 0,0001$ era considerato non significativo.

I risultati, riportati in Tab. 5, sono stati espressi come effetti microbici basati sulla sopravvivenza relativa ad appropriati controlli esposti a soluzione salina (Osimani et al., 2017).

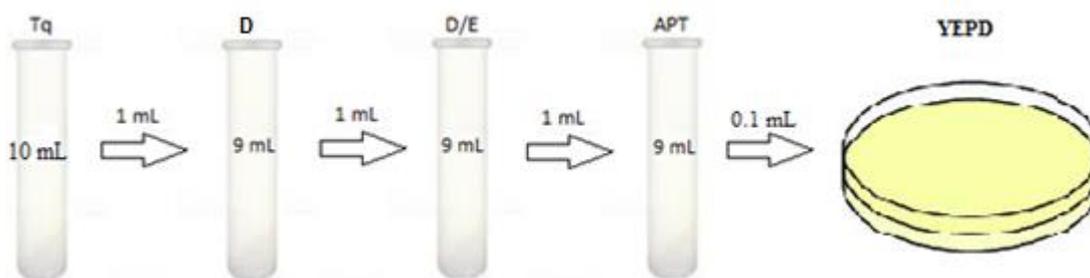


Figura 1: Schema di allestimento della prova di suscettibilità ai disinfettanti

Tq, Tal quale; D, disinfettante; D/E, Dey/Engley brodo neutralizzante; APS, acqua peptonata sterile, YEPD, Yeast Extract Peptone D-glucose.

Capitolo 3

RISULTATI E DISCUSSIONE

I risultati delle conte vitali realizzate in precedenza da Osimani et al. (2017) sui prodotti cotti prima della farcitura hanno mostrato la carica di lieviti $< 1 \log \text{ufc g}^{-1}$ in tutti i lotti. In seguito alle analisi microbiologiche svolte sui prodotti dopo la farcitura, invece, le conte vitali di lieviti eseguite sulla crema variavano da $1,40 \pm 0,01$ a $4,72 \pm 0,03 \log \text{ufc g}^{-1}$ (Tab. 4). Le differenze di contaminazione rilevate nelle porzioni di crema analizzate potrebbero essere dovute a due principali cause (Osimani et al., 2017):

- i. diversi livelli di contaminazione iniziale;
- ii. il tempo intercorso tra la produzione e l'analisi dei prodotti finiti (il quale variava da 6 mesi a pochi giorni, a seconda del giorno di produzione), durante il quale i lieviti contaminanti potevano moltiplicarsi.

Dalle analisi di PCR-DGGE (Fig. 2) del DNA estratto direttamente dalle matrici (creme da farcitura) e dai bulk cellulari (piastre sia in alta che in bassa diluizione), *Zygosaccharomyces bailii sensu lato* è risultato essere ubiquitario (Tab. 4).

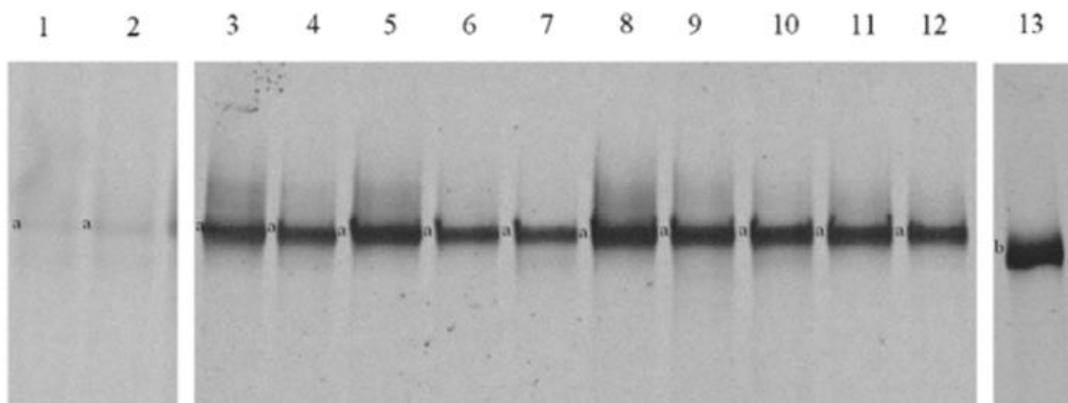


Figura 2. Profili PCR-DGGE dei lieviti presenti nelle creme da farcitura ottenuti con i primer NL_{1GC} e LS2. Le bande indicate in lettere sono state asportate, riamplicate e soggette a sequenziamento. a, *Zygosaccharomyces sensu lato*; b, *Saccharomyces cerevisiae*;

1, il profilo DGGE del DNA estratto direttamente dalla crema al cioccolato; 2, il profilo DGGE del DNA estratto direttamente dalla crema alla vaniglia; 3-12, i profili DGGE del DNA estratto dai bulk cellulari (3-6, lotto B2; 7-8, lotto B3; 9-10, lotto B4; 11-12, lotto B5); 13, il profilo DGGE del DNA estratto direttamente da bulk cellulare ottenuto dalle conte vitali eseguite su panetto di lievito di birra.

Tabella 4: Conte microbiche e risultati del sequenziamento delle bande asportate dal gel della DGGE applicata alle creme dei prodotti cotti farciti

Lotto	Crema	Giorni di conservazione	*a	pH	Conte (log ufc g ⁻¹)	Identificazione	% Identità	*b
B1	Vaniglia	210	-	5,08 ± 0,01	< 1	ND	ND	ND
B1	Vaniglia	210	-	5,10 ± 0,01	< 1	ND	ND	ND
B2	Cioccolato	150	+	4,37 ± 0,03	3,48 ± 0,02	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B2	Cioccolato	150	+	4,40 ± 0,03	3,07 ± 0,01	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B2	Cioccolato	150	+	4,37 ± 0,02	3,64 ± 0,01	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B2	Cioccolato	150	+	4,41 ± 0,02	3,28 ± 0,05	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B3	Vaniglia	120	+	5,17 ± 0,01	3,46 ± 0,02	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B3	Vaniglia	120	+	5,15 ± 0,01	3,11 ± 0,02	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B4	Cioccolato	60	+	4,35 ± 0,02	4,72 ± 0,03	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B4	Cioccolato	60	+	4,38 ± 0,02	4,23 ± 0,05	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B5	Cioccolato	0	+	5,30 ± 0,01	2,11 ± 0,02	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B5	Cioccolato	0	+	5,32 ± 0,01	1,40 ± 0,01	<i>Z. bailii sensu lato</i>	99%	FJ914902 ^T
B6	Vaniglia	0	-	5,50 ± 0,01	< 1	ND	ND	ND
B6	Vaniglia	0	-	5,48 ± 0,02	< 1	ND	ND	ND
B7	Cioccolato	0	-	5,89 ± 0,01	< 1	ND	ND	ND
B7	Cioccolato	0	-	5,87 ± 0,01	< 1	ND	ND	ND

I risultati di pH e delle conte vitali sono espressi come il valore medio ± deviazione standard. Per i lotti B1, B3, B4, B5, B6 e B7 sono stati analizzati due campioni, mentre per il lotto B2 sono stati analizzati quattro campioni.

*a, Alterazione: +, crema presenta alterazione; -, crema non presenta alterazione.

*b, Numero di accesso della sequenza depositata nel Genbank con la maggiore % di similarità rispetto alla sequenza analizzata tramite BLAST.

^T, Ceppo Tipo (Type Strain); ND, non determinato.

Riguardo l'identificazione univoca di *Z. bailii* e specie affini possono esserci alcuni problemi (Suh et al., 2013). Ad esempio, il sequenziamento della regione del gene 26S dell'rRNA con i primer NL1 e LS2 non permette un'identificazione univoca a livello di specie del DNA exciso dai gel della DGGE. Infatti, l'analisi BLAST ha mostrato il 99% di similarità con le sequenze depositate in GenBank di *Z. bailii* e *Zygosaccharomyces parabailii*. Per questo motivo è stata adottata la designazione di *Z. bailii sensu lato* (Osimani et al., 2017).

Le specie appartenenti al genere *Zygosaccharomyces* sono tra i principali agenti alterativi in bevande e alimenti in quanto capaci di adattarsi ad elevate concentrazioni di glucosio e di crescere a bassi pH ed in presenza di alti livelli di conservanti come il sorbato di potassio usato nella formulazione delle creme da farcitura sotto osservazione (Merico et al., 2003). Come risultato delle loro particolari caratteristiche fisiologiche, le specie *Z. bailii*, *Z. rouxii* e *Zygosaccharomyces lentus* sono solitamente associate al deterioramento di prodotti ad alto contenuto zuccherino, quali il miele, lo sciroppo e i succhi di frutta concentrati (Wang et al., 2016). *Z. bailii*, il quale resiste ai conservanti e tollera acidi ed etanolo, e *Z. rouxii* che tollera concentrazioni molto alte di zucchero e sale e resiste ai conservanti, causano alterazione fermentativa in succhi di frutta, concentrati di frutta e sciroppi, salse, bevande alcoliche e frutta secca (Fleet, 2011).

Recentemente sono state segnalate due nuove specie, *Zygosaccharomyces parabailii* e *Zygosaccharomyces pseudobailii*, strettamente imparentate con *Z. bailii* (Merico et al., 2003).

Vari studi (Wag et al., 2016; Smith et al., 2004; Vermeulen et al., 2012) hanno classificato gli effetti del deterioramento causati dalle specie appartenenti al genere *Zygosaccharomyces*, riportando:

- crescita visibile sulla superficie del prodotto;
- fermentazione manifestata dalla presenza di alcool o altri tipi di metaboliti che conferiscono odori e/o tracce visibili di produzione di gas, portando alla formazione di bollicine nel prodotto e/o espansione del "packaging" flessibile.

Sulla superficie di alimenti solidi, i lieviti diventano visivamente evidenti come colonie individuali, o come un film di biomassa opaca, secca o appiccicosa, che può causare decolorazione, mentre nei liquidi la loro crescita è evidenziata dalla comparsa di un biofilm che ricopre o galleggia sulla superficie del prodotto, o dalla torbidità e sedimentazione delle cellule all'interno del prodotto (Fleet, 2011).

Nel presente studio, non è stata notata alcuna alterazione visibile del prodotto; per di più, nessuno dei campioni dei lotti indagati ha mostrato alterazioni del packaging o formazione di gas. Questo è probabilmente dovuto alla piccola quantità (circa 40 g) di farcitura contenuta nei prodotti cotti (Osimani et al., 2017).

I risultati delle analisi microbiologiche e della PCR-DGGE ottenuti dal panetto di lievito di birra hanno mostrato *S. cerevisiae* come unico lievito presente (Fig. 2).

Riguardo i due lotti di crema di farcitura (cioccolato e vaniglia) prelevata da barattoli integri utilizzati per la produzione dei lotti da B3 a B7, non è stata osservata nessuna crescita microbica sulle piastre contenenti YEPD modificato. Nonostante ciò, l'analisi PCR-DGGE del DNA estratto direttamente dalle matrici ha mostrato la presenza di bande attribuibili a *Z. bailii sensu lato* (Fig. 2). Questa scoperta può essere dovuta alla presenza di DNA di cellule morte di lieviti dopo il trattamento di pastorizzazione delle creme. Durante lo studio, nessun lotto di crema utilizzato per la produzione di prodotti da forno dei lotti B1 e B2 era disponibile (Osimani et al., 2017).

La presenza di *Z. bailii sensu lato* non era mai stata individuata nell'ambiente del panificio, ciò indica che, durante il periodo dello studio, *Z. bailii sensu lato* non era diffuso. Quindi, la fonte di contaminazione è rimasta incerta (Osimani et al., 2017).

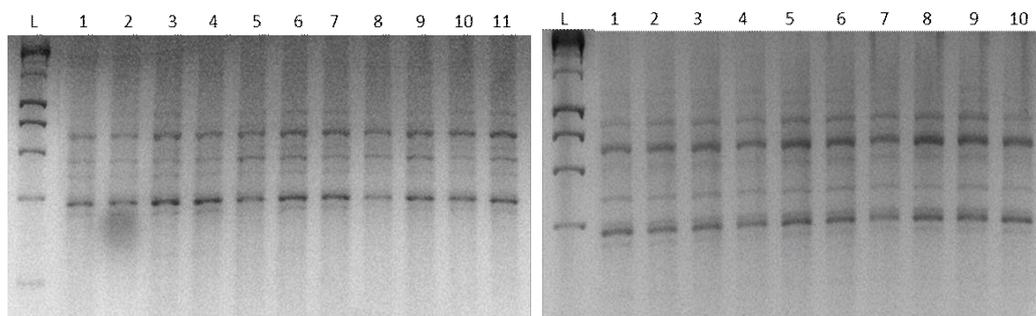
In base ai risultati delle analisi, le fonti di contaminazione delle creme da farcitura possono essere solo ipotizzate. Infatti, durante lo studio, le strutture di produzione erano già state sottoposte ad una sanificazione completa con candeggina. Nonostante ciò, la presenza di DNA fungino appartenente a *Z. bailii sensu lato* nei barattoli chiusi delle creme getta un'ombra sulla qualità della stessa, suggerendo che la contaminazione dei prodotti e dell'ambiente potrebbe risultare dal fatto che lotti precedenti potevano essere contaminati in seguito ad una pastorizzazione non corretta (Osimani et al., 2017).

Per caratterizzare al meglio i lieviti causa di alterazione, 21 isolati ottenuti dalle creme da farcitura sono stati soggetti di identificazione (sequenziamento e analisi BLAST) e tipizzazione (analisi RAPD) molecolare. I risultati del sequenziamento di una porzione della regione del gene 26S dell'rRNA, utilizzando i primer NL1 e LS2, anche se hanno confermato i risultati delle analisi PCR-DGGE riguardo la presenza di *Zygosaccharomyces* nelle creme, non hanno permesso l'identificazione inequivocabile degli isolati a livello di specie. Quindi, è stato utilizzato un nuovo set di primer (fRPB2-5F e fRPB2-7cR). L'allineamento delle sequenze della regione 5-7 della seconda più grande subunità (RPB2) degli ampliconi del gene della RNA polimerasi II dei 21 isolati con quelli pubblicati per le specie *Z. bailii* è risultato in identità del 99% per tutti gli isolati.

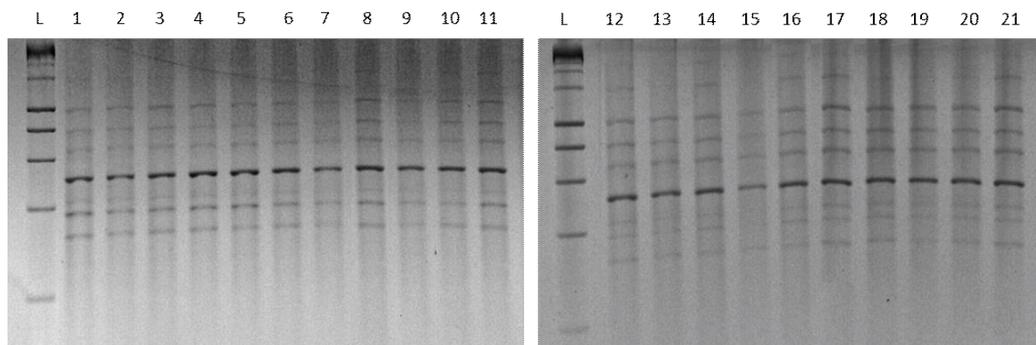
I risultati dell'analisi RAPD sono mostrati nella Figura 3. Inoltre, le impronte ottenute sono state sottoposte ad analisi dei cluster UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), formando un unico cluster con la similarità del 100% tra isolati, indicando così l'assenza di biotipi diversi (dati non mostrati) (Osimani et al., 2017).

Figura 3. I profili ottenuti dalla analisi RAPD utilizzando il primer M13 (panel A) e OPA2 (panel B)

A)



B)



L, marcatore molecolare; 1-21, isolati di *Zygosaccharomyces bailii* (Z1-Z21)

L'importanza economica di *Zygosaccharomyces* spp. come organismo alterativo fa dell'identificazione rapida una priorità perchè una decisione consapevole sulle procedure di pulizia può essere presa solo dopo la definizione degli agenti causanti (Hulin et al., 2014).

Per ottimizzare le procedure di pulizia e sanificazione, i 21 isolati sono stati ulteriormente testati per la loro suscettibilità nei confronti di sette disinfettanti commerciali e detergenti comunemente utilizzati nell'industria alimentare (Osimani et al., 2017). Nella Tab. 5 sono riportate le conte microbiche risultato della crescita in YEPD dopo il test di suscettibilità.

Tabella 5: Risultati di test di suscettibilità di isolati di *Zygosaccharomyces bailii* (Z1-Z21) ai disinfettanti (D1-D7). I risultati sono espressi come il valore medio (log ufc mL⁻¹) ± deviazione standard.

Isolato	Controllo	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
Z 1a	8,46 ± 0,21	3,30 ± 0,13	< 3	3,00 ± 0,60	3,95 ± 0,46	< 3	< 3	< 3
Z 1b	8,18 ± 0,21	3,48 ± 0,13	< 3	3,85 ± 0,60	3,30 ± 0,46	< 3	< 3	< 3
Z 2a	8,36 ± 0,04	< 3	< 3	3,80 ± 0,05	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 2b	8,41 ± 0,04	< 3	< 3	3,73 ± 0,05	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 3a	8,36 ± 0,62	< 3	< 3	3,00 ± 0,66	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 3b	7,48 ± 0,62	< 3	< 3	3,93 ± 0,66	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 4a	8,34 ± 0,06	< 3	< 3	3,95 ± 0,02	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 4b	8,42 ± 0,06	< 3	< 3	3,92 ± 0,02	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 5a	8,57 ± 0,90	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 5b	7,30 ± 0,90	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 6a	8,23 ± 0,16	< 3	< 3	3,00 ± 0,21	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 6b	8,00 ± 0,16	< 3	< 3	3,30 ± 0,21	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 7a	8,26 ± 0,02	< 3	< 3	3,30 ± 0,13	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 7b	8,23 ± 0,02	< 3	< 3	3,48 ± 0,13	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 8a	8,30 ± 0,01	< 3	< 3	3,54 ± 0,38	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 8b	8,32 ± 0,01	< 3	< 3	3,00 ± 0,38	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 9a	8,20 ± 0,25	< 3	< 3	3,30 ± 0,03	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 9b	7,85 ± 0,25	< 3	< 3	3,26 ± 0,03	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 10a	7,70 ± 0,32	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 10b	8,15 ± 0,32	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 11a	7,00 ± 0,34	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 11b	7,48 ± 0,34	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 12a	7,70 ± 0,14	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 12b	7,90 ± 0,14	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 13a	7,48 ± 0,09	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 13b	7,60 ± 0,09	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 14a	8,00 ± 0,21	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 14b	7,70 ± 0,21	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 15a	7,90 ± 0,14	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 15b	7,70 ± 0,14	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 16a	8,26 ± 0,18	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 16b	8,00 ± 0,18	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 17a	7,85 ± 0,38	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 17b	8,38 ± 0,38	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 18a	7,30 ± 0,55	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 18b	8,08 ± 0,55	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 19a	8,04 ± 0,21	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 19b	8,34 ± 0,21	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3	< 3
Z 20a	8,15 ± 0,02	< 3	< 3	< 3	< 3	3,78 ± 0,13	< 3	< 3
Z 20b	8,18 ± 0,02	< 3	< 3	3,00 ±	< 3	3,60 ± 0,13	< 3	< 3
Z 21a	8,00 ± 0,27	< 3	< 3	3,48 ± 0,13	< 3	4,42 ± 0,24	< 3	< 3
Z 21b	8,38 ± 0,27	< 3	< 3	3,3 ± 0,13	< 3	4,08 ± 0,24	< 3	< 3

I test in sospensione per la valutazione dell'attività fungicida dei disinfettanti richiedono una riduzione di 4 unità logaritmiche delle cellule affinché gli agenti testati potessero essere riconosciuti come efficaci (Salo e Wirtanen., 2005).

Tra i sette disinfettanti testati, l'ANOVA ha mostrato una significativa più bassa efficacia sugli isolati da parte di quello utilizzato dal panificio (D3) se confrontato con gli altri disinfettanti, con una riduzione media di $3,9 \pm 1,51 \log \text{ ufc mL}^{-1}$. Tuttavia, tutti i disinfettanti testati hanno raggiunto la soglia di riduzione di 4 unità logaritmiche (Fig. 4A).

Tra i 21 isolati, l'ANOVA ha mostrato differenti risposte ai disinfettanti da parte degli isolati. In particolare, l'isolato z1 ha mostrato i più alti valori di $\log \text{ ufc mL}^{-1}$ di cellule sopravvissute ai trattamenti rispetto agli altri isolati. D'altra parte, gli isolati z5, z11, z12, z13, z15, z16, z17 e z19 hanno mostrato la più alta suscettibilità ai disinfettanti (Fig. 4B).

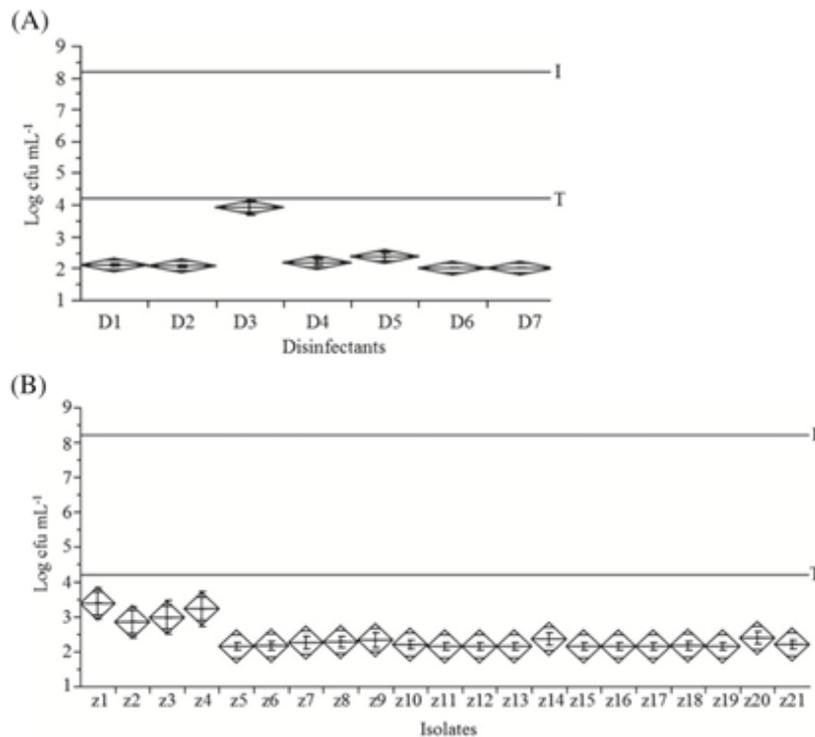


Figura 4: ANOVA eseguita per testare i seguenti principali effetti: disinfettanti (A) e isolati di *Zygosaccharomyces bailii* (B). I disinfettanti sono stati codificati come riportati nella Tabella 3. Le differenze sono state considerate non significative a $P > 0.0001$. I, valore medio iniziale della conte dei lieviti ($8,2 \log \text{ ufc mL}^{-1}$). T, soglia dell'effetto microbica ($4,2 \log \text{ ufc mL}^{-1}$). La soglia dell'effetto microbica è stata fissata ad una riduzione di 4 unità log delle cellule di lievito. Ogni diamante rappresenta la media di ogni conta; la linea attraverso ogni diamante rappresenta la media delle conte; l'altezza di ogni diamante rappresenta il 95% dell'intervallo di confidenza per ogni conta; la larghezza del diamante rappresenta la dimensione del campione.

Dalle informazioni in possesso, pochi studi recenti hanno riportato dati sulla resistenza di *Z. bailii* o altri lieviti ai disinfettanti. I risultati del test di suscettibilità ai disinfettanti degli isolati di *Z. bailii* hanno confermato l'efficacia dei composti a base d'alcool (D1, D2, D4 e D7) contro le cellule vegetative in stato planctonico, come precedentemente evidenziato da Salo e Wirtanen (2005). Circa i disinfettanti a base di cloro, Salo e Wirtanen (2005), hanno suggerito che questi possono essere meno efficaci nel distruggere le cellule di lievito in stato planctonico. Comunque, i disinfettanti a base di cloro (D3, D5 e D6) testati nel presente studio si sono dimostrati essere efficaci contro le cellule di lievito planctoniche, sebbene il D3 fosse il composto meno efficace tra tutti.

La prevenzione dell'alterazione richiede buone pratiche di produzione, inclusa l'applicazione dei principi dell'HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), altri programmi di gestione della qualità e buone pratiche igieniche. Dato che molti lieviti crescono bene a basse temperature, la refrigerazione non previene l'alterazione, rallenta solo la sua comparsa. L'alterazione da lieviti può presentarsi ad ogni stadio della catena produttiva, dal campo al prodotto finale confezionato, perciò la loro contaminazione deve essere eliminata nelle materie prime e gli ingredienti utilizzati per la produzione degli alimenti attraverso l'adozione di appropriate specifiche. Se possibile, gli ingredienti dovrebbero essere trattati termicamente per uccidere ogni organismo contaminante (Fleet, 2011).

Per quanto riguarda la contaminazione ambientale, una pulizia efficace e la sanificazione della strumentazione e delle linee di produzione è un'altra richiesta basilare per eliminare la contaminazione da lieviti, insieme all'uso di appropriati detergenti e disinfettanti. Quanto alla sanificazione delle superfici sotto studio, data la provata efficacia dei disinfettanti, si sospetta che la contaminazione dei lotti di prodotti cotti possa essere data da un'inadempienza del tempo di contatto dei disinfettanti utilizzati dallo staff del panificio, che porta alla contaminazione incrociata tra le materie prime (creme per la farcitura) e le superfici impropriamente sanificate. Perciò, l'adeguata formazione del personale è di fondamentale importanza e potrebbe essere il fattore chiave che può influenzare positivamente o negativamente la produzione di alimenti di buona qualità (Osimani et al., 2017).

CONCLUSIONI

L'igiene degli alimenti è garantita seguendo un approccio sia di tipo ispettivo, applicato al prodotto, che di tipo preventivo, applicato ai processi (HACCP). Per garantire la salubrità di un alimento, ovvero per renderlo sicuro ai fini del consumo, bisogna che esso sia privo di pericoli (chimici, fisici e/o biologici). Risulta altresì indispensabile assicurare una costante qualità sensoriale che contribuisce a definire la qualità globale di un alimento.

Per assicurare una conformità dei prodotti finiti alle dovute specifiche, il monitoraggio periodico deve far parte di una strategia globale per gestire l'alterazione causata da lieviti, e altresì devono essere utilizzati metodi attendibili e sensibili per il rilevamento dei lieviti (Fleet, 2011).

Una corretta prassi igienica è il fattore più importante nella prevenzione del deterioramento microbiologico degli alimenti. Studi precedenti hanno dimostrato che la contaminazione delle materie prime ed un'impropria sanificazione dell'attrezzatura utilizzata durante la produzione e dei container per il trasporto possono favorire fenomeni di contaminazione fungina degli alimenti (Storgårds et al., 1997; Juvonen et al., 2001; Wirtanen e Juvonen, 2002).

Le pubblicazioni scientifiche disponibili riguardanti la suscettibilità dei lieviti isolati da alimenti nei confronti di vari agenti chimici utilizzati nell'industria alimentare sono poche e sono concentrate solo su alcune specie di lieviti, processi produttivi o sanificanti. Una maggiore informazione circa l'efficacia di vari agenti igienizzanti e disinfettanti contro i lieviti alterativi è necessaria affinché si possano scegliere i più adatti per la decontaminazione dell'attrezzatura e degli utensili in caso di presenza di tali microrganismi (Salo e Wirtanen, 2005).

I risultati della presente tesi suggeriscono che agenti antimicrobici a base alcolica si sono dimostrati i più efficaci nella decontaminazione di tali ceppi di lievito in stato planctonico. Dalla letteratura scientifica emerge inoltre che gli agenti antimicrobici a base di persolfati e acido solfamminico, invece, risultano meno idonei ai trattamenti per rimuovere la

contaminazione fungina. I test di sospensione si dimostrano utili per definire il disinfettante più efficace nell'uccidere i lieviti contaminanti isolati dal processo produttivo.

Inoltre, in uno studio condotto da Bundgaard e Nielsen (1996) si è dimostrato che le ascospore sopravvivevano bene ad un trattamento con sanificante al 70% d'alcool e la loro resistenza aumentava man mano che invecchiavano.

Il controllo del deperimento da lieviti in alimenti e bevande dipende in genere dal mantenimento delle condizioni chimico-fisiche che prevengono la crescita di questi organismi: basse temperature, basso pH, alte concentrazioni di zucchero o sale e aggiunta di conservanti chimici. Tuttavia, la continua esposizione a tali stress offre alle cellule di lievito un'opportunità di adattamento e acquisizione di resistenza allo stress. La spiccata osmotolleranza delle specie di *Zygosaccharomyces* dovuta all'adattamento è stata dimostrata da Martorell et al. (2007).

L'abilità dei lieviti di resistere e sviluppare resistenza alla barriera del processamento degli alimenti pone una grande sfida alla prevenzione dell'alterazione. Di conseguenza, è importante capire i meccanismi biologici che controllano tali risposte. I lieviti reagiscono velocemente ai cambiamenti dell'ambiente esterno con una variazione del comportamento metabolico e fisiologico al fine di tollerare le nuove condizioni (Fleet, 2011).

Nell'industria alimentare, un'efficiente pulizia e sanificazione della strumentazione e delle linee di lavorazione rappresenta una richiesta base per la prevenzione e minimizzazione della contaminazione crociata. Sono state osservate diverse risposte degli isolati di *Z. bailii* ai disinfettanti; l'effetto più lieve è stato osservato con l'alchil dimetil benzil ammonio cloruro al 10% utilizzato ad una concentrazione del 5% sugli isolati (Osimani et al., 2017).

Nell'ultimo decennio, le strategie di sequenziamento sviluppate, in genere indicate come tecniche di sequenziamento del DNA di prossima generazione, sono state applicate alla microbiologia alimentare con successo; tuttavia, sorprendentemente, la tecnica della PCR-DGGE dimostra di essere ancora un valido strumento per la profilizzazione di comunità microbiche alterative che possono verificarsi nell'industria alimentare. Infatti, tale tecnica, accoppiata ad un metodo coltura-dipendente, si è rivelata essere un mezzo utile per identificare *Z. bailii* come l'agente alterativo nelle creme da farcitura.

BIBLIOGRAFIA

Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. and Lipman D.J., Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403–410 (1990).

Banner M.J., Perspectives on conveyor track treatment, *Mast Brew Ass Amer Tech Quart*, 31:142-148 (1994).

Bubnová M., Zemančíková J. and Sychrová H., Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses. *Yeast* 31:309–21 (2014).

Bundgaard-Nielsen K. and Nielsen P.V., Fungicidal effect of 15 disinfectants against 25 fungal contaminants commonly found in bread and cheese manufacturing. *Journal of Food Protection* 59(3):268-275 (1996).

Cocolin L., Bisson L.F. and Mills D.A., Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 189:81–87 (2000).

Déak T. and Beuchat L.R., Handbook of Food Spoilage Yeasts. *CRC press*, Boca Raton, FL (1996).

Déak T., Foodborn yeasts. *Advances in Applied Microbiology* 36:176-278 (1991).

Déak T., Handbook of Food Spoilage Yeasts, 2nd edition. *Taylor and Francis* (2007).

Farris G. A., Gobbetti M., Neviani E. and Vincenzini M. in Microbiology of Food Products, 1st edition, *Casa Editrice Ambrosiana* (2016).

Fleet G.H., Spoilage yeasts. *Critical Reviews in Biotechnology* 12:1-44 (1992).

Fleet G.H., *The yeasts*, in *Yeast Spoilage of Foods and Beverages*, 5th edition, edited by Kurtzman C.P., Fell J.W. and Boekhout T. Elsevier, London, pp. 53–63 (2011).

Holah J.T., Higgs C., Robinson S., Worthington D. and Spenceley H., A conductance-based surface disinfection test for food hygiene. *Lett Appl Microbiol*, 11:255-259 (1990).

Hulin M. and Wheals A., Rapid identification of *Zygosaccharomyces* with genus-specific primers. *International Journal of Food Microbiology* 173:9–13 (2014).

Juvonen R., Nohynek L., Storgårds E., Wirtanen G., Honkapää K., Lyijynen T., Morkkila M. and Haikara A., Hiivakontaminaatioiden hallinta elintarviketeollisuudessa Krjällisuusselvitys VTT Tiedotteita-Meddelanden-Research Notes. 2107:144. VTT Biotekniikka, Espoo, Finland (2001).

Lanciotti R., Sinigaglia M., Gardini F. and Guerzoni M.E., *Hansenula anomala* as spoilage agent of cream-filled cakes. *Microbiological Research* 153:145–148 (1998).

Liu Y.J., Whelen S. and Hall B.D., Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular Biology and Evolution* 16:1799–1808 (1999).

Loureiro V. and Querol A., The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci Technol*, 10(11):356-364 (1999).

Makimura K., Tamura Y., Mochizuki T., Hasegawa A., Tapiri Y., Hanazawa R. et al., Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. *Journal of Clinical Microbiology* 37:920–924 (1999).

Marić A., Arsovski S. and Mastilović J., Contribution to the improvement of products quality in baking industry. *International Journal for Quality Research* 3:1–8 (2009).

Martorell P., Fernández-Espinar M.T. and Querol A., Molecular monitoring of spoilage yeasts during the production of candied fruits nougats to determine food contamination sources. *International Journal of Food Microbiology* 101:293–302 (2005).

Martorell P., Stratford M., Steels H., Fernández-Espinar M.T. and Querol A., Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments. *International Journal of Food Microbiology* 114:234–42 (2007).

Marvig C.L., Kristiansen R.M., Madsen M.G. and Nielsen D.S., Identification and characterisation of organisms associated with chocolate pralines and sugar syrups used for their production. *International Journal of Food Microbiology* 185:167–176 (2014).

Merico A., Capitanio D., Vigentini I., Ranzi B.M. and Compagno C., Aerobic sugar metabolism in the spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*. *FEMS Yeast Research* 4:277–283 (2003).

Osimani A., Aquilanti L., Tavoletti S. and Clementi F., Microbiological monitoring of air quality in a university canteen: an 11-year report. *Environmental Monitoring and Assessment* 185:4765–74 (2013).

Osimani A., Garofalo C., Aquilanti L., Milanović V. and Clementi F., Unpasteurised commercial boza as a source of microbial diversity. *International Journal of Food Microbiology* 194:62–70 (2015).

Osimani A., Milanović V., Taccari M., Cardinali F., Pasquini M., Aquilanti L. and Clementi F., The occurrence of spoilage yeasts in cream-filled bakery products. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 97:1819–1827 (2017)

Pitt J.J. and Hocking A.D., *Fungi and Food Spoilage*, 2nd edition, 593 pp. *Blackie Academic & Professional*, London, UK (1997).

Radler F., Herzberger S., Schönig I. and Schwarz P., Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bailii*. *Journal of General Microbiology* 139:495–500 (1993).

Salo S. and Wirtanen G., Disinfectant Efficacy on Foodborne Spoilage Yeasts Strains. *Food and Bioproducts Processing*, 83(C4):288-296 (2005).

Sheffield V.C., Cox D.R., Lerman L.S. and Myers R.M., Attachment of a 40-base pairs G + C rich sequence (GC clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 86:297–303 (1989).

Smith J.P., Daifas D.P., El-Khoury W., Koukoutsis J. and El-Khoury A., Shelf life and safety concerns of bakery products, a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 44:19–55 (2004).

Storgårds E., Pihlajamäki O. and Haikara A, Biofilms in the brewing process – a new approach to hygiene management. *Proceedings of the 26th Congress of the European Brewery Convention*, Maastricht, The Netherlands 717-724 (1997).

Storgårds E., Yli-Juuti P., Salo S., Wirtanen G. and Haikara A., Modern methods in process hygiene control – benefits and limitations. *Proceedings of the 27th Congress of the European Brewery Convention*, Cannes 249-258 (1999).

Suh S.O., Gujjari P., Beres C., Beck B. and Zhou J., Proposal of *Zygosaccharomyces parabailii* sp. nov. and *Zygosaccharomyces pseudobailii* sp. nov., novel species closely related to *Zygosaccharomyces bailii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:1922–1929 (2013).

Troller J.A., Sanitation in Food Processing, 30-70 and 263-286. *Academic Press Inc.*, San Diego, USA (1993).

Tudor E.A. and Board R.G., Food spoilage yeasts. In: Rose A.H., Harrison J.S. (eds) *The yeasts*, volume 5, 2nd edition. *Academic Press*, London, pp 435-516 (1993).

Vermeulen A., Daelman J., Van Steenkiste J. and Devlieghere F., Screening of different stress factors and development of growth/no growth models for *Zygosaccharomyces rouxii* in modified Sabouraud medium, mimicking intermediate moisture foods (IMF). *Food Microbiology* 32:389–396 (2012).

Wang H., Hu Z., Long F., Guo C., Niu C., Yuan Y. et al., Combined effect of sugar content and pH on the growth of a wild strain of *Zygosaccharomyces rouxii* and time for spoilage in concentrated apple juice. *Food Control* 59:298–305 (2016).

Wirtanen G., Biofilm formation and its elimination from food processing equipment, VTT Publications 251, 106 pp. *VTT Offsetpaino*, Espoo, Finland (195).

Wirtanen G. and Juvonen R., Disinfectant efficacy on spoilage yeasts isolated from various food processes, in Wilson D.I., Fryer P.J. and Hastings A.P.M. (eds). *Fouling, Cleaning and Disinfection in Food Processing. City Services Design and Print*, Cambridge, UK 189-196 (2002).