



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in:

BIOLOGIA MOLECOLARE E APPLICATA

**IMPIEGO DI LIEVITI NON – *Saccharomyces* SELEZIONATI PER LA
PRODUZIONE DI KEFÍR COME BEVANDA PROBIOTICA**

**USE OF SELECTED NO – *Saccharomyces* YEASTS FOR THE KEFÍR
PRODUCTION AS A PROBIOTIC BEVERAGE**

Tesi di Laurea

di:

Sofia Ciccarelli

Relatore

Prof.ssa

Francesca Comitini

Correlatore:

Dott.ssa **Alice Agarbati**

**Sessione Straordinaria
Anno Accademico 2019/2020**

Alla mia famiglia,

*“Ecco il mio segreto. È molto semplice:
non si vede bene che col cuore.
L'essenziale è invisibile agli occhi”.*

Antoine de Saint-Exupéry

INDICE

CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE	6
1.1 COMPOSIZIONE DEL LATTE	8
1.2 LATTE DI SPECIE VARIE	10
1.3 LATTE COME MATRICE ALIMENTARE DI TRSFORMAZIONE MICROBICA	12
1.4 BEVANDE FERMENTATE A BASE LATTE	15
1.5 KEFIR	17
1.5.1 KEFIR GRAINS	18
1.5.2 KEFIR ARTIGIANALE E INDUSTRIALE.....	21
1.5.3 PROPRIETÀ NUTRIZIONALI E BENEFICHE DEL KEFIR	22
1.6 IL CONCETTO DI ALIMENTO FUNZIONALE	24
1.7 I PROBIOTICI	25
1.7.1 IL MICROBIOTA INTESTINALE.....	26
1.7.2 BATTERI LATTICI	28
1.7.3 BIFIDOBATTERI.....	31
1.7.4 LIEVITI CON ATTITUDINE PROBIOTICA	32
CAPITOLO 2 - SCOPO DELLA TESI	34
CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI	36
3.1 CEPPI DI LIEVITO E BATTERI UTILIZZATE	36
3.2 ALLESTIMENTO DI FERMENTAZIONI MICROBICHE	37
3.2.1 PROVA PRELIMINARE DI FERMENTAZIONE.....	37

3.2.2 SECONDA PROVA DI FERMENTAZIONE: RIMODULAZIONE DEL POOL MICROBICO E APPLICAZIONE SU VARI TIPI DI LATTE.....	39
3.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE	41
3.3.1 TERRENI DI COLTURA	41
3.3.2 CONTE VITALI	43
3.4 ANALISI CHIMICHE	45
3.4.1 DETERMINAZIONE DEL LATTOSIO.....	45
3.4.2 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO LATTICO	48
3.4.3 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ACETICO.....	50
3.4.4 DETERMINAZIONE DELL'ETANOLO	52
3.4.5 DETERMINAZIONE PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE.....	54
3.5 ANALISI SENSORIALI	55
3.6 ANALISI STATISTICA	56
CAPITOLO 4 – RISULTATI.....	57
4.1 RISULTATI PROVA PRELIMINARE DI FERMENTAZIONE.....	57
4.1.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA	57
4.1.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA	58
4.1.3 ANALISI CHIMICHE.....	60
4.1.4 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE	63
4. 2 RISULTATI RIMODULAZIONE DEL POOL MICROBICO E APPLICAZIONE SU VARI TIPI DI LATTE: prove di fermentazione e degustazione	65
4.2.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA.....	65
4.2.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA	68

4.2.3 ANALISI CHIMICHE.....	77
4.2.4 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE	83
4.2.5 ANALISI SENSORIALI	88
CAPITOLO 5 – DISCUSSIONI E CONCLUSIONE	92
CAPITOLO 6 - RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	96

CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE

Con il nome “kefir” si indica una bevanda fermentata a base di latte, originaria della regione del Caucaso, in Asia centrale, dove viene consumata da oltre mille anni ed è conosciuta per le sue prodigiose proprietà benefiche.

In Italia la revisione del 2003 delle Linee Guida per una Sana Alimentazione Italiana dell’Istituto Nazionale di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione (INRAN) aveva previsto la suddivisione degli alimenti in cinque gruppi

(https://www.crea.gov.it/documents/59764/0/Dossier+LG+2017_CAP10.pdf/627ccb4d-4f80-cc82-bd3a-7156c27ddd4a?t=1575530729812): il kefir rientra nel terzo gruppo “Latte e derivati (yogurt e formaggi)”, ed in particolare si colloca nella categoria dei prodotti lattiero – caseari fermentati, al pari del comune yogurt.

A differenza dello yogurt, però, che contiene solo due specie batteriche, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* (Adolfsson et al., 2004), il kefir è creato a partire dalla fermentazione del latte da parte di decine di diversi batteri lattici, batteri non lattici, batteri acetici e diversi ceppi di lieviti; le cui popolazioni convivono simbioticamente all’interno dei grani di kefir.

Il Decreto del 9 dicembre 2016, entrato in vigore il 19 aprile 2017, introduce nel nostro ordinamento disposizioni riguardanti l’obbligo di indicare, in etichetta, l’origine della materia prima per il latte non fresco e i prodotti lattiero caseari tra cui il kefir, in attuazione del Regolamento UE n. 1169/2011 relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori (<https://www.informaimpresa.it/item/alimentazione - etichettatura - prodotti - caseari>).

La matrice latte per le sue caratteristiche chimico – fisiche e nutrizionali rappresenta il mezzo nel quale il complesso ed eterogeneo microbiota del kefir si sviluppa portando alla produzione di questa caratteristica bevanda fermentata (Leite, Miguel et al., 2013; Bourri et al., 2016).

Il latte rappresenta il primo alimento della vita di ogni mammifero, prodotto unico della ghiandola mammaria in grado di soddisfare tutte le esigenze nutrizionali del neonato grazie all'apporto di acqua, proteine, lipidi, zuccheri, minerali e vitamine; oltre ad essere anche il mezzo con cui la madre trasmette al bambino elementi di difesa dell'organismo come gli anticorpi.

Nonostante sia il primo ed unico alimento nelle prime fasi di vita, la sua funzione nella dieta dell'uomo non si esaurisce con l'età adulta tanto da essere considerato uno dei più importanti componenti del regime alimentare di molte popolazioni (Corradini, 1995).

Il latte e i prodotti lattiero – caseari sono considerati oggi parte integrante dell'alimentazione umana e della dieta mediterranea e fra i principali carriers di proteine ad elevato valore biologico, di calcio, di acidi grassi essenziali, di aminoacidi, di vitamine idrosolubili, di minerali e di numerosi composti bioattivi altamente significativi per varie funzioni biochimiche e fisiologiche (Khan et al., 2019).

Da un punto di vista chimico, il latte è definito come un fluido opaco, eterogeneo e di colore bianco all'interno del quale sono disperse numerose sostanze in equilibrio tra di loro: sostanze in soluzione acquosa, sostanze in dispersione colloidale e sostanze in emulsione. Il latte di mucca è considerato il più diffuso da un punto di vista commerciale il più equilibrato a livello nutrizionale, pertanto secondo la Food and Drug Administration (FDA) con il termine “latte” si fa riferimento al latte di mucca, per tutti gli altri tipi di latte è necessario specificare la specie (Chandan&Kilara, 2013).

Tuttavia, previa dicitura in etichetta sono destinati al consumo umano anche il latte di capra, pecora, bufala, asina, cammella e cavalla, ed i relativi prodotti trasformati.

1.1 COMPOSIZIONE DEL LATTE

Il latte è una dispersione acquosa di numerose sostanze che si trovano tra loro in equilibrio: sostanze in emulsione come i lipidi sottoforma di globuli di grasso, sostanze in dispersione colloidale come le micelle di caseina associate a fosfati e citrati di calcio e magnesio ed infine sostanze in emulsione acquosa che comprendono le siero – proteine, il lattosio, sali minerali e vitamine idrosolubili.

In termini quantitativi sono quattro i componenti dominanti: acqua, lipidi, proteine e lattosio, mentre quelli presenti in quantità minore sono minerali, vitamine, enzimi e gas disciolti (Guetouacheet al., 2014).

Il quantitativo di acqua varia a seconda del tipo di latte, è generalmente compreso fra 85.4% e 87.7% (Chandan&Kilara, 2013).

I lipidi rappresentano la principale fonte di energia (9 kcal/g), di vitamine liposolubili A, D, E e K e di acidi grassi essenziali.

La componente lipidica nel latte è organizzata in complessi lipoproteici denominati “globuli di grasso”. Essi sono costituiti per il 95 % da trigliceridi, mono – e di – gliceridi, la parte restante è formata da fosfolipidi (1 %), colesterolo e vitamine liposolubili (Cozzani&Dainese, 2006).

Il quantitativo di lipidi nel latte varia in base alla specie animale dal quale deriva, dalla razza dell’animale e dalla sua alimentazione; è generalmente compreso fra 3.4 % e 5.1 % (Chandan&Kilara, 2013).

Le proteine del latte sono ad elevato valore biologico, ovvero contengono tutti gli aminoacidi essenziali che il nostro corpo non è in grado di sintetizzare, importanti per la crescita ed il mantenimento dei tessuti dell'organismo (Guetouache et al., 2014).

La componente proteica del latte è distinta in due principali gruppi: le caseine che costituiscono l'80 % delle proteine del latte e le proteine del siero che costituiscono il restante 20 %. Le prime precipitano in seguito ad acidificazione (pH 4.6 – 4.3) e sono stabili al calore, le seconde invece restano in soluzione in seguito ad acidificazione e precipitano per riscaldamento sopra gli 80° C (Cozzani&Dainese, 2006).

La frazione caseinica comprende quattro principali caseine naturalmente presenti nel latte: la α_1 – caseina (α_1 – CN), la α_2 – caseina (α_2 – CN), la β – caseina (β – CN) e la κ – caseina (κ – CN) (Rollema, 1992; Guetouache et al., 2014).

Le caseine si associano a formare strutture in dispersione colloidale chiamate “micelle di caseina” ognuna contenente migliaia di molecole di ogni caseina e minerali come fosfato di Ca^{2+} , Mg^{2+} e citrati (Rollema, 1992). Fra di loro le molecole di caseina sono unite da legami covalenti dei gruppi fosforici dell'aminoacido serina con il calcio, che a sua volta lega altro fosforo e calcio colloidale (Farris et al., 2012).

La κ – caseina è l'unica glicosilata e quindi idrofila, si trova all'esterno della micella mantenendola in equilibrio con la soluzione circostante ed impedendo la precipitazione delle altre caseine a valori di pH del latte normali (6.7) (Guetouache et al., 2014).

Quando i batteri lattici convertono il lattosio, principale zucchero del latte, in acido lattico causando una diminuzione del pH, la caseina raggiunge il suo punto isoelettrico (pH 4.6 – 4.3), coagula e precipita separandosi dal siero (coagulazione acida) (Serra et al., 2007).

Le proteine che rimangono in soluzione dopo la precipitazione della caseina sono le siero – proteine. La frazione maggiore comprende la β – lattoglobulina (βLg), l' α – lattealbumine

(α Lg) e la sieralbumina; la frazione minore è costituita da immunoglobuline (Ig), lattoferrina, glicomacropetide, lattoperossidasi e lisozima.

Il quantitativo di proteine è una caratteristica importante per il latte perché ne va a determinare il valore di mercato e una maggior resa nella caseificazione (Cozzani& Dainese, 2006; Guetouache et al., 2014).

A riguardo della componente glucidica, il lattosio è il principale zucchero presente nel latte. È un disaccaride che deriva dall'unione di una molecola di D – galattosio e una molecola di D – glucosio attraverso un legame β (1,4) – glicosidico (Guetouache et al., 2014).

La sua concentrazione varia leggermente nel latte da 4.5 a 5.0 g/100 ml e rappresenta il principale substrato utilizzato dai microrganismi durante la fermentazione lattica (Corradini, 1995). In quantità molto inferiori sono presenti anche altri zuccheri come glucosio, galattosio, *N* – acetilglucosammina e *N* – acetilgalattosammina (Farris et al., 2012).

Il latte contiene anche numerosi sali minerali e vitamine. Tra i minerali si annoverano principalmente potassio, calcio, sodio, fosforo, magnesio, cloro e citrati (Griffiths, 2010; Farris et al., 2012). Nel latte crudo sono presenti vitamine liposolubili e idrosolubili. Le principali vitamine liposolubili sono la vitamina A, D ed E, invece la vitamina C (acido ascorbico) rappresenta la principale vitamina idrosolubile. Quest'ultima generalmente viene persa in seguito al processo di pastorizzazione (Farris et al., 2012; Guetouache et al, 2014).

1.2 LATTE DI SPECIE VARIE

Vacche, bufale, pecore e capre sono oggi considerati gli animali lattiferi la cui produzione di latte è di rilevante interesse economico, offrendosi anche come materia prima per la

produzione di una vasta gamma di prodotti alimentari, ognuno dei quali con peculiari caratteristiche nutrizionali, sensoriali e di conservabilità (Barłowska et al., 2011).

Per ogni specie di lattifere può essere adottata la seguente definizione, secondo la legge n. 15 del R.D. 9 maggio 1929:

“il latte è il prodotto della mungitura regolare, completa ed ininterrotta di animali in buono stato di salute, di alimentazione e in corretta lattazione”.

In questa definizione sono riportati i fattori che possono influire sui contenuti del latte che, in termini quantitativi, e in funzione soprattutto della capacità produttive dei diversi animali, differiscono da specie a specie (Tabella 1) (Corradini, 1995).

Specie	Acqua	Proteine	Lipidi	Lattosio	Minerali
Mucca	87.2	3.5	3.7	4.9	0.72
Pecora	82.7	5.5	6.4	4.7	0.92
Capra	86.5	3.6	4.0	5.1	0.82
Cammella	87.7	3.5	3.4	4.7	0.71

Tabella 1a – Composizione del latte di diverse specie animali (g/100g).
(Guetouache, et al., 2014)

Specie	Proteine	Caseina	Lipidi	Lattosio	Minerali
Mucca	3.2	2.8	3.90	0.90 a 4.90	0.9
Capra	2.8	2.3	3.38	4.40 a 4.70	0.5 a 0.8

Tabella 1b– Composizione del latte di mucca e capra (g/100 g).
(Guetouache, et al., 2014)

La produzione di latte di capra rappresenta il 2.1% della produzione mondiale (Tsakalidou&Odos, 2012). L’interesse nei suoi confronti è aumentato dal momento che possiede una maggiore digeribilità, minor allergicità, più biodisponibilità di ferro rispetto al latte di mucca e di pecora. Tuttavia, nella preparazione di latte fermentato a base di latte di capra possono verificarsi problemi durante il processo di coagulazione dovuti a un

contenuto di caseina leggermente inferiore rispetto al latte vaccino con un quantitativo di α 1 – caseina quasi assente; questo fa sì che il coagulo nel latte di capra si presenti semiliquido. Viene impiegato principalmente per la produzione di formaggi soprattutto nell'area Mediterranea (Martìn – Diana et al., 2003; Quigley et al., 2013).

Il latte di pecora viene quasi unicamente utilizzato per la produzione di formaggi, il consumo come tale non è diffuso. Rappresenta l'1.3% della produzione mondiale.

Con livelli più elevati di proteine, minerali e vitamine essenziali, il valore nutritivo del latte di pecora è superiore a quello del latte di capra e mucca (Balthazar et al., 2016).

Infine, per quanto riguarda il latte di bufala, India e Pakistan ne sono i principali consumatori. Non è così comune in Europa, ma ha un importante mercato nell'area mediterranea dove viene impiegato nella produzione di prodotti tipici come la mozzarella di bufala (Quigley et al., 2013).

1.3 LATTE COME MATRICE ALIMENTARE DI TRASFORMAZIONE MICROBICA

Il latte è un alimento con un elevato contenuto di nutrienti, quali proteine, grassi, carboidrati, vitamine, minerali e aminoacidi essenziali che associato ad un pH quasi neutro e ad alta attività dell'acqua, rappresenta un ambiente ideale per la crescita di molti microrganismi.

Alcuni di questi nutrienti sono direttamente disponibili per i microrganismi, mentre altri derivano dal metabolismo di popolazioni microbiche che li rendono poi disponibili (Frank, 2007). I batteri lattici (LAB), microrganismi capaci di fermentare il lattosio in acido lattico sono la popolazione dominante nel latte crudo di bovini, caprini, ovini e bufale, prima della

pastorizzazione. I LAB che comunemente si riscontrano comprendono specie appartenenti ai generi *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* ed *Enterococcus*.

Durante la conservazione a freddo del latte possono insediarsi anche popolazioni di batteri psicrotrofi come *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* (Quigley et al., 2013).

Possono essere presenti anche altre specie batteriche non LAB, così come lieviti e muffe la cui presenza è influenzata dallo stato fisiologico dell'animale, dall'alimentazione e dalla stagione (Quigley et al., 2011).

Le specie di lievito comunemente rilevate nel latte crudo includono: *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces lactis*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Geotrichum catenulate*, *Pichia fermentans*, *Candida sake*, *Candida parapsilosis*, *Canduspicoccus curcvisatus* e *Cryptococcus victoriae* (Delavenne et al., 2011).

I lieviti possono svolgere un ruolo importante nelle fermentazioni del latte e dei prodotti lattiero – caseari grazie a peculiari caratteristiche fisiologiche e biochimiche, come la capacità di metabolizzare il lattosio o il galattosio, ne è un esempio, la specie *D. hansenii* (Van den Tempel&Jakobsen, 2000), o l'elevata attività proteolitica o lipolitica, caratteristica spesso associata alle specie *Yarrowia lipolytica* e *Geotrichum candidum* (Sacristán et al., 2012), o come la capacità di crescere a basse temperature e di tollerare alte concentrazioni di sale.

La composizione del microbiota del latte crudo ha quindi un notevole impatto sulla produzione dei prodotti lattiero – caseari dal punto di vista sensoriale, di consistenza, sapore e proprietà organolettiche (Wouters et al., 2002).

Ci sono microrganismi che possono invece avere un impatto negativo sulla qualità del latte e sul tempo di conservazione. Tipicamente il latte viene conservato a temperature di refrigerazione (c.a. 4° C) che riducono la crescita della maggior parte dei batteri, ad

eccezione dei microrganismi psicotolleranti che possono proliferare e diventare una delle principali cause di deterioramento del latte. *Pseudomonas spp.* sono i principali responsabili, del deterioramento del latte crudo (Hantsis – Zacharov&Halpern, 2007). Per questi motivi, il consumo di latte crudo può avere implicazioni negative sulle salute dell'uomo, con conseguenze anche gravi, in seguito a contaminazione da microrganismi patogeni come *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Coliformi* e *Bacillus cereus* (Oliver et al., 2009).

Con lo scopo di ovviare al problema delle contaminazioni microbiche, il latte può essere sottoposto a trattamenti termici con il duplice scopo di distruggere i microrganismi patogeni per l'uomo e ridurre la microflora endogena ad un livello più basso possibile, al fine di aumentarne la durata della conservazione (shelf – life).

I metodi utilizzati principalmente sono due: la pastorizzazione e il trattamento UHT (Ultra High Temperature).

La pastorizzazione (dal nome di Pasteur) può essere eseguita in tre modi:

- trattamento del latte crudo a 60° – 65° C per 30 minuti o pastorizzazione bassa;
- trattamento del latte crudo a 72° – 85° C per 2 – 3 minuti o pastorizzazione alta;
- trattamento HTST (High Temperature Short Time) del latte crudo a 75° – 85° C per 15 – 20 secondi o pastorizzazione rapida.

La pastorizzazione però non è in grado di devitalizzare i microrganismi termofili, né tantomeno le spore, generalmente viene seguita da un rapido raffreddamento del prodotto.

Il trattamento UHT, a differenza della pastorizzazione, consente la distruzione totale dei microrganismi comprese le spore. Secondo la normativa (DPR 54/97) esso è un processo di sterilizzazione del latte in flusso continuo seguito da confezionamento asettico. Esso impiega temperature comprese tra 140° – 150° C per un tempo di 1 – 5 secondi.

Un terzo trattamento termico è quello della sterilizzazione che porta il latte ad una temperatura di 118° – 120° C per 15 – 20 minuti (Cappelli&Vannucci, 2005).

1.4 BEVANDE FERMENTATE A BASE LATTE

La fermentazione è conosciuta sin dall'antichità come una forma di conservazione del cibo che permette di allungare i tempi di mantenimento di prodotti facilmente deperibili. È un processo che modifica profondamente le caratteristiche organolettiche del substrato alimentare, conferendogli nuovi sapori ed aromi e proprietà nutrizionali (Nuraida, 2015). Le bevande fermentate a base latte hanno origini molto antiche, difficili da stabilire, che potrebbero risalire a più di 10.000 anni fa. Possono essere considerate fra i primi alimenti prodotti dall'uomo e la loro scoperta fu certamente casuale (Tamime, 2002).

L'origine di questi prodotti è molto probabilmente orientale: dall'est – Europa all'Asia, la stessa parola yogurt, il più noto prodotto a base latte fermentato, deriva da un'antica parola assira “*lebeny*” che significa vita; sono infatti da sempre associati con la salute e la longevità (Farris et al., 2012).

Per l'International Dairy Federation (IDF) vale la seguente definizione: "I lattici fermentati derivano dal latte e/o prodotti lattiero – caseari grazie all'azione di specifici microrganismi, che si traduce in una riduzione del pH e conseguente coagulazione" (IDF, 1992) (Prudencio et al., 2020).

Altre specifiche dell'IDF includono i seguenti aspetti: le colture starter, e cioè i microrganismi selezionati e impiegati per ottenere i prodotti fermentati, devono essere vitali, attive e ad una concentrazione di circa 10^7 UFC/g nel prodotto finito e devono mantenersi tali durante il periodo di vendita e consumo. I prodotti devono derivare da latte pastorizzato, possono essere più o meno omogeneizzati e devono avere una durata di conservazione

almeno di 30 giorni a 4° – 7° C. I trattamenti termici post – fermentativi non sono consentiti e la rimozione del siero dopo la fermentazione è consentito solo durante la produzione di particolari prodotti a base di latte fermentato come labneh, ymer, skyr e stragisto (Tamime, 2002).

Tenendo in considerazione i microrganismi coinvolti nella fermentazione è possibile distinguere tre categorie in cui rientrano i vari tipi di latte fermentato (Prudencio et al., 2020) (Tabella 2):

- lattici fermentati acidi, derivati dall'azione di batteri lattici termofili e/o mesofili;
- lattici fermentati probiotici, che contengono microrganismi con particolari effetti benefici per la salute del consumatore;
- lattici fermentati acido – alcolici, dove LAB e lieviti sono coinvolti nel processo di fermentazione.

Yogurt, dhai e skyr sono un esempio di latte fermentato acido “termofilo” ottenuto attraverso l'impiego di microrganismi omofermentanti come *Streptococcus* e *Lactobacillus*; il latte fermentato acido “mesofilo” vede l'impiego di microrganismi mesofili omo – ed eterofermentanti come *Lactococcus*, *Lactobacillus* e *Leuconostoc*.

Il latte fermentato acido probiotico vede l'impiego di microrganismi probiotici appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* che possono essere integrati nello yogurt.

Infine le varie tipologie di latte fermentato acido – alcolico vedono il coinvolgimento dei lieviti, oltre ai batteri, nel processo di produzione. Contengono quindi non solo acido lattico come principale prodotto di fermentazione lattica operata dai batteri, ma anche alcol etilico ed altri sottoprodotti derivati dal metabolismo dei lieviti. Il kefir è il più noto latte fermentato acido – alcolico (Farris et al., 2012).

Denominazione e tipologia del prodotto	Area di origine o di produzione	Tipo di latte utilizzato
Artigianali		
Yoghurt	Armenia	bovino, ovino
Mayzum	Iran	bovino, ovino, bufalino
Kast	Egitto	bovino
Dahi	India	bovino, bufalino
Labneh	Libano	bovino
Gioddu	Sardegna	ovino
Kefir con grani	Caucaso	bovino, caprino
Lagermilk	Germania	bovino, caprino
Kumys	Russia	bovino
Kellermilch	Germania	bovino
Industriali		
Yogurt	tutto il mondo	bovino
Acidophilus milk	USA	bovino
Yacult	Giappone	bovino
Cultured milk	USA	bovino
Cultured cream	USA	bovino
Buttermilk	Germania	bovino
Kefir senza grani	Russia	bovino
Latti fermentati probiotici	tutto il mondo	bovino
Latti fermentati pre-probiotici	tutto il mondo	bovino

Tabella 2– Principali latti fermentati.

(<https://www.istitutodanone.it/wp-content/uploads/2014/09/1998-I-latti-fermentati.pdf>)

1.5 KEFIR

Il kefir è una bevanda fermentata a base latte prodotta dall'azione di batteri e lieviti che coesistono in associazione simbiotica nei così detti “grani di kefir”; si differenzia da tutti gli altri prodotti fermentati lattiero – caseari in quanto non è il risultato dell'attività metabolica di uno o pochi microrganismi ma di un consorzio microbico numeroso ed eterogeneo.

La parola kefir deriva dalla parola turca keyif che significa “sentirsi bene”, è una bevanda originaria delle montagne Caucasiche e tradizionalmente prodotta e consumata principalmente nell'Europa dell'est, Russia e nel sud – est Asiatico.

(Leite, Miguel et al., 2013).

Recentemente, il kefir ha suscitato particolare interesse nella comunità scientifica per i suoi numerosi effetti benefici sulla salute. Diversi studi scientifici ne hanno supportato i benefici (Leite, Miguel et al. 2013; Nielsen et al., 2014; Rosa et al., 2017; Farag et al., 2020) tanto da essere considerata una bevanda probiotica con grandi potenzialità.

Il suo consumo regolare è stato associato ad una migliore digestione e tolleranza al lattosio, effetto antibatterico contro microrganismi patogeni, effetto ipocolesterolemizzante, effetto antipertensivo, effetto antinfiammatorio, attività antiossidante, attività anti – cancerogena ed attività anti – allergenica.

La composizione nutrizionale varia a seconda della tipologia di latte impiegato, della composizione microbica dei grani utilizzati, dal tempo/temperatura di fermentazione e delle condizioni di conservazione (Rosa et al., 2017); è una bevanda fermentata caratterizzata da un gusto distintivo, tipico del lievito, acidula ed effervescente per la produzione di anidride carbonica, la consistenza è liquida, ma corposa (Leite, Miguel et al., 2013).

1.5.1 KEFIR GRAINS

I kefir grains o grani di kefir giocano un ruolo di primaria importanza in quanto forniscono le colture starter per la produzione di kefir (Ratray&O'Connell, 2011), e vengono da sempre impiegati nella produzione secondo il metodo tradizionale. Il kefir industriale prevede invece l'utilizzo di colture pure, che possono essere isolate dai grani stessi, o colture commerciali come starter (Ratray&O' Connel, 2011).

I kefir grains contengono microrganismi, quali batteri e lieviti, inglobati in una matrice polisaccaridica e proteica (Figura 1).



Figura 1 – Kefir grains.

In questo piccolo ecosistema le diverse popolazioni microbiche sono relativamente stabili, interagiscono e si influenzano fra di loro e provvedono alla sintesi di molecole bioattive essenziali per la crescita dei microrganismi, dei grani stessi e per l'inibizione di microrganismi patogeni (Farnworth&Mainville, 2008; Garrot et al., 2010; Leite, Miguel et al., 2013).

I grani contengono generalmente sugli 890 – 900 g/kg di acqua, 60 g/kg di zuccheri, 30 g/kg di proteine, 7g/kg di minerali e 2 g/kg di lipidi (Gut et al., 2019), si presentano alla vista come una massa di forma irregolare, di consistenza soda ed elastica e di colore bianco/giallastro, la grandezza è variabile da pochi millimetri fino a 2 – 3 cm (Farnworth&Mainville, 2008).

La distribuzione dei microrganismi sembrerebbe essere ancora oggetto di controversie, è generalmente riportato che i lieviti si localizzano al centro e nella zona intermedia dei grani mentre i batteri sulla superficie (Gut et al., 2019).

Il principale polisaccaride di cui sono costituiti i grani è il kefiran, una sostanza idrosolubile prodotta principalmente da alcune specie di lattobacilli come *Lactobacillus kefiranofaciens* e *Lactobacillus kefir* (Ottles&Cagindi, 2003).

I grani di kefir hanno una composizione microbica complessa ed eterogenea che vede la predominanza dei batteri lattici, i principali responsabili della conversione dell'acido lattico in lattosio attraverso il processo di fermentazione lattica. Altri microrganismi presenti comprendono batteri acetici (genere *Acetobacter*), lieviti e funghi.

Lactobacillus helveticus, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefiranofaciens*, *Lactobacillus kefiranofaciens* subsp. *kefirgranum*, *Lactococcus* spp. come *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremonis* e *Streptococcus thermophilus* sono i principali batteri lattici omofermentanti identificati.

Le specie eterofermentanti includono *Lactobacillus kefiri*, *Lactobacillus parakefiri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremonis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Leite, Miguel et al., 2013).

Le principali specie di lieviti isolate dai grani con capacità di fermentare il lattosio sono: *Kluyveromyces marxianus/Candida kefyr*, *Kluyveromyces lactis* var. *lactis*, *Debaryomyces hansenii* e *Dekkera anomala*; le specie più riscontrate che non sono capaci di assimilare lattosio comprendono: *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii*, *Pichia fermentas*, *Kazachstania unispora*, *Saccharomyces turicensis*, *Issatchenkia orientalis* e *Debaryomyces occidentalis* (Leite, Miguel et al., 2013).

I lieviti grazie alla produzione di particolari sottoprodotti derivanti dal loro metabolismo contribuiscono alle tipiche proprietà sensoriali del kefir. Molti di loro presentano attività lipolitica e proteolitica e provvedono a fornire aminoacidi e acidi grassi, altri come *D.*

hansenii e *Y. lipolytica* sono in grado di assimilare l'acido lattico derivante dal metabolismo dei batteri lattici (LAB) alzando il pH e promuovendo la crescita della popolazione batterica, come anche la produzione di vitamina B da parte di *Acetobacter spp.* (Lopitz – Otsoa et al., 2006).

La composizione microbica può però variare a seconda dell'origine del kefir, del substrato utilizzato nel processo di fermentazione e dei metodi di mantenimento della coltura.

(Prado et al., 2015).

1.5.2 KEFIR ARTIGIANALE E INDUSTRIALE

Sono tre le principali metodiche per la produzione del kefir (Leite, Miguel et al., 2013):

- il metodo artigianale (kefir artigianale);
- il metodo commerciale basato sul metodo Russo (kefir industriale);
- il metodo commerciale che prevede l'impiego di colture pure (kefir industriale).

Il metodo artigianale prevede l'utilizzo dei grani come colture starter.

Per avviare il processo di fermentazione ai grani di kefir viene aggiunto generalmente latte vaccino, o in alternativa possono essere impiegati altri tipi di latte sia animale che vegetale (soia, riso, cocco, etc.) o semplicemente una soluzione di acqua e zucchero integrale. Questa possibilità permette il consumo di kefir anche da parte di soggetti vegani o con allergia ai latticini; in quest'ultimo caso si parla di "kefir d'acqua" (Fiorda et al., 2017).

Il processo di fermentazione per la produzione di kefir ha una durata variabile dalle 18 alle 24 ore ad una temperatura di 20° – 25° C. Durante questo processo i grani di kefir crescono sia di dimensione che di numero, aumentando alla fine di circa il 5 – 7 % della loro massa iniziale.

Terminato il processo, il latte viene filtrato per essere consumato, o conservato a 4° C (per un tempo massimo di 20 giorni circa). I granuli una volta lavati e setacciati possono essere riutilizzati per una nuova fermentazione e il processo può ripetersi. Se accuratamente alimentati, i grani di kefir possono essere riutilizzati anche per molti anni.

Le principali molecole prodotte durante la fermentazione sono acido lattico e acido acetico, in misura minore anche etanolo e CO₂. Questi sono responsabili della viscosità ed acidità alla bevanda. Prodotti secondari di fermentazione quali diacetile, acetaldeide, etile e aminoacidi sono i responsabili del gusto (Leite, Miguel et al., 2013).

Il metodo Russo e il metodo commerciale riguardano la produzione di kefir su larga scala, questi metodi industriali possono presentare delle differenze nel processo di produzione ma sono basati sullo stesso principio: il latte impiegato come matrice viene inoculato con colture pure isolate dai grani di kefir (metodo Russo) o con colture commerciali selezionate (metodo commerciale).

In quest' ultimo caso l'uso di colture commerciali può portare ad una standardizzazione aromatica del prodotto, ma con una scelta accurata dei microrganismi anche il kefir commerciale può rivelarsi una bevanda dall'aroma e sapore gradevoli, anche se tuttavia non presenta le stesse proprietà terapeutiche e probiotiche del kefir artigianale (Ratray&O' Connel, 2011).

1.5.3 PROPRIETÀ NUTRIZIONALI E BENEFICHE DEL KEFIR

Il consumo di kefir è da sempre raccomandato per le sue proprietà nutrizionali e benefiche nei confronti dell'organismo che comprendono (Leite, Miguel et al., 2013; Farag et al., 2020):

- produzione di numerosi composti bioattivi
- attività antimicrobica;
- attività antinfiammatoria;
- effetti anticancerogenici;
- effetto ipocolesterolemizzante;
- effetti sul microbiota intestinale;
- stimolazione del sistema immunitario.

Il kefir contiene vitamine, minerali e aminoacidi essenziali per il mantenimento delle normali funzioni dell'organismo, si presenta particolarmente ricco di vitamine del gruppo B (B1, B2, B5, B6 e B12), vitamina C, aminoacidi essenziali come triptofano, tirosina e fenilalanina, leucina, isoleucina, treonina e valina e sali minerali.

La popolazione di LAB presenti nei grani di kefir, oltre ad incrementare il microbiota umano, sembrerebbe svolgere un'azione antagonista nei confronti dello sviluppo di batteri patogeni come *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*. L'attività antimicrobica è associata alla produzione di acidi organici, peptidi (batteriocine), CO₂, perossido di idrogeno, etanolo e diacetile.

Il ruolo dei prodotti lattiero – caseari fermentati nella prevenzione dei tumori sembrerebbe essere attribuita alla capacità di sopprimere i così detti early – stage – tumors, andando ad interferire con l'attività di enzimi responsabili della conversione dei pro – cancerogeni in cancerogeni, o andando a stimolare l'attività del sistema immunitario (Sarkar, 2007).

Un possibile meccanismo proposto per l'effetto ipocolesterolemizzante vede coinvolti i batteri lattici che sembrerebbero in grado di ridurre l'assorbimento di colesterolo esogeno a

livello del piccolo intestino incorporandolo all'interno delle cellule batteriche. In un studio sui topi sono stati rilevate significativa riduzione del colesterolo totale, colesterolo LDL e trigliceridi, mentre il livello di colesterolo HDL non è rimasto invariato (Wang et al., 2009). Infine il kefir si presta come prodotto adatto ad individui intolleranti al lattosio grazie all'attività dei batteri lattici che fermentano questo zucchero e anche grazie alla presenza e all'attività dell'enzima β – galattosidasi presente nei grani che si mantiene attiva al momento del consumo (Leite, Miguel et al., 2013).

1.6 IL CONCETTO DI ALIMENTO FUNZIONALE

L'idea che il cibo non solo può provvedere e soddisfare i fabbisogni nutrizionali ma può anche prevenire lo sviluppo di malattie, garantire un buono stato di salute e longevità è oggi sempre più chiara e affermata (Alissa&Ferns, 2012).

I cibi funzionali sono un vasto ed eterogeneo gruppo di prodotti alimentari, caratterizzati dal fatto di avere delle specifiche proprietà benefiche. Sono stati oggetto di numerose definizioni nel tempo e ancora oggi non esiste una definizione universalmente riconosciuta.

Con alimenti funzionali si fa riferimento a tutti quegli alimenti, che vengono frequentemente consumati e che, grazie al loro contenuto in sostanze bioattive, oltre a soddisfare le normali funzioni nutrizionali, dimostrano di esercitare benefici fisiologici e/o di ridurre il rischio di malattie cronico – degenerative (Liguri, 2015).

Il concetto di alimento funzionale viene spesso associato con il concetto di prodotto nutraceutico; il termine “nutraceutico” è stato coniato dalla fusione dei termini “nutrizione” e “farmaceutico” nel 1989 da Stephen DeFelice, fondatore e presidente della *Foundation for Innovation in Medicine* (FIM, Cranford, NJ) che ha definito nutraceutico un alimento (o

parte di esso) con attività curative o in grado di promuovere la salute umana, compresa la prevenzione e/o trattamento della malattia.

Sono da considerare nutraceutici tutti quei composti isolati o purificati dagli alimenti che vengono forniti sottoforma di medicina, integratori dietetici, prodotti erboristici, alimenti geneticamente modificati (El Sohamy, 2012; Liguri, 2015).

Possono essere pertanto considerati “alimenti funzionali” sia quelli tecnologicamente avanzati e migliorati, come ad esempio i prodotti arricchiti con acidi grassi polinsaturi $\omega 3$ e $\omega 6$ di cui i pesci e gli olii di pesce sono particolarmente ricchi, quelli addizionati con sostanze biologicamente attive come steroli e stanoli vegetali con azione ipocolesterolemizzante, o ancora quelli arricchiti con probiotici e/o prebiotici, in questa categoria rientrano anche i lattici fermentati come lo yogurt o il kefir; sia prodotti più convenzionali, come le proteine della soia associate ad un minor rischio di contrarre patologie coronariche, il tè verde per il contenuto di catechine, l'aglio per le sostanze idro e lipo – solubili che gli conferiscono proprietà anticancerogene e anticolesterolo, l'olio d'oliva per i tocofenoli, i carotenoidi ed altre sostanze (Jones 2002; Cocchi&Mordenti, 2007; Hrelia et al.,2009).

1.7 I PROBIOTICI

Il termine “probiotico” è relativamente nuovo e significa "per la vita", ed identifica tutti quei microrganismi associati ad effetti benefici per l'uomo e gli animali.

L'osservazione che alcuni microrganismi selezionati erano capaci di apportare benefici all'organismo è da attribuire a Eli Metchnikoff che ipotizzò che “questi effetti benefici non erano altro che la conseguenza del miglioramento dell'equilibrio microbico intestinale tramite inibizione dei batteri patogeni con sostituzione di quelli utili” (Metchnikoff, 1907).

Il termine “probiotico” però, nasce intorno agli anni 60’ad indicare “sostanze prodotte da microrganismi capaci di promuovere la crescita di altri microrganismi” (Fuller,1965) (Hotel&Cordoba, 2001).

La FAO/OMS nel 2001 parla di “organismi vivi che, somministrati in quantità adeguata, apportano un beneficio alla salute dell’ospite”.

Il Ministero della salute in Italia definisce i probiotici come “microrganismi che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l’organismo” (Farris et al., 2012).

I microrganismo per essere definiti probiotici devono soddisfare precisi requisiti (Gagliardi et al., 2018):

- dimostrarsi sicuri per l’impiego nell’uomo, non devono essere patogeni o tossici ma devono appartenere a specie normalmente presenti nel microbiota intestinale dell’uomo. Devono far parte dei così detti microrganismi designati come GRAS (generalmente considerato sicuro);
- dimostrare di rimanere vivi e attivi a livello intestinale e moltiplicarsi;
- resistere quando esposti all’ambiente acido dello stomaco, alle secrezioni biliari e pancreatiche.

1.7.1 IL MICROBIOTA INTESTINALE

Il termine di “microbiota intestinale” si riferisce alle comunità di microrganismi (batteri, lieviti e virus) che transitano e risiedono nel tratto digestivo (Karl et al., 2017).

Il microbiota si sviluppa immediatamente dopo la nascita e risulta influenzato dalla modalità del parto (vaginale o cesareo), dalla nutrizione iniziale (allattamento al seno o artificiale) e dal genotipo dell’ospite. L’iniziale diversità microbica va poi a normalizzarsi entro i primi

tre anni di vita e rimane generalmente stabile in condizione fisiologiche nel corso della vita adulta, potendo subire variazioni in risposta a diversi fattori come l'uso di antibiotici, le abitudini alimentari e l'età (Butel, 2014; Capurso, 2016).

Il rapporto che si viene a formare tra il microbiota intestinale e l'ospite umano è di tipo simbiotico, ovvero apporta benefici per entrambi: l'ospite fornisce un habitat ricco in nutrienti mentre il microbiota conferisce elementi utili per la sua salute, svolgendo (Butel, 2014; Capurso, 2016) :

- funzioni metaboliche con produzioni di vitamine, sintesi di aminoacidi, trasformazione degli acidi biliari e fermentazione di substrati non digeribili come la fibra con produzione di acidi grassi a corta catena;
- funzioni strutturali con accrescimento, differenziazione e regolazioni delle cellule epiteliali, mantenendone l'integrità strutturale della mucosa intestinale agendo anche sul rafforzamento delle giunzioni strette presenti tra le cellule grazie alla produzione di particolari proteine, promuovendo la produzione di muco e defensine;
- funzioni protettive nei confronti dell'ospite attraverso la modulazione del sistema immunitario in particolare del GALT (tessuto linfoide associato all'intestino) e attraverso la competizione con batteri potenzialmente pericolosi producendo sostanze in grado di inattivarli (batteriocine e metaboliti), alterando il pH intestinale e sottraendo loro i nutrienti.

Coinvolti nel ripristinare e/o rafforzare tutte queste funzioni fisiologiche sono i microrganismi probiotici in grado di integrarsi e modulare il microbiota dell'organismo producendo benefici (Farris et al., 2012) attraverso diverse modalità di azione citate nel precedente paragrafo.

Tra i microrganismi selezionati come potenziali probiotici i principali sono batteri lattici: tra i più importanti *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Lactobacillus carvatus*, *Lactobacillus fermentum*; cocchi gram positivi come *Lactococcus lactis* spp. *cremonis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides* ed altri, ma anche microrganismi di altro genere come batteri non lattici *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium thermophilum*; lieviti come *Saccharomyces baluwardii* e *Kluyveromyces marxianus*, spore di batteri sporigeni tra cui *Bacillus cereus* e *Bacillus clausii* e persino un ceppo benefico di *Escherichia coli* (Nissle 1917). Le specie di *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. sono le più comunemente impiegate come probiotici nella produzione di lattici fermentati e altri prodotti lattiero – caseari (Ouweland et al., 2002; Lahtinen et al., 2011; Hati et al., 2013; Doron&Snydman, 2015).

1.7.2 BATTERI LATTICI

I batteri lattici (LAB) appartengono al phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordine *Lactobacillales*, famiglia *Lactobacillaceae*.

Si distribuiscono in cinque principali generi: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*; la recente revisione tassonomica ha identificato altri generi che sono stati aggiunti al gruppo, che ora comprende anche: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, e *Weissella* (Khalid, 2011).

Il genere *Lactobacillus* comprende oltre le cento specie, le meglio caratterizzate e più rilevanti dal punto di vista biologico, tecnologico e commerciale sono: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, subsp. *bulgaricus* subsp. *lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus salivarius*.

Possono essere ricercati in numerose nicchie ecologiche ricche in nutrienti tra cui l'uomo dove possono insediarsi a livello intestinale, nelle vie urogenitali, cavo orale e pelle. Sono particolarmente abbondanti negli ambienti caseari e nei prodotti a base di latte fermentato; non solo, sono naturalmente presenti anche nel suolo, nella carne e nei vegetali (es. *Lb. plantarum*) e anche nei prodotti fermentati non a base latte.

Sono batteri gram positivi, di forma bastoncellare, termofili o mesofili, anaerobi facoltativi o microaerofili e catalasi negativi.

Vengono classificati in omofermentanti obbligati (Gruppo I) quando l'unico prodotto dalla fermentazione degli zuccheri è l'acido lattico (*Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus* e *Lb. salivarius*), in etero fermentanti obbligati (Gruppo III) quando il processo di fermentazione porta alla produzione, oltre che dell'acido lattico, anche di una modesta quantità di CO₂, etanolo e/o acido acetico, sono in grado di fermentare anche i pentosi (*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus kefir* ed altri), e infine in eterofermentanti facoltativi (Gruppo II) come *Lb. casei* e *Lb. plantarum* che si comportano generalmente da omofermentanti tranne in particolari condizioni dove sono in grado di produrre anche acido acetico, etanolo e fermentare pentosi.

Vengono definiti anche acido – resistenti per l'elevata quantità di acido lattico che producono responsabile dell'abbassamento del pH nella matrice, in grado di scoraggiare la

crescita di altri microrganismi competitori e aumentare la shelf – life del prodotto (Bottazzi, 1993; Khalid, 2011; Farris et al., 2012).

Sono principalmente impiegati come colture starter nella produzione dei prodotti a base latte fermentato dove occupano un ruolo centrale nel processo di fermentazione (fermentazione lattica) conferendo a tutti questi prodotti particolari caratteristiche organolettiche e proprietà benefiche per la salute grazie alla massiva produzione di acido lattico, ed altre molecole come etanolo, acido acetico, vari composti aromatici come diacetile e acetaldeide, batteriocine, esopolisaccaridi e vari enzimi (Hati et al., 2013).

Il genere *Lactococcus* comprende batteri lattici gram positivi, di forma coccale, anaerobi facoltativi, non sporigeni, immobili e catalasi negativi. In ambito lattiero – caseario sono tre le sottospecie di maggior interesse: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*.

Per il genere *Streptococcus* è bene ricordare *Streptococcus thermophilus*, importante microrganismo starter nella produzione di yogurt, insieme a *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, e di altri prodotti a base latte fermentato.

Il genere *Leuconostoc* riunisce microrganismi di grande interesse lattiero – caseario, gram positivi, di forma coccale ed etero fermentanti tra cui: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* e *Leuconostoc lactis*.

Al genere *Pediococcus* appartengono microrganismi di forma coccale ed omofermentanti con cellule a tetradie. Le specie di maggior interesse in ambito lattiero – caseario sono: *Pediococcus acidilactici* e *pentosaceus* (Bottazzi, 1993; Farris et al., 2012).

1.7.3 BIFIDOBATTERI

I bifidobatteri appartengono al phylum *Actinobacteria*, classe *Actinobacteria*, ordine *Bifidobacteriales*, il genere *Bifidobacterium* comprende sulle 55 specie.

Sono batteri gram positivi, di forma bastoncellare, non sporigeni e immobili, anaerobi e talvolta aero tolleranti, catalasi negativi, con una temperatura ottimale di crescita compresa fra i 37° e 41° C.

Possono risiedere in nicchie ecologiche differenti tra cui il tratto gastrointestinale di animali ed uomini specialmente neonati, e nella cavità orale.

Si stima che oltre 400 specie di microrganismi abitino l'intestino umano, e *Bifidobacterium spp.* sono i microrganismi anaerobi dominanti che risiedono nel colon (Roy, 2005).

Vengono generalmente impiegati come colture starter, nei prodotti fermentati a base latte, insieme ai LAB e sono, come questi ultimi, particolarmente apprezzati per le loro capacità di promozione della salute. Le specie probiotiche comprendono: *Bifidobacterium bifidum*, *infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* e *Bifidobacterium catenulatum* (Bottazzi, 1993; Lugli et al., 2017).

I principali prodotti della fermentazione del glucosio sono acido lattico e acido acetico a cui si accompagnano piccole quantità di etanolo, acido formico e succinico (Bottazzi, 1993).

La crescita dei *Bifidobacterium spp.* nel latte è generalmente lenta rispetto ai batteri lattici, e questo sembrerebbe essere principalmente dovuto alla limitata attività proteolitica; l'utilizzo di un inoculo elevato e l'aggiunta di fattori di crescita, come fonti di azoto, ne possono promuovere la velocità crescita e variabilità. Non solo, le basse temperature di stoccaggio, la presenza di ossigeno, il pH e l'elevata acidità possono incidere negativamente sulla variabilità dei *Bifidobacterium spp.* durante la conservazione dei prodotti fermentati a base latte (Roy, 2005).

1.7.4 LIEVITI CON ATTITUDINE PROBIOTICA

I lieviti sono parte integrante della microflora di molti cibi e bevande fermentati, si trovano in un'ampia gamma di alimenti di origine sia vegetale che animale dove hanno un notevole impatto sulla sicurezza e sulle proprietà organolettiche del prodotto (Foligné et al., 2010).

Ad esempio, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces lactis* e *Yarrowia lipolytica* sono le specie predominanti di lieviti che di frequente vengono ritrovate nei lattici fermentati tipo kefir e koumiss o nei tradizionali formaggi dove non vengono però intenzionalmente utilizzati ma si sviluppano secondariamente conferendo il caratteristico e aroma ai prodotti e ostacolando lo sviluppo di microrganismi alterativi (Kumura et al., 2004).

Per moltissimo tempo l'attenzione dei ricercatori si è focalizzata sull'impiego di batteri come microrganismi probiotici, non ampliando gli studi anche sui lieviti come possibili microrganismi probiotici (Agarbati et al., 2020).

Saccharomyces cerevisiae var. *boulardi* (Codex), isolato per la prima volta da Henry Boulard nella prima metà del ventesimo secolo, è attualmente l'unico ceppo di lievito riconosciuto come probiotico e disponibile in commercio per l'uso umano.

Diversi studi concordano sull'efficacia dei lieviti, ed in particolare *S. boulardi*, nel trattamento di patologie gastrointestinali umane come: ADD (antibiotic associated diarrhea), IBD (infiammatori bowel disorders), nell'AIDS – related diarrhea e nel trattamento della diarrea acuta giovanile e nell'adulto. In più *S. boulardi* sembrerebbe apportare benefici anche nel trattamento di infezioni da *Clostridium difficile* e *Helicobacter pylori* (Foligné et al., 2010; Agarbati et al., 2020).

I lieviti rappresentano una buona alternativa all'impiego di batteri probiotici essendo immuni all'azione degli antibiotici andando quindi a limitarne l'utilizzo e a diminuire lo sviluppo di

antibiotico resistenze. Per queste ragioni l'attenzione dei ricercatori si è spostata, negli ultimi anni, alla ricerca di lieviti con proprietà probiotiche (Agarbati et al., 2020).

Diversi ceppi come *K. lactis*, *K. marxianus*, *Isaatchenkia orientalis*, *S. cerevisiae*, *D. hansenii* hanno dimostrato di possedere attività antimicotica, antibatterica, antinfiammatoria e antitumorale tanto da essere stati proposti come microrganismi probiotici; alcuni come *D. hansenii* e *K. lactis* sono stati anche recentemente approvati dall'EFSA (European Food Safety Authority) ed inclusi nella lista dei microrganismi QPS (Quantified Presumption of Safety) (Kourelis et al., 2010; Agarbati et al., 2020). *S. boulardi* rimane per il momento l'unico lievito considerato probiotico (Agarbati et al., 2020).

CAPITOLO 2 – SCOPO DELLA TESI

Nel corso degli ultimi anni si è assistito ad una profonda trasformazione del concetto di alimentazione, tanto che il fulcro delle indagini scientifiche si è spostato dal ruolo primario del cibo come fonte di energia e nutrienti fondamentali per la crescita ed il mantenimento delle normali funzioni dell'organismo, a cibo come strumento di benessere e prevenzione per la salute.

Attualmente, i consumatori sono sempre più esigenti ed attenti alle scelte alimentari e si mostrano costantemente interessati a scoprire nuovi prodotti, che oltre agli effetti nutrizionali siano in grado di apportare benefici all'organismo e prevenire patologie croniche rischiose.

Tutte queste ragioni hanno portato la comunità scientifica ad approfondire il concetto, piuttosto recente, di “alimento funzionale” dal punto di vista teorico e pratico.

Gli alimenti funzionali sono alimenti che dimostrano scientificamente e in modo soddisfacente di avere un effetto benefico su una o più funzioni dell'organismo.

Rientrano nella categoria dei cibi funzionali tutti quegli alimenti contenenti probiotici e/o prebiotici, ed il kefir ne è proprio un esempio. Si tratta di una bevanda a base di latte fermentato caratterizzata da un pool microbico eterogeneo dove batteri, in particolare batteri lattici, e lieviti convivono conferendo a questa bevanda, sempre più diffusa e consumata nel mondo occidentale, proprietà benefiche per la salute dell'organismo.

L'obiettivo proposto in questo lavoro è stato quello di testare l'impiego di quattro specie di lievito non commerciali di tipo non – *Saccharomyces*, precedentemente isolati da ambienti non antropizzati e non “contaminati” con colture starter commerciali, selezionati e testati per le loro capacità probiotiche, nella produzione di kefir prodotto con il metodo dell'inoculo di colture starter (kefir di tipo industriale), su scala di laboratorio. Questi lieviti “non

convenzionali” sono stati utilizzati come colture starter di fermentazione insieme a ceppi batterici commerciali, quali *Lactobacillus casei Shirota* e *Bifidobacterium spp.*. In prima battuta, è stata studiata l’interazione dei diversi lieviti fra di loro e con le specie batteriche, con lo scopo di mettere a punto un pool di lieviti probiotici in grado di coesistere in maniera ottimale con le specie batteriche comunemente utilizzate nella produzione di kefir e rafforzare la valenza probiotica di questa bevanda.

Questa prima parte del lavoro ha visto impiegata la matrice latte di mucca per una prova preliminare.

Nella seconda parte del lavoro di tesi è stata testata l’efficacia del consorzio microbico su vari tipi di latte: mucca con e senza lattosio, capra, pecora e bufala.

Al termine della fermentazione e durante lo stoccaggio del kefir, prodotto con le quattro tipologie di latte, sono stati analizzati diversi aspetti quali la cinetica microbica (di batteri e lieviti), la produzione dei principali prodotti di fermentazione e prodotti secondari, responsabili dell’aroma e sapore del kefir. I fermentati ottenuti sono stati infine sottoposti ad analisi sensoriale tramite degustazione.

CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 CEPPI DI LIEVITO E BATTERI UTILIZZATI

I ceppi di lievito non – *Saccharomyces* impiegati in questo studio appartengono alla specie *Candida zeylanoides* (13), *Debaryomyces hansenii* (36 e 78), *Yarrowia lipolytica* (92) e *Kluyveromyces lactis* (80) (Agarbati, Marini et al., 2020) i quali provengono da campionamenti effettuati su formaggi a diversi stadi di maturazione e dagli ambienti di lavorazione dei formaggi stessi di aziende agrarie localizzate nella zona dei monti Sibillini, fortemente colpita dal sisma del 2016. Si tratta di aziende artigianali accumulate dal fatto di non impiegare starter commerciali nella produzione di formaggio.

Tutti i ceppi di lievito selezionati hanno mostrato interessanti proprietà probiotiche e funzionali: capacità di crescita a 37° C, capacità di crescita in presenza di bile e bassi valori di pH, capacità antimicrobica nei confronti di *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*, attività antiossidante (Agarbati et al., 2020).

Nella prova preliminare di fermentazione è stato impiegato anche *S. boulardi* (Codex) proveniente dalla collezione del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA).

I ceppi di lievito sono stati rinfrescati su terreno YPD agar (1 % estratto di lievito; 2 % peptone; 2 % D – glucosio; 2 % Agar) e conservati alla temperatura di 4° C. Per la conservazione a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati (-80° C) in YPD liquido contenente glicerolo (80%).

I batteri impiegati sono ceppi commerciali ed appartengono a specie quali *Lactobacillus casei* Shirota ed un pool di *Bifidobacterium spp.* (Bifiselle, integratore alimentare con

fermenti lattici, prodotto e confezionato da Bromomatech s.r.l.). Il pool di bifidobatteri comprende: *Bifidobacterium breve* (BB 03), *Bifidobacterium bifidum* (BB 06), *Bifidobacterium longum* (BL 05) e *Bifidobacterium lactis* (BL 04).

Tutti i ceppi batterici sono stati coltivati su terreno MRS Agar (LIOFILCHEM® S.r.l., Teramo, Italia) alla temperatura ottimale di crescita di 37° C ed in condizione di anaerobiosi. Essi sono stati conservati nel medesimo terreno alla temperatura di 4° C per breve tempo. Per la conservazione a lungo termine, invece, i ceppi sono stati crioconservati in terreno MRS broth (LIOFILCHEM® S.r.l., Teramo, Italia) contenente glicerolo (80%) alla temperatura di -80° C.

3.2 ALLESTIMENTO DI FERMENTAZIONI MICROBICHE

3.2.1 PROVA PRELIMINARE DI FERMENTAZIONE

Nella prova preliminare di fermentazione sono stati utilizzati tutti i lieviti descritti nel punto 3.1 e come batterio il solo *Lactobacillus casei Shirota*. Latte di mucca intero UHT (Ultra High Temperature) è stato utilizzato come matrice per la fermentazione.

Le fermentazioni sono state condotte a 25° C per 24 ore in beute contenenti 250 ml di latte e chiuse con tappo pasteur per impedire la contaminazione della matrice e per permettere la fuoriuscita della CO₂ prodotta (Figura 2). Le prove sono state poi conservate per otto settimane 4° C per simulare la shelf – life del prodotto.

Le pre – colture di lievito (*C. zeylanoides*, entrambi i *D. hansenii*, *Y. lipolytica* e *K. lactis*) sono state allestite in YPD liquido e lasciate incubare a 25° C overnight. Le cellule sono state raccolte per centrifugazione (4000 rpm per 5 minuti), risospese in acqua sterile, centrifugate di nuovo e risospese in 1ml di acqua sterile per poi procedere all'inoculo.

La pre – coltura di *Lb. casei Shiota* è stata allestita in MRS broth ed incubata a 37° C per 48 ore. Le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione (4000 rpm per 10 minuti), si è proceduto poi all'inoculo.



Figura 2 – Prova preliminare di fermentazione.

In totale sono state allestite 8 prove di fermentazione, una per ogni lievito testato ed un pool con tutti i lieviti ad esclusione di *S. boulardi*. Tutte le prove contenevano il batterio *Lb. casei Shiota*. Una prova allestita senza lieviti ma soltanto con il *Lb. casei Shiota* è stata utilizzata come controllo.

Concentrazione finale di lieviti e batteri inoculati in ciascuna prova:

prova C+ = *Lb. casei Shiota* 10^8 cell/ml

prova C. z. 13 = *Lb. casei Shiota* 10^8 cell/ml + *C. zeylanoides* 10^3 cell/ml

prova D. h. 36 = *Lb. casei Shiota* 10^8 cell/ml + *D. hansenii* (Biotipo III) 10^3 cell/ml

prova D. h. 78 = *Lb. casei Shiota* 10^8 cell/ml + *D. hansenii* (Biotipo XVI) 10^3 cell/ml

prova K. l. 80 = *Lb. casei Shiota* 10^8 cell/ml + *K. lactis* 10^3 cell/ml

prova Y. l. 92 = *Lb. casei Shiota* 10^8 cell/ml + *Y. lipolytica* 10^3 cell/ml

prova pool lieviti = *Lb. casei Shiota* 10^8 cell/ml + *C. zeylanoides* 10^3 cell/ml + *D. hansenii* (36) 10^3 cell/ml + *D. hansenii* (78) 10^3 cell/ml + *K. lactis* 10^3 cell/ml + *Y. lipolytica* 10^3 cell/ml

prova codex = *Lb. casei Shirota* 10^8 cell/ml + *S. boulardi* 10^3 cell/ml

Tutte le prove sono state condotte in doppio.

3.2.2 SECONDA PROVA DI FERMENTAZIONE: RIMODULAZIONE DEL POOL MICROBICO E APPLICAZIONE SU VARI TIPI DI LATTE

Nella seconda prova di fermentazione sono stati utilizzati tutti i lieviti descritti nel punto 3.1 ad eccezione di *S. boulardi*. Riguardo all'inoculo dei batteri, oltre a *Lb. casei Shirota* sono stati utilizzati un pool di batteri appartenenti al genere *Bifidobacterium* come descritti nel paragrafo 3.1. In questa seconda fermentazione sono state utilizzate diverse matrici: latte di mucca UHT intero (Ultra High Temperature), latte di mucca UHT senza lattosio, latte di capra UHT, latte di pecora UHT e latte di bufala pastorizzato.

Per ogni matrice, latte di mucca UHT intero, UHT senza lattosio e latte capra UHT sono state allestite sette prove di fermentazione, una per ogni lievito testato ed un pool con tutti i lieviti. Tutte le prove contenevano il batterio *Lb. casei Shirota* e il mix di batteri appartenenti al genere *Bifidobacterium*. Una prova allestita senza lieviti ma soltanto con il *Lb. casei Shirota* e con il pool di *Bifidobacterium spp.* è stata utilizzata come controllo.

Alla luce dei risultati ottenuti nella prova preliminare di fermentazione sono state apportate modifiche alle concentrazioni di inoculo di lieviti e batteri:

prova C+= *Lb. casei Shirota* 5×10^7 cell/ml + pool *Bifidobacterium spp.* 5×10^7 cell/ml

prova C. z. 13 = *Lb. casei Shirota* 5×10^7 cell/ml + pool *Bifidobacterium spp.* 5×10^7 cell/ml
+ *C. zeylanoides* 5×10^2 cell/ml

prova D. h. 36 = *Lb. casei Shirota* 5×10^7 cell/ml + pool *Bifidobacterium spp.* 5×10^7 cell/ml
+ *D. hansenii* (Biotipo III) 5×10^3 cell/ml

prova D. h. 78 = *Lb. casei Shirota* 5×10^7 cell/ml + pool *Bifidobacterium spp.* 5×10^7 cell/ml + *D. hansenii* (Biotipo XVI) 5×10^3 cell/ml

prova K. l. 80 = *Lb. casei Shirota* 5×10^7 cell/ml + pool *Bifidobacterium spp.* 5×10^7 cell/ml + *K. lactis* 10^3 cell/ml

prova Y. l. 92 = *Lb. casei Shirota* 5×10^7 cell/ml + pool *Bifidobacterium spp.* 5×10^7 cell/ml + *Y. lipolytica* 5×10^2 cell/ml

prova pool lieviti = *Lb. casei Shirota* 5×10^7 cell/ml + pool *Bifidobacterium spp.* 5×10^7 cell/ml + *C. zeylanoides* 5×10^2 cell/ml + *D. hansenii* (36) 5×10^3 cell/ml + *D. hansenii* (78) 5×10^3 cell/ml + *K. lactis* 10^3 cell/ml + *Y. lipolytica* 5×10^2 cell/ml

Per le restanti due matrici, latte di pecora e latte di bufala le fermentazioni sono state allestite come per le matrici descritte sopra con l'unica eccezione di non aver utilizzato il pool di *Bifidobacterium spp.* ed aumentato la concentrazione di *Lb. casei Shirota* ad 1×10^8 cell/ml. Tutte le prove sono state condotte in doppio in barattolini di vetro contenenti 150 ml di campione per le matrici latte di mucca intero, senza lattosio e latte di capra e 100 ml per le matrici latte di pecora e latte di bufala.

La fermentazione è stata condotta a 25° C per 24 ore, le prove sono state poi conservate a 4° C per cinque settimane (Figura 3).



Figura 3 – Allestimento seconda prova di fermentazione.

3.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE

3.3.1 TERRENI DI COLTURA

I terreni di coltura utilizzati sono:

YPD Agar (Yeast extract – Peptone – Dextrose), utilizzato per il mantenimento, la conservazione e le conte vitali su piastra dei lieviti, ed è costituito da:

- Estratto di lievito (1%);
- Peptone (2%);
- Glucosio (2%);
- Agar (1,8%).

Con aggiunta di cloramfenicolo (100 µl/100 ml) per contrastare la crescita dei batteri.

MRS Agar (Man – Rogosa – Shape), utilizzato per il mantenimento, la conservazione e le conte vitali su piastra dei batteri, ed è costituito da:

- Glucosio 20,0 g/l;

- Agar 15,0 g/l;
- Peptospecial 10,0 g/l;
- Estratto di carne 10,0 g/l;
- Estratto di lievito 5,0 g/l;
- Acetato di sodio 5,0 g/l;
- Idrogeno fosfato di potassio 2,0 g/l;
- Ammonio citrato 2,0 g/l;
- Magnesio solfato 0,2 g/l;
- Manganese solfato 0,05 g/l.

Con aggiunta di L – Cyst nella seconda prova di fermentazione per favorire la crescita dei *Bifidobacterium spp.* dove impiegati.

WL Nutrient Agar (Wallerstein Laboratory), utilizzato per il mantenimento, la conservazione e le conte vitali su piastra del pool dei lieviti essendo un terreno differenziale che permette il riconoscimento di specie differenti, il terreno contiene:

- Destrosio 50,0 g/l;
- Agar 20,0 g/l;
- Triptone 5,0 g/l;
- Estratto di lievito 4,0 g/l;
- Potassio fosfato monobasico 0,55 g/l;
- Cloruro di potassio 0,425 g/l;
- Solfato di magnesio 0,125 g/l;
- Cloruro di calcio 0,125 g/l;
- Verde di bromocresolo 0,022 g/l;

- Cloruro di ferro 0,0025 g/l;
- Solfato di manganese 0,0025 g/l.

Con aggiunta di cloramfenicolo (100 µl/100 ml) per contrastare la crescita dei batteri.

3.3.2 CONTE VITALI

Al momento dell'inoculo, per tutte le prove, sono state eseguite delle conte vitali su piastra per avere conferma del numero di unità formanti colonie/ml dei lieviti e batteri inoculati. Per effettuare le conte vitali sono state eseguite delle diluizioni seriali (Figura 4).

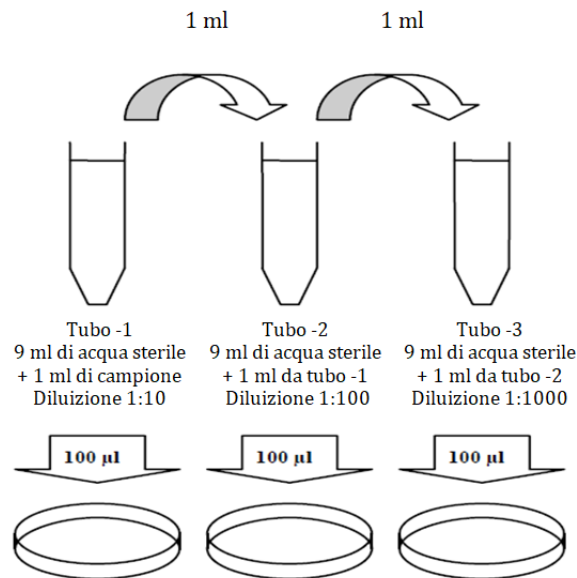


Figura 4 – Diluizioni seriali.

È stato prelevato 1 ml dal campione originario ed è stato posto in una provetta contenente 9 ml di acqua sterile ottenendo una diluizione 1:10 (10^{-1}), dopo aver agitato è stato prelevato da questa 1 ml e posto in un'altra provetta contenente 9 ml di acqua sterile. Si è proceduto così fino ad ottenere le diluizioni corrette per l'inoculo.

Successivamente sono stati trasferiti 100 µl di ogni sospensione sulle piastre Petri, precedentemente preparate con il terreno YPD Agar + cloramfenicolo, MRS Agar (+ L – Cyst nella seconda prova di fermentazione) e WL Nutrient Agar + cloramfenicolo.

Poi con una bacchetta di vetro ad “L”, dopo essere stata immersa in alcol, fatta passare alla fiamma, raffreddata sul bordo della piastra, è stato effettuato lo spatolamento per diffusione cellulare. Le piastre sono state messe ad incubare, a 25° C per i lieviti e a 37° C per i batteri all’interno di giare da laboratorio per ottenere un ambiente anaerobico. Dopo il periodo di incubazione sono state contate le colonie cresciute (Figura 5).

Le conte vitali, per monitorare la crescita dei lieviti e dei batteri nel tempo, sono state eseguite secondo la seguente periodicità:

Prova preliminare di fermentazione: Tempo T0, T24ore, e durante lo stoccaggio (una conta a settimana per tutte le otto settimane).

Seconda prova di fermentazione: Tempo T0, T24ore e alla quinta settimana.

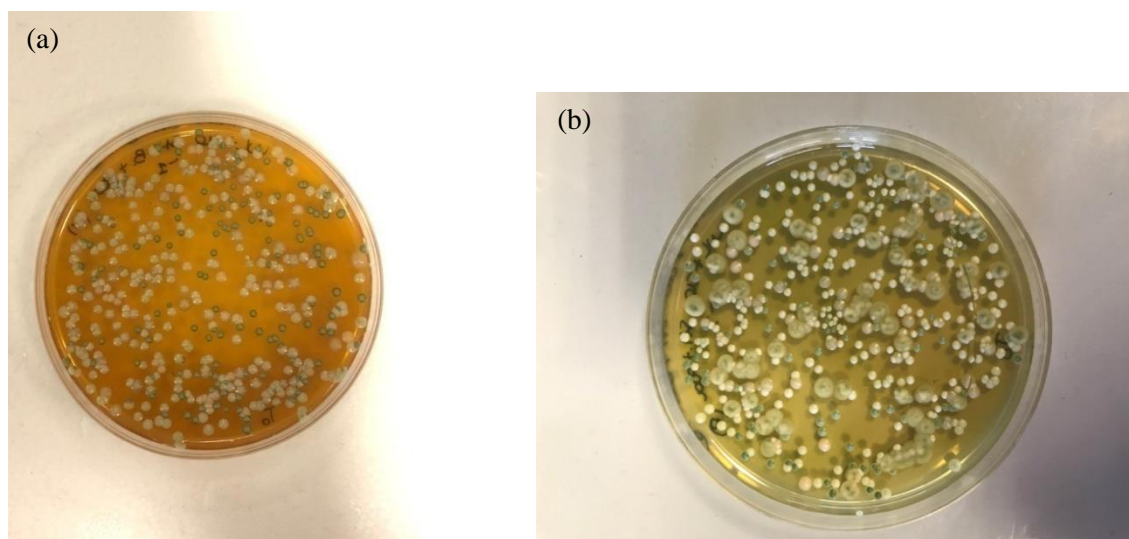


Figura 5 – Piastra WL Nutrient Agar, prova preliminare di fermentazione, prova pool lieviti in latte di mucca intero, Tempo T0 (a). Piastra WL Nutrient Agar, seconda prova di fermentazione, prova pool lieviti in latte di pecora, Tempo T0 (b).

3.4 ANALISI CHIMICHE

3.4.1 DETERMINAZIONE DEL LATTOSIO

Per saggiare la quantità di lattosio presente prima della fermentazione, dopo 24 ore e al termine del periodo di conservazione, è stato utilizzato il kit Megazyme per la ricerca di lattosio/galattosio/D – glucosio.

I campioni sono stati preparatiseguendo il protocollo del kit:

sono stati pesati accuratamente 0,5 g di campione all'interno di un test – tube di vetro dove sono stati aggiunti 5,0 ml di etanolo (95% v/v). Tutti i tubi sono stati incubati in bagno termostatico a 85° – 90° C per 5 minuti (inattivazione degli enzimi endogeni) e poi quantitativamente trasferiti in matracci da 50 ml con sodium acetate buffer portandoli a volume. Infine tutte le soluzioni dei campioni sono state filtrate con carta da filtro in sterilin e utilizzate per la preparazione della soluzione X.

Soluzione X: 1,0 ml di filtrato del campione + 3.0 ml di acqua distillata

Il kit contiene:

Bottiglia 1 → β – fruttosidasi (invertasi) (lievito; 5 ml) più benzoato di sodio (0.2% p/v).

Diluire 0.1 ml del contenuto della bottiglia 1 in 10 ml di sodium acetate buffer (50 mM, pH 4.5) (Sol.1)

Bottiglia 2 → β – galattosidasi (lattasi; *Aspergillus niger*, 1 ml). Disciogliere il contenuto Della bottiglietta 2 in 19 ml di sodium acetate buffer (Sol.2)

Bottiglia 3 → GOPOD Reagent buffer (50 ml, pH 7.4), acido p – idrossibenzoico e sodio azide (0.095% p/v).

Bottiglia 4 → GOPOD Reagent enzymes. Glucosio ossidasi, perossidasi e 4 – amino antipirina

Diluire il contenuto della bottiglia 3 in 1L di acqua distillata (Sol.3).

Dissolvere il contenuto della bottiglietta 4 in 20 ml di Sol. 3 e poi ritrasferire il tutto all'interno della bottiglia contenente la Sol. 3 (GOPOD reagent).

Bottiglia 5 → Soluzione standard D – glucosio (5 ml, 1.0 mg / ml) in 0.2% (p/v) di acido Benzoico (Sol. 5)

Bottiglia 6 → Farina, campione di controllo (Sol. 6)

Una volta preparati il campione e le soluzioni si procede all'analisi seguendo il protocollo del kit con la preparazione delle soluzioni (Figura 6):

Bianco: 0.4 ml di acqua distillata

Glucosio: 0.1 ml di soluzione 5 + 0.3 ml di acqua distillata

Devono poi essere preparate tre differenti reazioni per il controllo (Sol. 6) e tre per tutti i campioni, nel seguente modo ed in doppio:

Reazione A: 0.2 ml di soluzione X (o Sol. 6) + 0.2 ml di sodium acetate buffer

Reazione B: 0.2 ml di soluzione X (o Sol. 6) + 0.2 ml di Sol. 1

Reazione C: 0.2 ml di soluzione X (o Sol. 6) + 0.2 ml di Sol. 2

Il tutto deve essere incubato a 50° C per 20 minuti, trascorso questo tempo devono essere aggiunti 3.0 ml di GOPOD Reagent al bianco, glucosio, controllo e campioni e il tutto deve essere incubato una seconda volta a 50° C per 20 minuti.

Il saccarosio viene idrolizzato a D – glucosio e D – fruttosio dall'enzima invertasi.

Il lattosio viene idrolizzato a D – glucosio e D – galattosio dalla β – galattosidasi (lattasi) di *A. niger*. Il D – glucosio viene convertito in D – gluconato dall'enzima glucosio ossidasi in presenza di ossigeno e acqua.

L'enzima, la perossidasi (POD) catalizza la reazione che coinvolge perossido di idrogeno (H₂O₂), acido p – idrossibenzoico e 4 – amino antipirina con formazione quantitativa del

colorante chinoneimmina. La quantità di colorante chinoneimmina formato a seguito della reazione è in rapporto stechiometrico con la quantità di D – glucosio.

Si passa infine alla misurazione dell'assorbanza a 510 nm (assorbanza del colorante) sottraendo il valore di assorbanza del bianco all'assorbanza del glucosio, del campione di controllo e delle assorbanze di tutti i campioni, ricavando così i valori di ΔA , ΔB e ΔC .

In seguito alla misurazione delle assorbanze occorre eseguire i calcoli riportati sotto per poter determinare la concentrazione del lattosio:

Determinazione del lattosio:

$$\text{Lattosio \% w/w} = (\Delta C - \Delta A) \times F \times 0.38$$

dove $F = 100$ (μg di glucosio) / assorbanza di $100 \mu\text{g}$ di glucosio

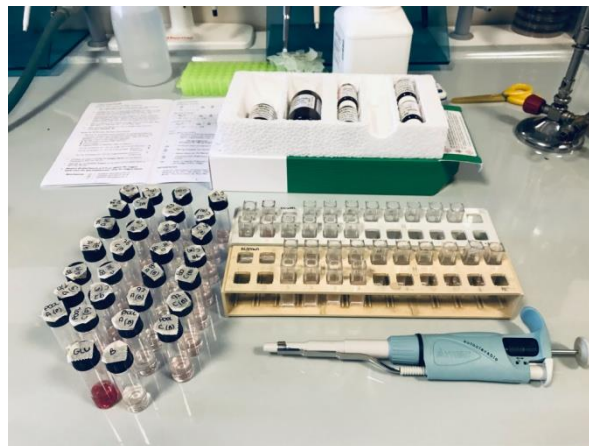


Figura 6 – Preparazione campioni per il kit.

La concentrazione di lattosio è stata valutata con la seguente periodicità:

Seconda prova di fermentazione: Tempo T0, T24ore, e alla quinta settimana.

3.4.2 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO LATTICO

Per saggiare la quantità di acido lattico prodotto in seguito alla fermentazione, è stato utilizzato il kit Megazyme per la ricerca dell'acido lattico. Il campione è stato prima preparato seguendo il protocollo del kit:

è stato pesato 1 g di campione all'interno di un matraccio da 100 ml dove sono stati aggiunti 60 ml di acqua distillata, 2 ml di soluzione Carrez I, 2 ml di soluzione di Carrez II e 4 ml di NaOH (100 mM). Una volta portato a volume il matraccio la soluzione viene filtrata con carta filtro in sterilin, il campione è pronto.

Il kit contiene:

Bottiglia 1 → Buffer (25 ml, pH 10.0), D – glutammato e sodio azide (0.02% p / v)

(Sol. 1)

Bottiglia 2 → NADP + / PVP (disciogliere in 5.5 ml di acqua distillata) (Sol. 2)

Bottiglia 3 → D – glutammato – piruvato transaminasi (1.1 ml) (Sol. 3)

Bottiglia 4 → L – lattato deidrogenasi (1.1 ml) (Sol. 4)

Bottiglia 5 → Soluzione standard di acido L – lattico (5 mL, 0.15 mg/ml) in 0.02% (p/v) di sodio azide (Sol. 5)

Una volta preparati il campione e le soluzioni si procede all'analisi seguendo il protocollo riportato nella tabella sottostante (Tabella 3).

Pipettare in cuvetta	Bianco	Campione	Controllo
Acqua distillata	0.80 ml	0.75 ml	0.75 ml
Sol. 5	/	/	0.05 ml
Campione	/	0.05 ml	/
Sol. 1	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
Sol. 2	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
Sol. 3	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Mixare e leggere l'assorbanza (A1) a 340 nm approssimativamente dopo 5 minuti e far partire la reazione con l'aggiunta di:			
Sol. 4	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Mixare e leggere l'assorbanza (A2) a 340 nm approssimativamente dopo 10 minuti. Se la reazione non si ferma rileggere l'assorbanza ad intervalli di 5 minuti fino a che il valore non si fissa.			

Tabella 3 – Protocollo per la determinazione dell'acido lattico.

La quantificazione dell'acido lattico richiede due reazioni enzimatiche. La prima reazione è catalizzata dalla lattato deidrogenasi (L – LDH), l'acido lattico (lattato) è ossidato a piruvato dalla nicotinammide adenina dinucleotide (NAD⁺).

Tuttavia, poiché l'equilibrio di questa prima reazione è decisamente a favore dell'acido lattico e del NAD⁺, è necessaria una seconda reazione per "intrappolare" il piruvato prodotto. Ciò si ottiene convertendo il piruvato in D – alanina e 2 – ossoglutarato, grazie all'azione dell'enzima D – glutammato – piruvato transaminasi (D – GPT) in presenza di un grande eccesso di D – glutammato.

La quantità di NADH formato dalla reazione accoppiata precedente è in rapporto stechiometrico con la quantità di acido lattico. Infine si misura l'assorbanza a 340 nm del NADH prodotto.

In seguito alla misurazione delle assorbanze occorre eseguire i calcoli riportati sotto per poter determinare la concentrazione dell'acido lattico.

Determinazione dell'acido lattico:

$$\Delta A_{\text{acido lattico}} = (A2 - A1)_{\text{campione}} - (A2 - A1)_{\text{bianco}}$$

$$\text{Concentrazione acido lattico (g/l)} = \Delta A_{\text{acido lattico}} \times 0.3204 \times \text{F.D.}$$

F.D. = fattore di diluizione

La concentrazione dell'acido lattico è stata valutata con la seguente periodicità:

Prova preliminare di fermentazione: Tempo T0, T24ore, alla quinta settimana e all'ottava settimana.

Seconda prova di fermentazione: Tempo T0, T24ore, e alla quinta settimana.

3.4.3 DETERMINAZIONE DELL'ACIDO ACETICO

Per saggiare la quantità di acido acetico prodotto in seguito alla fermentazione, è stato utilizzato il kit Megazyme per la ricerca dell'acido acetico. Il campione è stato prima preparato seguendo il protocollo del kit:

sono stati pesati accuratamente 5 g di campione all'interno di un matraccio da 100 ml dove sono stati aggiunti 50 ml di acqua distillata. I matracci sono stati riscaldati a 50 – 60° C in bagno termostatico per 20 minuti, lasciati raffreddare, portati a volume e posti a 4° C per 30 minuti. Infine la soluzione è stata filtrata con carta filtro in sterilin, il campione è pronto.

Il kit contiene:

Bottiglia 1 → Buffer (30 mL, pH 8.4) più acido L – malico e sodio azide (0.02% p / v) (Sol.

1)

Bottiglia 2 → NAD⁺ più ATP, PVP e CoA (disciogliere in 5.5 ml di acqua distillata)

(Sol. 2)

Bottiglia 3 → L – malato deidrogenasi più citrato sintasi (1.1 mL) (Sol. 3)

Bottiglia 4 → Acetil – coenzima A sintetasi (1.1 mL) (Sol. 4)

Bottiglia 5 → Soluzione standard di acido acetico (5 mL, 0.10 mg/mL) (Sol. 5)

Una volta preparati il campione e le soluzioni si procede all'analisi seguendo il protocollo riportato nella tabella sottostante (Tabella 4).

Pipettare in cuvetta	Bianco	Campione	Controllo
Acqua distillata	1.05 ml	1.00 ml	1.00 ml
Sol. 5	/	/	0.05 ml
Campione	/	0.05 ml	/
Sol. 1	0.25 ml	0.25 ml	0.25 ml
Sol. 2	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml
Mixare e leggere l'assorbanza (A0) a 340 nm approssimativamente dopo 3 minuti e far partire la reazione con l'aggiunta di:			
Sol. 3	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Mixare e leggere l'assorbanza (A1) a 340 nm approssimativamente dopo 4 minuti e far partire la reazione con l'aggiunta di:			
Sol. 4	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Mixare e leggere l'assorbanza (A2) a 340 nm approssimativamente dopo 12 minuti. Se la reazione non si ferma rileggere l'assorbanza ad intervalli di 4 minuti fino ad un massimo di 20 minuti.			

Tabella 4 – Protocollo per la determinazione dell'acido acetico.

L'acetil – coenzima A sintetasi (ACS) in presenza di adenosina – 5' – trifosfato (ATP) e del coenzima A (CoA) converte l'acido acetico (acetato) in acetil – CoA, con la formazione di adenosina – 5' – monofosfato (AMP) e pirofosfato. La citrato sintasi (CS), in presenza di acetil – CoA, converte l'ossalacetato in citrato. L'ossalacetato richiesto nella reazione precedente è formato a partire dall'L – malato e nicotinammide – adenina dinucleotide (NAD⁺) in presenza di L – malato deidrogenasi (L – MDH).

In questa reazione, il NAD^+ è ridotto a NADH . Si misura infine l'assorbanza a 340 nm del NADH prodotto.

In seguito alla misurazione delle assorbanze occorre eseguire i calcoli riportati sotto per poter determinare la concentrazione dell'acido acetico.

Determinazione dell'acido acetico:

$$\Delta A_{\text{acetic acid}} = \left[(A_2 - A_0)_{\text{sample}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{sample}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{sample}}} \right] - \left[(A_2 - A_0)_{\text{blank}} - \frac{(A_1 - A_0)_{\text{blank}}^2}{(A_2 - A_0)_{\text{blank}}} \right]$$

Concentrazione acido acetico (g/l) = $\Delta A_{\text{acido acetico}} \times 0.2707 \times \text{F.D.}$

F.D. = fattore di diluizione

La concentrazione dell'acido acetico è stata valutata con la seguente periodicità:

Prova preliminare di fermentazione: Tempo T_0 , $T_{24\text{ore}}$, alla quinta e all'ottava settimana.

Seconda prova di fermentazione: Tempo T_0 , $T_{24\text{ore}}$ e alla quinta settimana.

3.4.4 DETERMINAZIONE DELL'ETANOLO

Per saggiare la quantità di etanolo prodotto in seguito alla fermentazione, è stato utilizzato il kit Megazyme per la ricerca dell'etanolo.

Il kit contiene:

Bottiglia 1 → Buffer (15mL, pH 9.0) più sodio azide (0.02% p / v) (Sol. 1)

Bottiglia 2 → NAD^+ (disciogliere in 12.4 ml di acqua distillata) (Sol. 2)

Bottiglia 3 → Aldeide deidrogenasi (3.25 mL) (Sol. 3)

Bottiglia 4 → Alcol deidrogenasi (1.3 mL) (Sol. 4)

Bottiglia 5 → Soluzione standard di etanolo (5 mL, 5 mg/mL) (diluire 0.5 ml del contenuto della bottiglia 5 in 50 ml di acqua distillata) (Sol.5)

Una volta preparate le soluzioni si procede all'analisi seguendo il protocollo riportato nella tabella sottostante (Tabella 5).

Pipettare in cuvetta	Bianco	Campione	Controllo
Acqua distillata	1.05 ml	1.00 ml	1.00 ml
Sol. 5	/	/	0.05 ml
Campione	/	0.05 ml	/
Sol. 1	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml
Sol. 2	0.10 ml	0.10 ml	0.10 ml
Sol. 3	0.025 ml	0.025 ml	0.025 ml
Mixare e leggere l'assorbanza (A1) a 340 nm approssimativamente dopo 2 minuti e far partire la reazione con l'aggiunta di:			
Sol. 4	0.01 ml	0.01 ml	0.01 ml
Mixare e leggere l'assorbanza (A2) a 340 nm approssimativamente dopo 5 minuti. Se la reazione non si ferma rileggere l'assorbanza ad intervalli di 1 minuto fino a che il valore non aumenta in maniera costante.			

Tabella 5 – Protocollo per la determinazione dell'etanolo.

Per quantificare l'etanolo sono richieste due reazioni enzimatiche. La prima reazione è catalizzata dall'alcol deidrogenasi (ADH), l'etanolo viene ossidato ad acetaldeide dall'enzima nicotinammide – adenina dinucleotide (NAD⁺). Tuttavia, poiché l'equilibrio della recedente reazione è a favore dell'etanolo e del NAD⁺, è necessaria un'ulteriore reazione per "intrappolare" i prodotti.

Questa seconda reazione prevede l'ossidazione quantitativa dell'acetaldeide in acido acetico in presenza dell'aldeide deidrogenasi (Al – DH) e NAD⁺.

La quantità di NADH formato a seguito di queste due reazioni in è in rapporto stechiometrico con il doppio della quantità di etanolo. Si passa infine alla misura dell'assorbanza del NADH a 340 nm.

In seguito alla misurazione delle assorbanze occorre eseguire i calcoli riportati sotto per poter determinare la concentrazione dell'etanolo.

Determinazione dell'etanolo:

$$\Delta A_{\text{etanolo}} = (A_2 - A_1)_{\text{campione}} - (A_2 - A_1)_{\text{bianco}}$$

$$\text{Concentrazione etanolo (g/l)} = \Delta A_{\text{etanolo}} \times 0.09397 \times \text{F.D.}$$

$$\text{Concentrazione etanolo (\% v/v)} = \Delta A_{\text{etanolo}} \times 0.01190 \times \text{F.D.}$$

F.D. = fattore di diluizione

La concentrazione dell'etanolo è stata valutata con la seguente periodicità:

Prova preliminare di fermentazione: Tempo T0, T24ore, alla quinta e all'ottava settimana.

Seconda prova di fermentazione: Tempo T0, T24ore e alla quinta settimana.

3.4.5 DETERMINAZIONE PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE

Al termine del periodo di stoccaggio, per la prova preliminare di e per la seconda prova di fermentazione, sono stati analizzati i principali prodotti secondari di fermentazione quali acetaldeide, etilacetato, n – propanolo, isobutanolo, acetoino, alcol amilico e isoamilico.

L'analisi è stata effettuata per tutti i kefir prodotti ad eccezione di quelli con latte di bufala.

Ogni composto è stato quantificato attraverso la microestrazione in fase solida (HS – SPME) seguendo la procedura descritta da Dertli et al. (2017) con alcune modificazioni: 5 ml di kefir omogeneizzato, 1 g di NaCl e 162 mg/l di 1 – pentanolo (usato come standard) sono

stati posti in una vial di vetro da 20 ml e poi sigillata. Il campione è stato miscelato a 120 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente, poi la vial è stata posta a 55° C con la fibra HS – SPME esposta allo spazio di testa per 50 min.

I composti sono stati desorbiti inserendo la fibra divinilbenzene/carbossene/polidimetilsilossano (Sigma – Aldrich, St.Louis, Missouri, USA) nell'iniettore GC del gascromatografo Shimadzu (GC – 2014; Shimadzu, Kjoto, Giappone).

La colonna utilizzata era: 0,25 µm Supelcowax 10, lunghezza 60 m, diametro interno 0,32 mm. Ciascun composto è stato quantificato mediante confronto con curve di calibrazione esterne.

3.5 ANALISI SENSORIALI

Al termine delle cinque settimane per la seconda prova di fermentazione, il kefir prodotto con le varie matrici, latte di mucca con e senza lattosio, capra e pecora è stato sottoposto ad analisi sensoriale. Il test è stato allestito sulla base di alcuni descrittori riguardanti l'aspetto visivo (colore, texture omogenea e viscosità), le note aromatiche (odore tipico del kefir) e le principali caratteristiche strutturali (acidità, dolcezza, amaro e frizzantezza) (Figura 7). Ad un gruppo di assaggiatori è stato chiesto di esprimere un parere per ogni categoria e sulla gradevolezza generale del prodotto, dando un punteggio da 1 a 10.

I dati ottenuti sono stati utilizzati per costruire dei grafici che forniscono informazioni sia sul contributo di ciascun descrittore sulla qualità organolettica complessiva dei kefir, sia sulle differenze significative tra i vari kefir in relazione ad ogni descrittore.

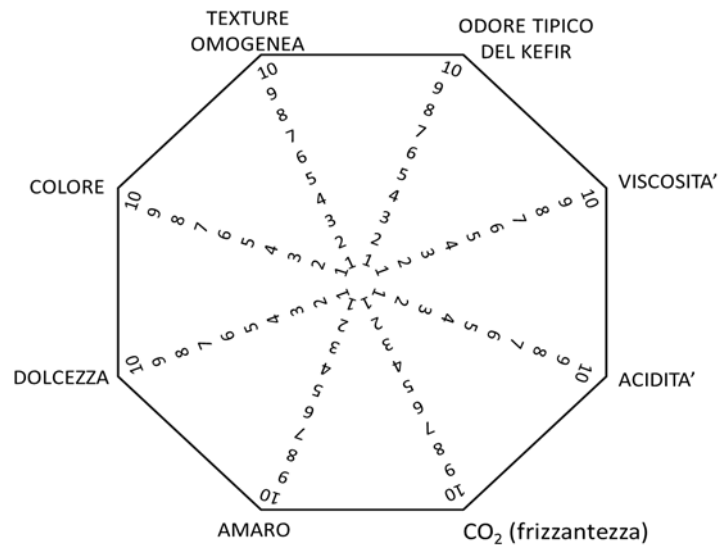


Figura 7 – Principali descrittori per l'analisi sensoriale.

3.6 ANALISI STATISTICA

I dati sperimentali sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) utilizzando il pacchetto software statistico JMP® 11. Le differenze significative sono state determinate utilizzando i Duncan tests con valori p associati < 0.05.

CAPITOLO 4 – RISULTATI

4.1 RISULTATI PROVA PRELIMINARE DI FERMENTAZIONE

4.1.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA

La trasformazione del latte in kefir è stata valutata e confermata dall'avvenuta formazione del coagulo in tutte le prove dopo 24 ore di incubazione a 25° C, in seguito all'inoculo di *Lb. casei Shirota* (con o senza il pool di bifidobatteri) come starter lattico.

Questa è una conseguenza dell'abbassamento del pH dovuto alla fermentazione lattica ad opera di *Lb. casei Shirota*. Infatti, il pH del latte è sceso dopo le 24 ore di fermentazione, da 6.4 a circa 4.5 in tutte le prove, ad eccezione di quella condotta da *Lb. casei Shirota* e *D. hansenii* 36, la quale ha mostrato un valore di pH leggermente superiore, di 4.87 (Figura 8).

Durante il periodo di conservazione a 4° C, tutte le prove hanno continuato a mostrare una riduzione del pH, seppur più graduale, fino a raggiungere, al termine dello stoccaggio, valori compresi fra 3.63 – 3.86.

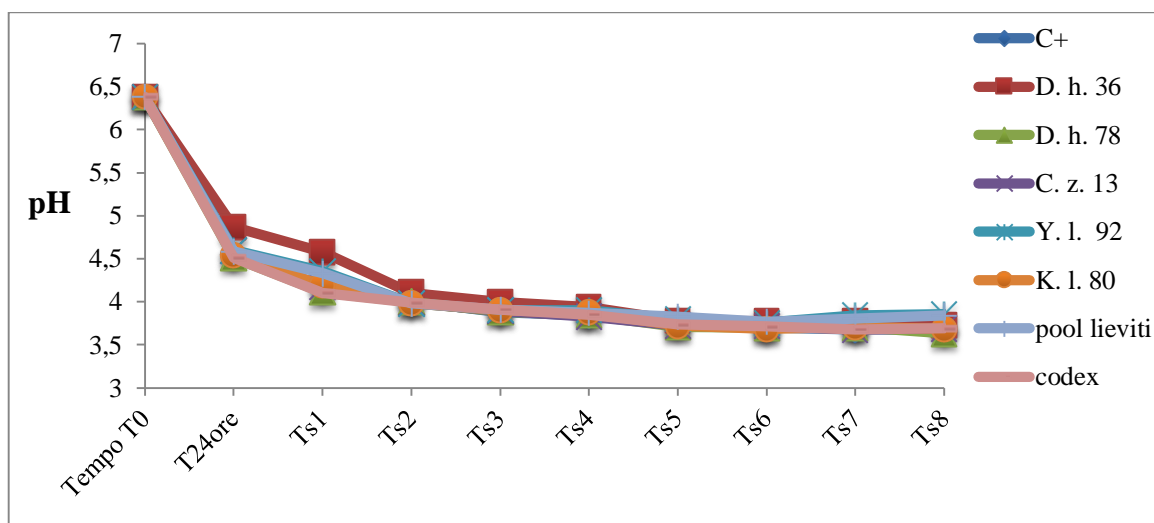


Figura 8 – Monitoraggio del pH nel tempo, T = tempo, s1 = settimana 1, s2 = settimana 2, s3 = settimana 3, s4 = settimana 4, s5 = settimana 5, s6 = settimana 6, s7 = settimana 7 e s8 = settimana 8.

4.1.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA

Tutte le prove sono state sottoposte a conta vitale su piastra per valutare l'effettiva vitalità dei lieviti e batteri impiegati e l'interazione fra di loro.

Le conte sono state effettuate al momento dell'inoculo (tempo T0), dopo 24 ore dall'inoculo (T24ore) e ogni settimana fino all'ottava.

Riguardo l'andamento nel tempo di *Lb. casei Shiota* (Figura 9), esso ha mostrato in tutte le prove un incremento di circa 1.5 ordini di grandezza dopo 24 ore di fermentazione, passando da una concentrazione di circa 8.20 Log UFC/ml a circa 9.35 Log UFC/ml. Questo valore di cellule vitali è stato mantenuto durante tutto il periodo di stoccaggio a 4° C (otto settimane) con eccezione della prova condotta da *Lb. casei Shiota* e *Y. lipolytica* 92. In quest'ultimo caso, la vitalità del batterio è iniziata a decrescere a partire dalla sesta settimana, fino a raggiungere all'ottava settimana i valori iniziali di inoculo.

Riguardo la cinetica di crescita dei lieviti nel tempo (Figura 10), hanno mostrato un andamento variabile, ceppo specifico. In particolare, le prove condotte dai lieviti *Y. lipolytica* 92, *C. zeylanoides* 13, *K. lactis* 80 e il pool hanno mantenuto un andamento di crescita microbica pressoché costante dall'inizio alla fine, raggiungendo valori intorno compresi fra 6,00 Log UFC/ml – 7,00 Log UFC/ml. Un andamento incostante è stato osservato per il *D. hansenii* 36, mentre il lievito *D. hansenii* 78 non è stato più rilevato a partire dalla terza settimana. Il ceppo commerciale di *S. cerevisiae* (codex) è stato quello che ha mostrato la minore entità di sviluppo nel tempo.

Analizzando l'andamento di crescita nel tempo dei lieviti nel pool (Figura 11), *Y. lipolytica* 92 e *C. zeylanoides* 13 prendono il netto sopravvento sugli altri lieviti, che scompaiono a partire dalla seconda e terza settimana di stoccaggio per entrambi i ceppi di *D. hansenii* 36 e 78 e *K. lactis* 80, rispettivamente.

Dai grafici è comunque possibile affermare che, fatta eccezione per la prova condotta da *D. hansenii* 78, i batteri non sembrano interferire negativamente con la crescita e/o il mantenimento dei lieviti e viceversa, infatti tutti rimangono vivi e vitali fino alla fine dello stoccaggio.

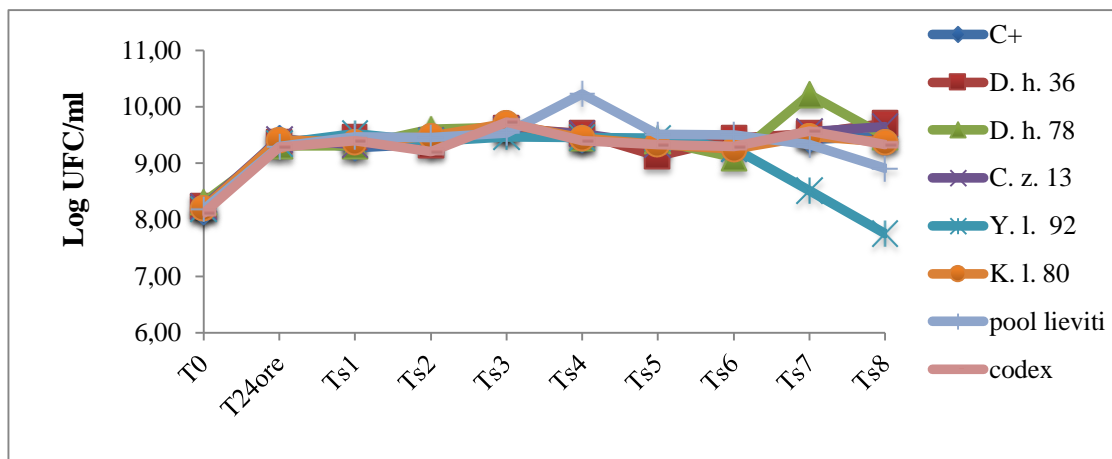


Figura 9 – Andamento crescita *Lb. casei* Shirota nel tempo, T0 = tempo 0, s1 = settimana 1, s2 = settimana 2, s3 = settimana 3, s4 = settimana 4, s5 = settimana 5, s6 = settimana 6, s7 = settimana 7 e s8 = settimana 8.

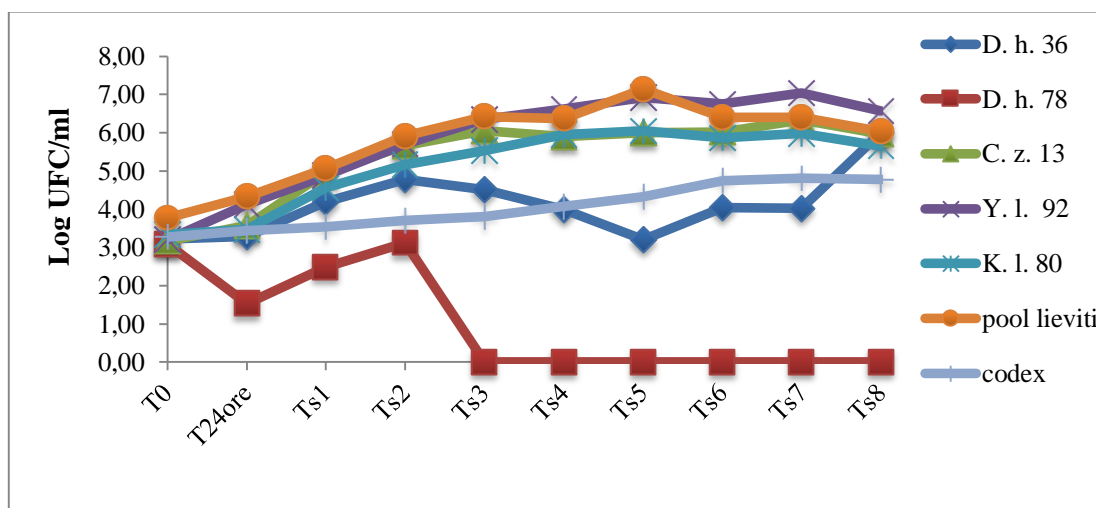


Figura 10 – Andamento crescita lieviti nel tempo, T0 = tempo 0, s1 = settimana 1, s2 = settimana 2, s3 = settimana 3, s4 = settimana 4, s5 = settimana 5, s6 = settimana 6, s7 = settimana 7 e s8 = settimana 8.

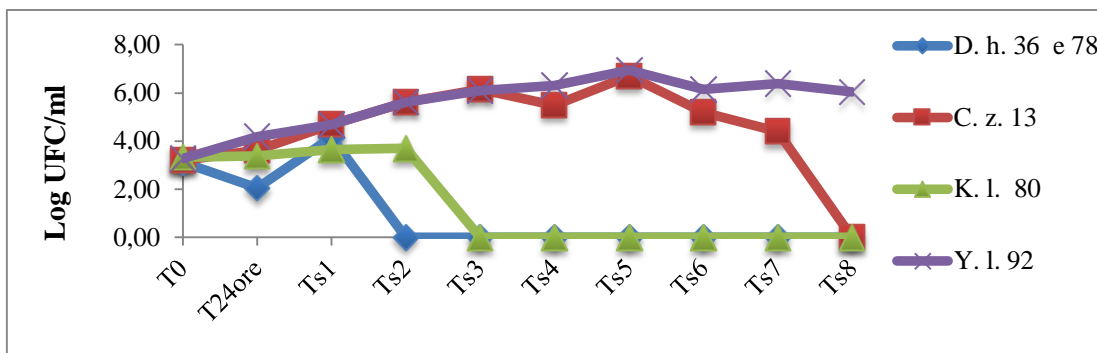


Figura 11 – Andamento pool lieviti nel tempo, T0 = tempo 0, s1 = settimana 1, s2 = settimana 2, s3 = settimana 3, s4 = settimana 4, s5 = settimana 5, s6 = settimana 6, s7 = settimana 7 e s8 = settimana 8.

4.1.3 ANALISI CHIMICHE

I principali prodotti di fermentazione valutati sono stati: acido lattico, acido acetico ed etanolo. Le analisi sono state effettuate dopo le 24 ore di fermentazione (T24ore) e dopo una (Ts1), cinque (Ts5) e otto settimane (Ts8) di stoccaggio a 4° C. I risultati sono riportati nella tabella seguente (Tabella 6).

PROVA	ACIDO LATTICO (g/l)				ACIDO ACETICO (g/l)				ETANOLO (% v/v)			
	T24ore	Ts1	Ts5	Ts8	T24ore	Ts1	Ts5	Ts8	T24ore	Ts1	Ts5	Ts8
C+	6.02 ± 0.07 ^a	6.66 ± 0.03 ^c	9.32 ± 0.14 ^d	18.00 ± 0.03 ^a	0.28 ± 0.04 ^c	0.44 ± 0.02 ^a	0.45 ± 0.02 ^c	0.48 ± 0.01 ^a	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.003 ± 0.00
D. h. 36	3.35 ± 0.04 ^{bcd}	5.49 ± 0.14 ^b	10.41 ± 0.14 ^{bc}	17.81 ± 0.14 ^c	0.21 ± 0.01 ^{bc}	0.31 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.01 ^d	0.16 ± 0.01 ^g	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.003 ± 0.00	0.008 ± 0.00
D. h. 78	4.05 ± 0.04 ^d	9.10 ± 0.04 ^f	14.16 ± 0.04 ^c	17.91 ± 0.05 ^a	0.30 ± 0.01 ^d	0.32 ± 0.01 ^b	0.37 ± 0.01 ^c	0.41 ± 0.00 ^e	0.001 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.001 ± 0.00	0.007 ± 0.00
C. z. 13	3.81 ± 0.04 ^{bc}	7.45 ± 0.00 ^a	10.79 ± 0.04 ^a	12.33 ± 0.14 ^a	0.28 ± 0.01 ^b	0.34 ± 0.01 ^b	0.37 ± 0.00 ^d	0.08 ± 0.00 ^c	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.002 ± 0.00	0.000 ± 0.00
Y. l. 92	3.94 ± 0.03 ^{bc}	5.86 ± 0.21 ^e	10.92 ± 0.49 ^c	16.95 ± 0.14 ^b	0.25 ± 0.01 ^c	0.32 ± 0.01 ^b	0.65 ± 0.02 ^a	0.14 ± 0.00 ^f	0.001 ± 0.00	0.001 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.002 ± 0.00
K. l. 80	4.29 ± 0.03 ^b	6.84 ± 0.01 ^c	10.89 ± 0.28 ^{bc}	12.78 ± 0.14 ^c	0.17 ± 0.01 ^e	0.26 ± 0.02 ^c	0.32 ± 0.00 ^e	0.07 ± 0.00 ^g	0.000 ± 0.00	0.003 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.004 ± 0.00
pool lieviti	3.94 ± 0.42 ^{cd}	6.45 ± 0.21 ^d	11.31 ± 0.14 ^b	17.97 ± 0.28 ^a	0.26 ± 0.01 ^c	0.28 ± 0.03 ^c	0.30 ± 0.01 ^e	0.30 ± 0.01 ^d	0.003 ± 0.00	0.002 ± 0.00	0.001 ± 0.00	0.001 ± 0.00
codex	3.81 ± 0.49 ^{cd}	7.30 ± 0.14 ^b	10.54 ± 0.03 ^c	17.91 ± 0.04 ^a	0.43 ± 0.01 ^a	0.45 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.01 ^b	0.45 ± 0.02 ^b	0.001 ± 0.00	0.002 ± 0.00	0.000 ± 0.00	0.000 ± 0.00

Tabella 6 – Analisi dei principali prodotti di fermentazione, T= tempo, s1= settimana 1, s5= settimana 5, s8= settimana 8. I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$). L'analisi statistica non è stata possibile eseguirla per l'etanolo in quanto i dati vengono considerati come gruppo omogeneo dal software utilizzato.

Dai risultati ottenuti emerge che la concentrazione di acido lattico prodotta in seguito a fermentazione è aumentata progressivamente durante lo stoccaggio a 4° C in tutte le prove raggiungendo un quantitativo di circa 10 – 11 g/l alla fine della quinta settimana, e continuando ad aumentare fino all'ottava raggiungendo valori fino a 18 g/l nella prova condotta dal solo *Lb. casei Shirota*. La prova che vede coinvolto il lievito *D. hansenii* 78 ha visto un incremento dell'acido lattico più repentino rispetto alle altre prove, passando da 4.04 g/l a 9.10 g/l in una settimana, a 14.16 g/l alla quinta settimana di stoccaggio, fino a raggiungere uno dei quantitativi più alti al termine dell'ottava settimana con 17.91 g/l.

Le prove condotte dal batterio lattico insieme a *C. zeylanoides* 13 e *K. lactis* 80 sono quelle che hanno mostrato il più basso contenuto di acido lattico al tempo Ts8 (c.a. 12 g/l), questo potrebbe suggerire una qualche interazione del lievito con l'attività fermentativa del batterio, responsabile della fermentazione lattica.

Allo stesso modo, anche la concentrazione di acido acetico è aumentata nel corso dello stoccaggio in maniera costante fino alla quinta settimana, raggiungendo valori compresi fra 0.30 e 0.65 g/l. Le prove C+, *D. hansenii* 78, pool lieviti e codex hanno mantenuto questi valori fino all'ottava settimana di stoccaggio, mentre per le restanti prove è stata rilevata una forte riduzione di questo acido a Ts8.

Riguardo il contenuto di etanolo, tutte le prove hanno mostrato valori prossimi a zero, indicando una quasi totale assenza di fermentazione alcolica da parte dei lieviti.

4.1.4 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE

Al termine dello stoccaggio di otto settimane sono stati saggiati i principali prodotti secondari di fermentazione in tutte le prove di fermentazione e in un campione di kefir industriale. I risultati sono riportati, in ppm (mg/l), nel grafico (Figura 12) e nella tabella (Tabella 7) seguenti.

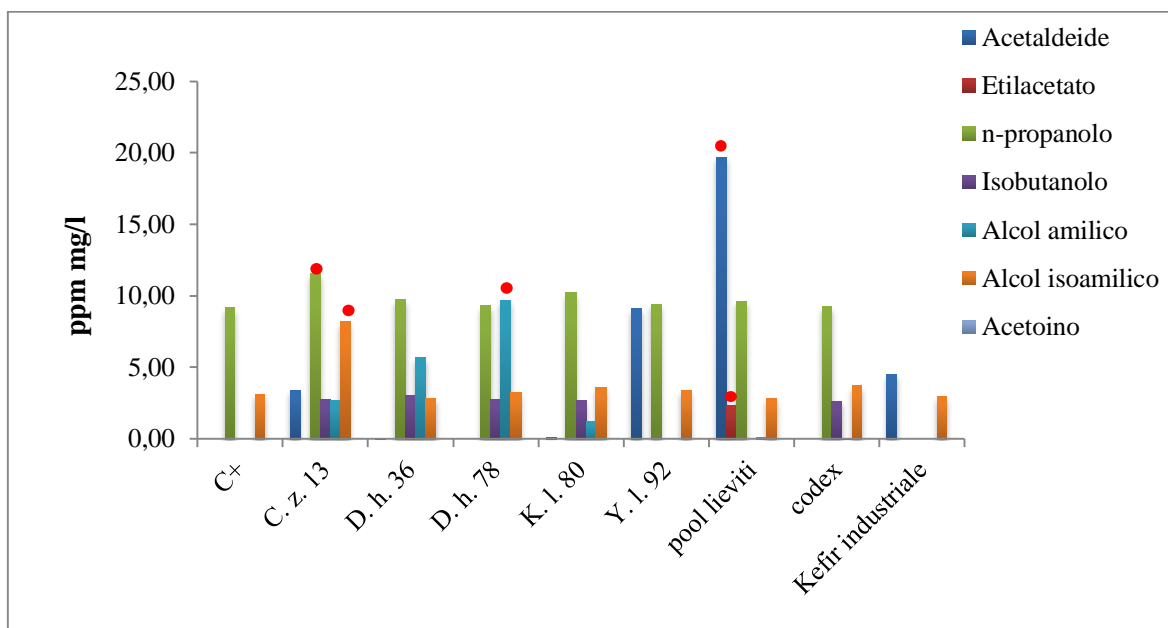


Figura 12 – Prova preliminare di fermentazione. Principali prodotti secondari di fermentazione nel kefir da latte di mucca intero, ppm (mg/l).

PROVA	Acetaldeide	Etilacetato	n - propanolo	Isobutanolo	Alcol amilico	Alcol isoamilico	Acetoino
C+	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^b	9.17 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^e	3.12 ± 0.42 ^b	nd*
C. z. 13	3.38 ± 0.04 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	11.51 ± 0.41 ^a	2.78 ± 0.02 ^{ab}	2.67 ± 0.34 ^c	8.16 ± 0.08 ^a	nd
D. h. 36	0.01 ± 0.01 ^e	0.00 ± 0.00 ^b	9.75 ± 0.52 ^{bc}	3.05 ± 0.36 ^a	5.66 ± 0.01 ^b	2.84 ± 0.01 ^b	nd
D. h. 78	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^b	9.30 ± 0.02 ^c	2.77 ± 0.08 ^{ab}	9.70 ± 0.76 ^a	3.25 ± 0.76 ^b	nd
K. l. 80	0.11 ± 0.15 ^e	0.00 ± 0.00 ^b	10.26 ± 0.63 ^b	2.69 ± 0.08 ^b	1.22 ± 0.49 ^d	3.62 ± 0.49 ^b	nd
Y. l. 92	9.12 ± 1.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	9.43 ± 0.12 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.55 ^e	3.40 ± 0.55 ^b	nd
pool lieviti	19.69 ± 0.06 ^a	2.36 ± 0.19 ^a	9.61 ± 0.10 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.02 ^e	2.86 ± 0.02 ^b	nd
codex	0.00 ± 0.00 ^e	0.00 ± 0.00 ^b	9.23 ± 0.04 ^c	2.64 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.54 ^e	3.72 ± 0.54 ^b	nd
Kefir industriale	4.50 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^e	2.95 ± 0.00 ^b	nd

Tabella 7 – Prova preliminare di fermentazione. Principali prodotti secondari di fermentazione nel kefir da latte di mucca intero, ppm (mg/l). I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$).

La prova che vede coinvolti i batteri lattici con *C. zeylanoides* 13 presenta le concentrazioni più elevate di n – propanolo (alcol, nota di durezza) con 11.51 mg/l, e alcol isoamilico (alcol, e nota fruttata) con 8.16 mg/l rispetto al resto delle prove e del kefir industriale.

L'alcol amilico è stato rilevato in concentrazione maggiore nelle prova con *D. hansenii* 78 con 9.70 mg/l, ed è presente a concentrazioni minori anche nelle prove con *C. zeylanoides* 13, *D. hansenii* 36 e *K. lactis* 80.

Nella prova condotta con i batteri lattici e dal pool dei lieviti è stato rilevato il maggior quantitativo, 19.69 mg/l, di acetaldeide (aroma di mela verde, erba tagliata) rispetto alle altre prove. Allo stesso modo, anche nella prova condotta dai batteri lattici e da *Y. lipolytica* 92 il quantitativo di acetaldeide è elevato, 9.12 mg/l.

L'etilacetato (aroma di ananas) è presente solamente nella prova che vede impiegato il pool dei lieviti, ad una concentrazione di 2.36 mg/l ed è assente in tutte le altre.

L'isobutanolo (nota alcolica, solvente) è stato rilevato nelle prove con *C. zeylanoides* 13, *D. hansenii* 36 e 78, *K. lactis* 80 e *S. boulardi* (codex) a concentrazioni comprese tra 2.64 e 3.05 mg/l.

La prova condotta dai soli batteri lattici (C+) e il kefir industriale sono risultati i campioni meno ricchi nella componente aromatica, gli unici composti rilevati sono n – propanolo, alcol isoamilico per il campione C+ e alcol amilico e isoamilico nel kefir industriale.

L'acetoino (odore burroso) è assente in tutte le prove.

4.2 RISULTATI RIMODULAZIONE DEL POOL MICROBICO E APPLICAZIONE SU VARI TIPI DI LATTE: prove di fermentazione e degustazione

Dopo aver valutato i risultati della prova preliminare di fermentazione, in particolare le conte vitali, i risultati delle analisi chimiche e dei prodotti secondari di fermentazione dei kefir ottenuti, in questa seconda parte del lavoro è stata ridotta la concentrazione di inoculo di *Y. lipolytica* 92 e *C. zeylanoides* 13 ed è stata aumentata quella dei due *D. hansenii*, 36 e 78, nelle prove in singolo e nel pool.

In più, le settimane di stoccaggio sono state ridotte da otto a cinque e, oltre al latte di mucca, sono stati testati altri tipi di latte: latte di mucca senza lattosio, latte di capra, di pecora e di bufala.

4.2.1 VALUTAZIONE DELLA CINETICA FERMENTATIVA

Anche per la seconda prova di fermentazione la trasformazione del latte in kefir è stata valutata e confermata dall'avvenuta formazione del coagulo in tutte le prove dopo 24 ore di

incubazione a 25° C, conseguenza dell'abbassamento del pH dovuto alla fermentazione lattica ad opera di *Lb. casei Shirota* e dal pool di *Bifidobacterium spp.* aggiunto solamente nelle matrici: latte di mucca intero, latte di mucca senza lattosio e latte di capra.

Il pH del latte è sceso velocemente dopo le 24 ore di fermentazione, da 6.7 – 6.0, normale pH del latte, a circa 4.4 in tutte le prove. Fanno eccezione le prove dove è stato impiegato latte di bufala, le quali hanno tutte mostrato un valore di pH leggermente superiore, di circa 4.85 dopo le 24 ore di incubazione a 25° C.

Durante il periodo di conservazione a 4° C, tutte le prove hanno continuato a mostrare una riduzione del pH, fino a raggiungere, al termine dello stoccaggio, valori compresi fra 4.20 e 3.77.

L'andamento del pH nel tempo è riportato nelle tabelle seguenti (Tabella 8 e 9).

PROVE	pH LATTE DI MUCCA		pH LATTE DI MUCCA SENZA LATTOSIO		pH LATTE DI CAPRA	
	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5
C+	4.53	3.95	4.28	3.97	4.62	3.97
D. h. 36	4.46	3.94	4.22	4.02	4.50	3.99
D. h. 78	4.48	3.92	4.21	4.03	4.55	3.91
C. z. 13	4.53	3.96	4.22	4.05	4.60	3.96
Y. I. 92	4.33	3.96	4.35	3.99	4.46	4.21
K. I. 80	4.53	3.92	4.28	3.97	4.53	3.95
pool lieviti	4.47	3.92	4.19	4.03	4.54	4.08

Tabella 8 – Andamento del pH nel tempo nelle prove con latte di mucca intero e senza lattosio e con latte di capra. T = tempo, s5 = settimana 5.

PROVE	pH LATTE DI PECORA		pH LATTE DI BUFALA	
	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5
C+	4.35	3.82	4.83	4.05
D. h. 36	4.30	3.87	4.85	4.05
D. h. 78	4.39	3.90	4.85	3.97
C. z. 13	4.42	3.78	4.82	4.00
Y. l. 92	4.43	3.78	4.85	3.95
K. l. 80	4.40	3.91	4.85	3.98
pool lieviti	4.45	3.77	4.87	3.94

Tabella 9 – Andamento del pH nel tempo nelle prove con latte di pecora e latte di bufala.
T = tempo, s5 = settimana 5.

Nelle prove di fermentazione su latte di pecora e bufala è stato deciso di eliminare dall'inoculo iniziale il pool di *Bifidobacterium spp.*, sulla base dei risultati delle prime prove di assaggio, nelle quali l'aggiunta a *Lb. casei Shirota* del pool di *Bifidobacterium spp.* ha conferito una nota sgradevole – amara.

In alcune delle prove di fermentazione dove è stato impiegato il latte di pecora, e nello specifico le fermentazioni condotte da *Lb. casei Shirota* con *D. hansenii* 78, *Lb. casei Shirota* con *K. lactis* 80, *Lb. casei Shirota* con *Y. lipolytica* 92 e *Lb. casei Shirota* e pool lieviti, dopo 24 ore di incubazione a 25° C, è stata osservata la formazione di un coagulo molto compatto con netta distinzione del siero (Figura 13).



Figura 13 – Formazione del coagulo nella prova con *Y. lipolytica* 92 in latte di pecora, T24ore.

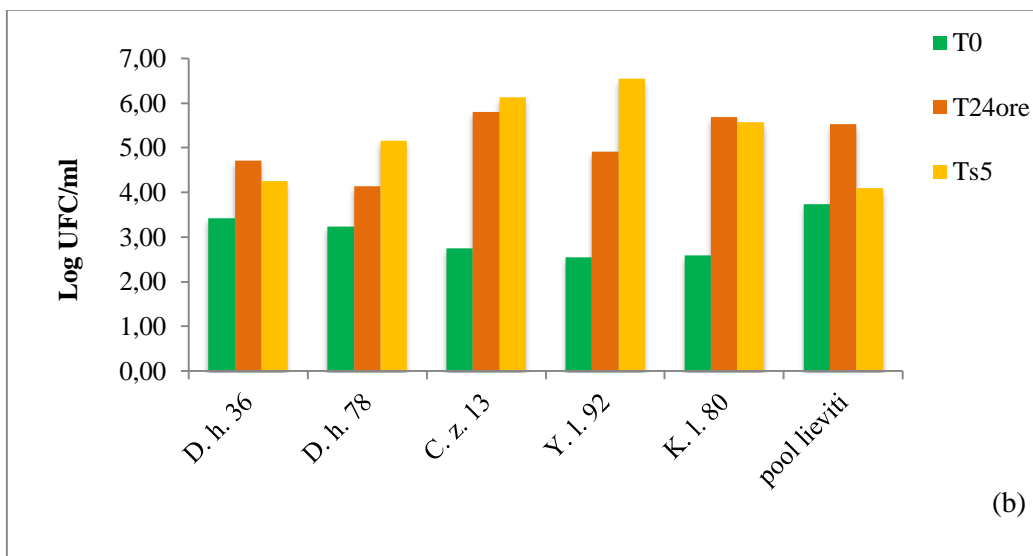
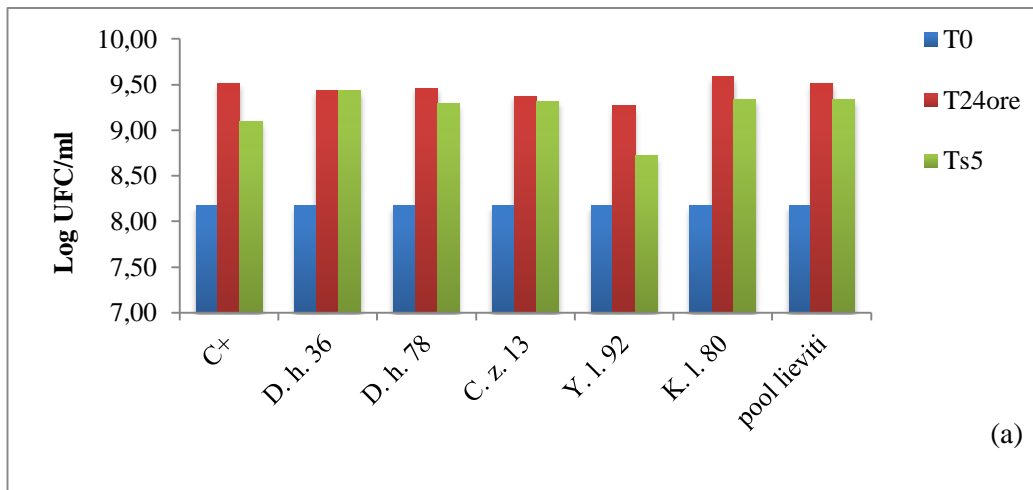
4.2.2 EVOLUZIONE DELLA POPOLAZIONE MICROBICA

Tutte le prove sono state sottoposte a conta vitale su piastra per valutare l'effettiva vitalità dei lieviti e batteri impiegati e l'interazione fra di essi.

Le conte sono state effettuate al momento dell'inoculo (tempo T0), dopo 24 ore dall'inoculo (T24ore) e al termine delle cinque settimane di stoccaggio (Ts5).

Di seguito sono riportati gli andamenti di crescita dei batteri e lieviti suddivisi per matrice.

Matrice latte di mucca intero (Figura 14):



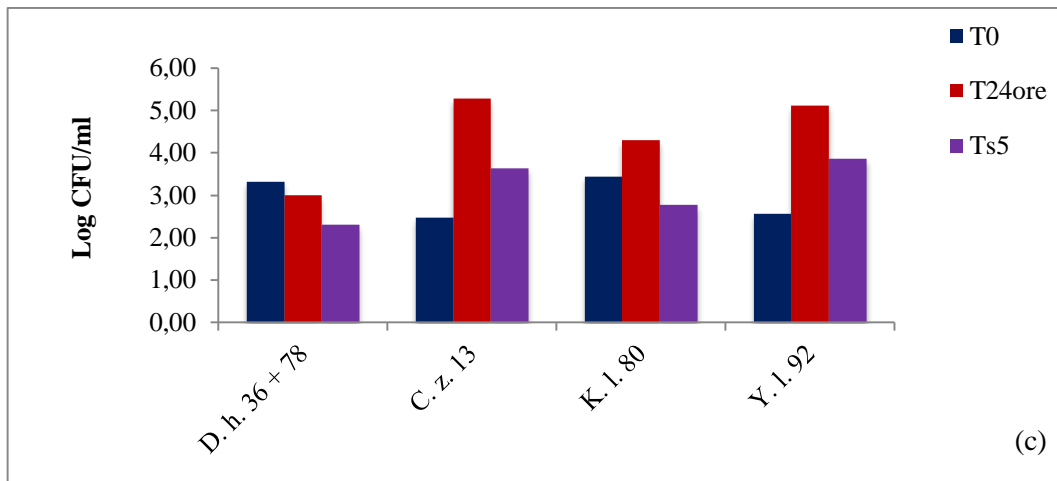
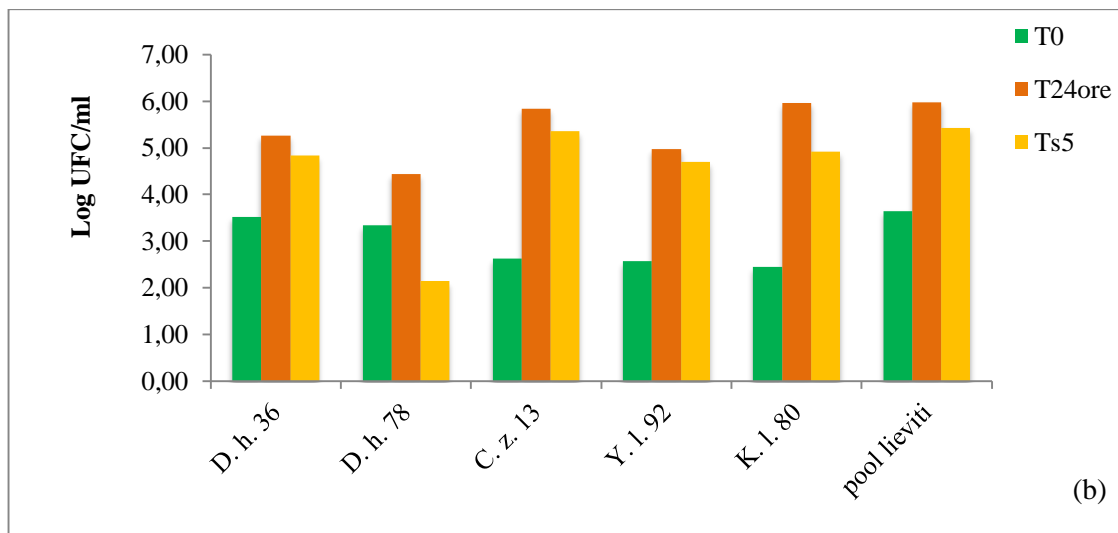
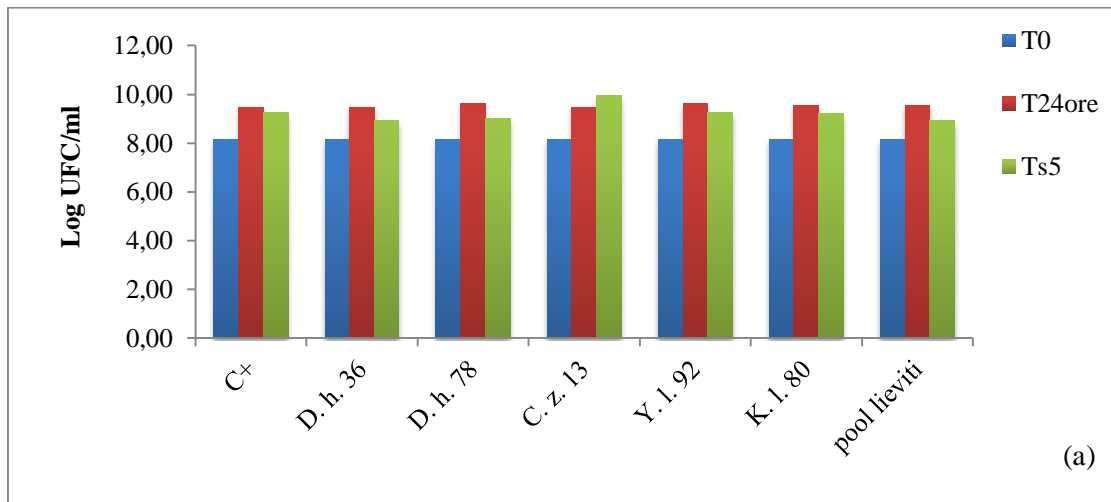


Figura 14 – Cinetica di crescita dei batteri *Lb. casei Shirota* e pool *Bifidobacterium spp.* (a) e dei lieviti (b). Il grafico (c) riporta l'andamento nel tempo di ciascun lievito nel pool. T = tempo, s5 = settimana 5.

Nella prova pool i lieviti in totale crescono di meno rispetto alla prova singola, molto probabilmente dovuto alla maggior competizione per i nutrienti.

In tutte le prove *C. zeylanoides* 13 e *Y. lipolytica* 92 crescono di più rispetto agli altri lieviti, raggiungendo valori di 6 – 6.5 Log UFC/ml al termine dello stoccaggio, nonostante entrambe le concentrazioni di inoculo siano state ridotte di cinque volte rispetto alla prova preliminare di fermentazione.

Matrice latte di mucca senza lattosio (Figura 15):



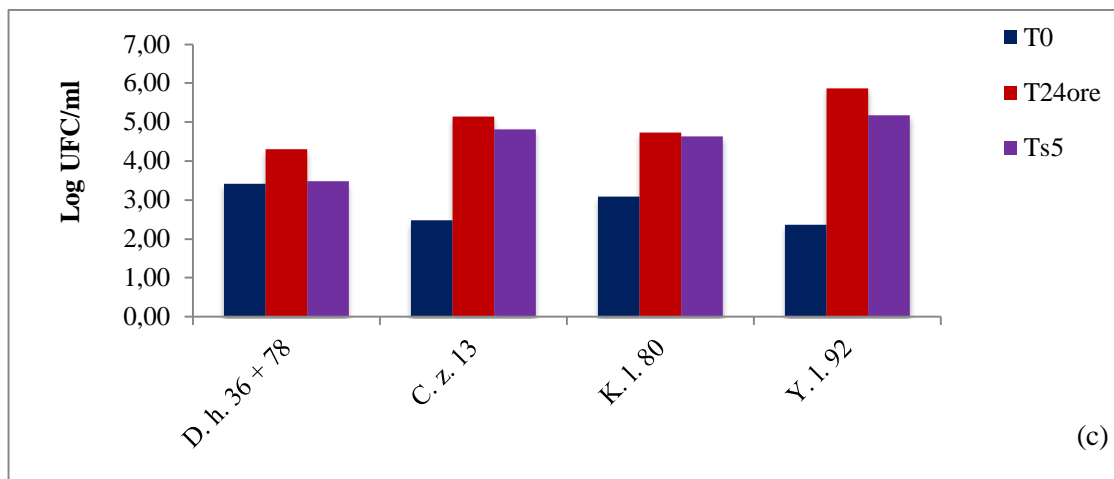
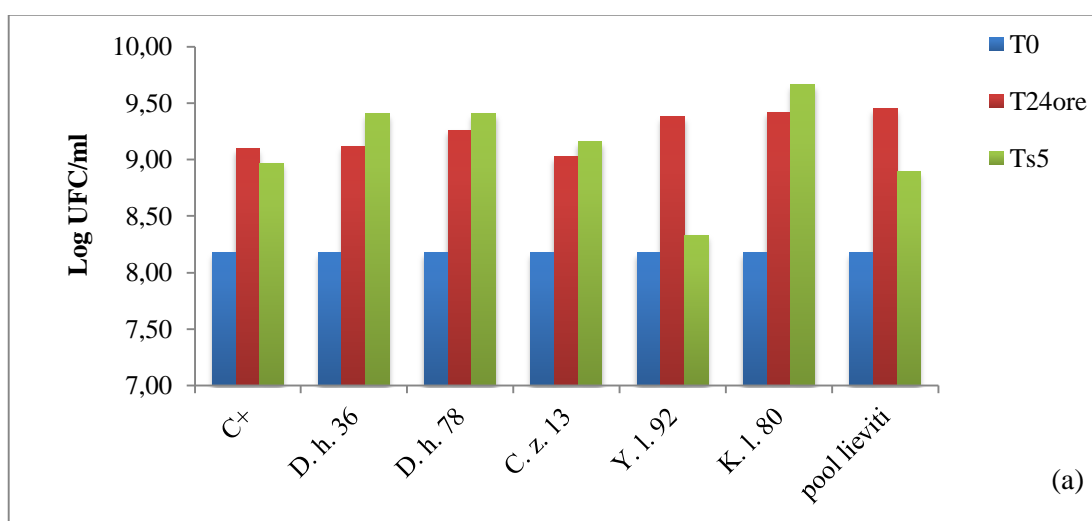


Figura 15 – Cinetica di crescita dei batteri *Lb. casei Shirota* e pool *Bifidobacterium spp.* (a) e dei lieviti (b). Il grafico (c) riporta l'andamento nel tempo di ciascun lievito nel pool. T = tempo, s5 = settimana 5.

I lieviti *C. zeylanoides* 13 e *Y. lipolytica* 92, anche in questo caso, sono quelli che prendono il sopravvento nella prova pool. *D. hansenii* 78 è invece il lievito che nella prova in singolo ha mostrato più difficoltà nella crescita arrivando al termine delle cinque settimane ad un concentrazione di 2.15 Log UFC/ml, minore rispetto all'inoculo iniziale (3.34 Log UFC/ml).

Matrice latte di capra (Figura 16):



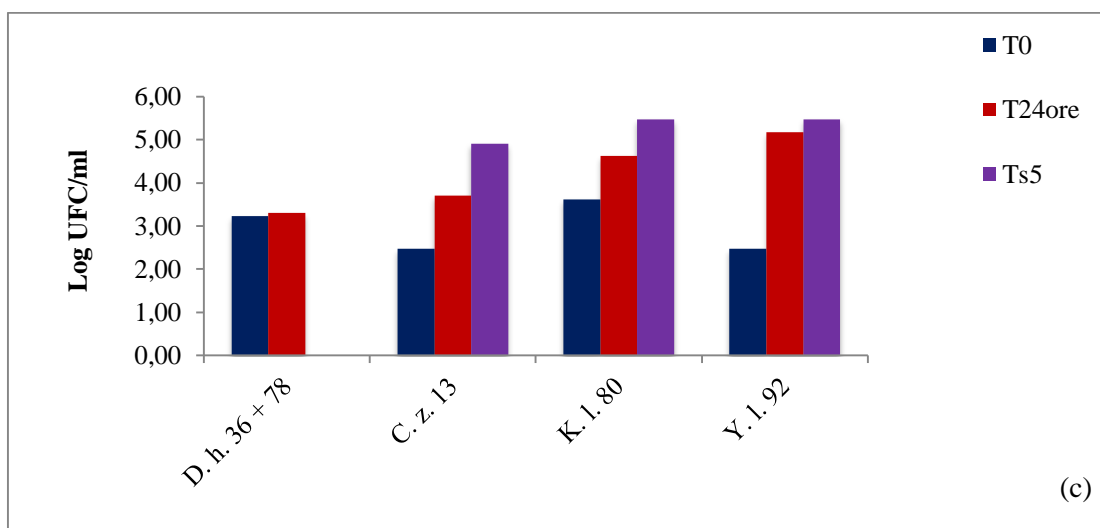
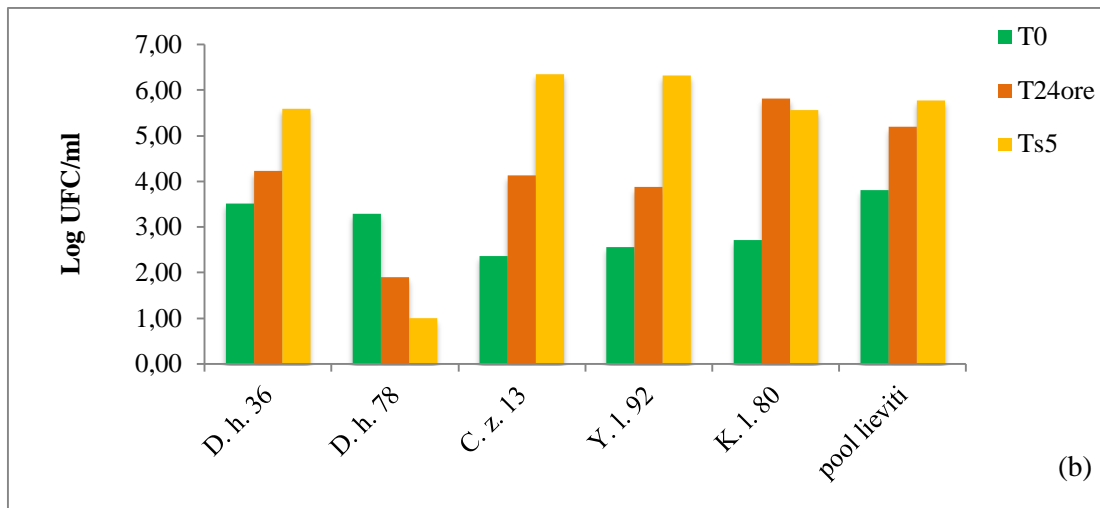
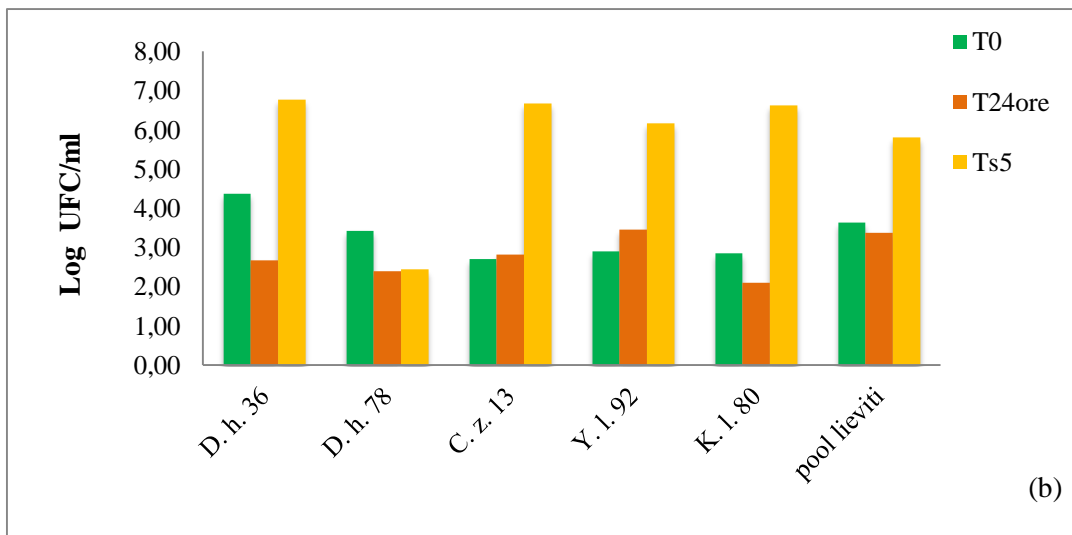
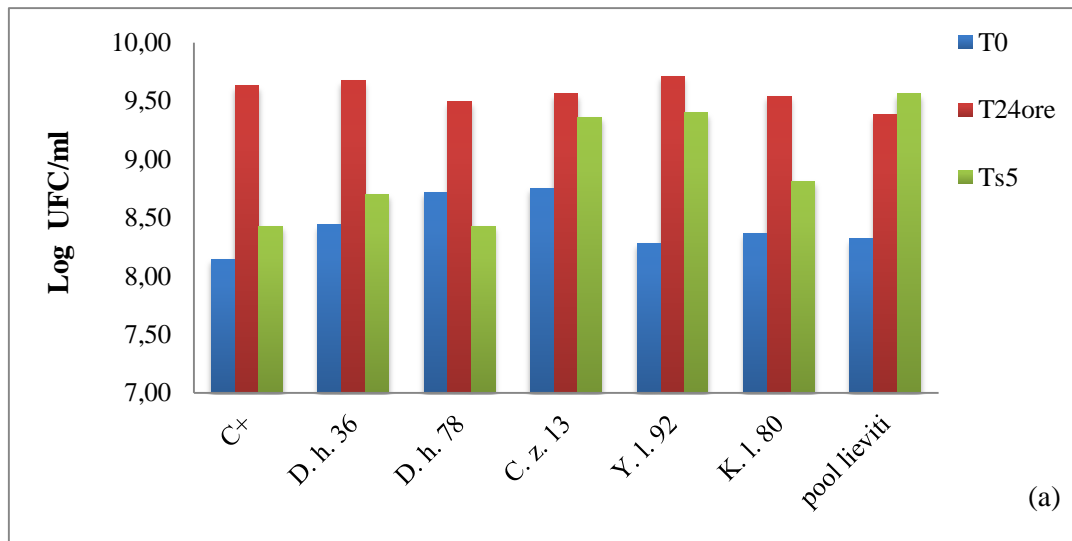


Figura 16 – Cinetica di crescita dei batteri *Lb. casei Shirota* e pool *Bifidobacterium spp.* (a) e dei lieviti (b). Il grafico (c) riporta l'andamento nel tempo di ciascun lievito nel pool. T = tempo, s5 = settimana 5.

Nella matrice latte di capra il lievito *D. hansenii* 78 ha avuto difficoltà nella crescita passando da una concentrazione di inoculo di 3,29 Log UFC/ml a 1,00 Log UFC/ml al termine del periodo di stoccaggio, similmente alla prova precedente. Nella prova pool entrambi i ceppi di *D. hansenii* non sono stati rilevati al tempo Ts5.

Y. lipolytica 92 e *C. zeylanoides* 13 rimangono le specie predominanti nel pool insieme a *K. lactis* 80 con concentrazioni di 5.48 Log UFC/ml, 4.91 Log UFC/ml e 5.28 Log UFC/ml, rispettivamente.

Matrice latte di pecora (Figura 17):



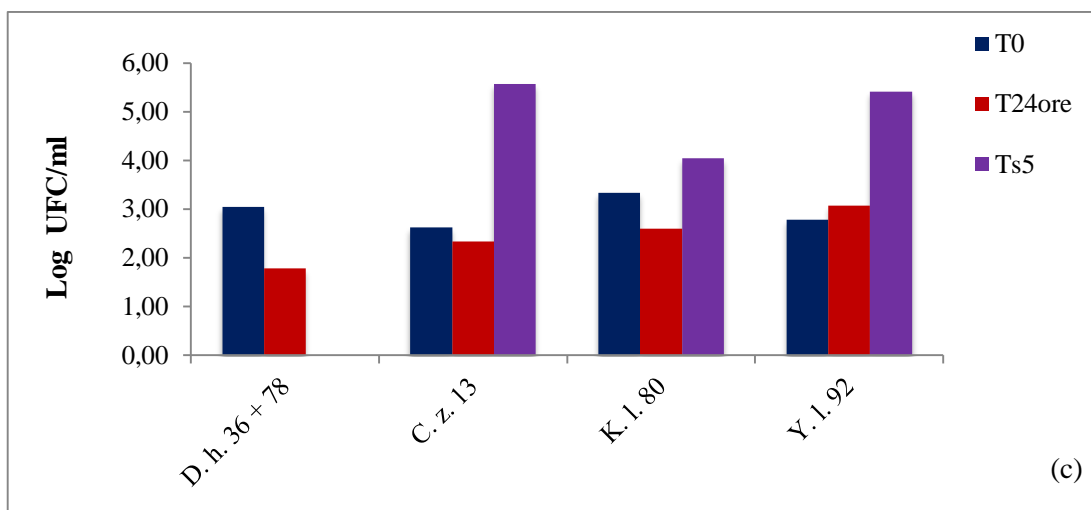


Figura 17– Cinetica di crescita dei batteri *Lb. casei Shirota* (a) e dei lieviti (b). Il grafico (c) riporta l'andamento nel tempo di ciascun lievito nel pool. T = tempo, s5 = settimana 5.

Nella matrice latte di capra i batteri hanno mostrato un calo nella cinetica di crescita al termine delle cinque settimane di stoccaggio rispetto a T24ore, ad eccezione della prova pool.

I lieviti, ad eccezione del *D. hansenii* 78, hanno mostrato una cinetica di crescita elevata arrivando a 6.00 Log UFC/ml circa al termine delle cinque settimane di stoccaggio rispetto all'inoculo iniziale di 3.00 Log UFC/ml circa. La concentrazione di *D. hansenii* 78 è diminuita rispetto all'inoculo iniziale di circa 1 ordine di grandezza passando da 3.42 Log UFC/ml a 2.45 Log UFC/ml.

C. zeylanoides 13 e *Y. lipolytica* 92 sono le specie predominanti nella prova pool al termine delle cinque settimane, con concentrazioni rispettivamente di 5.57 Log UFC/ml e 5.41 Log UFC/ml, i due *D. hansenii* 36 e 78 non sono stati rilevati.

Matrice latte di bufala (Figura 18):

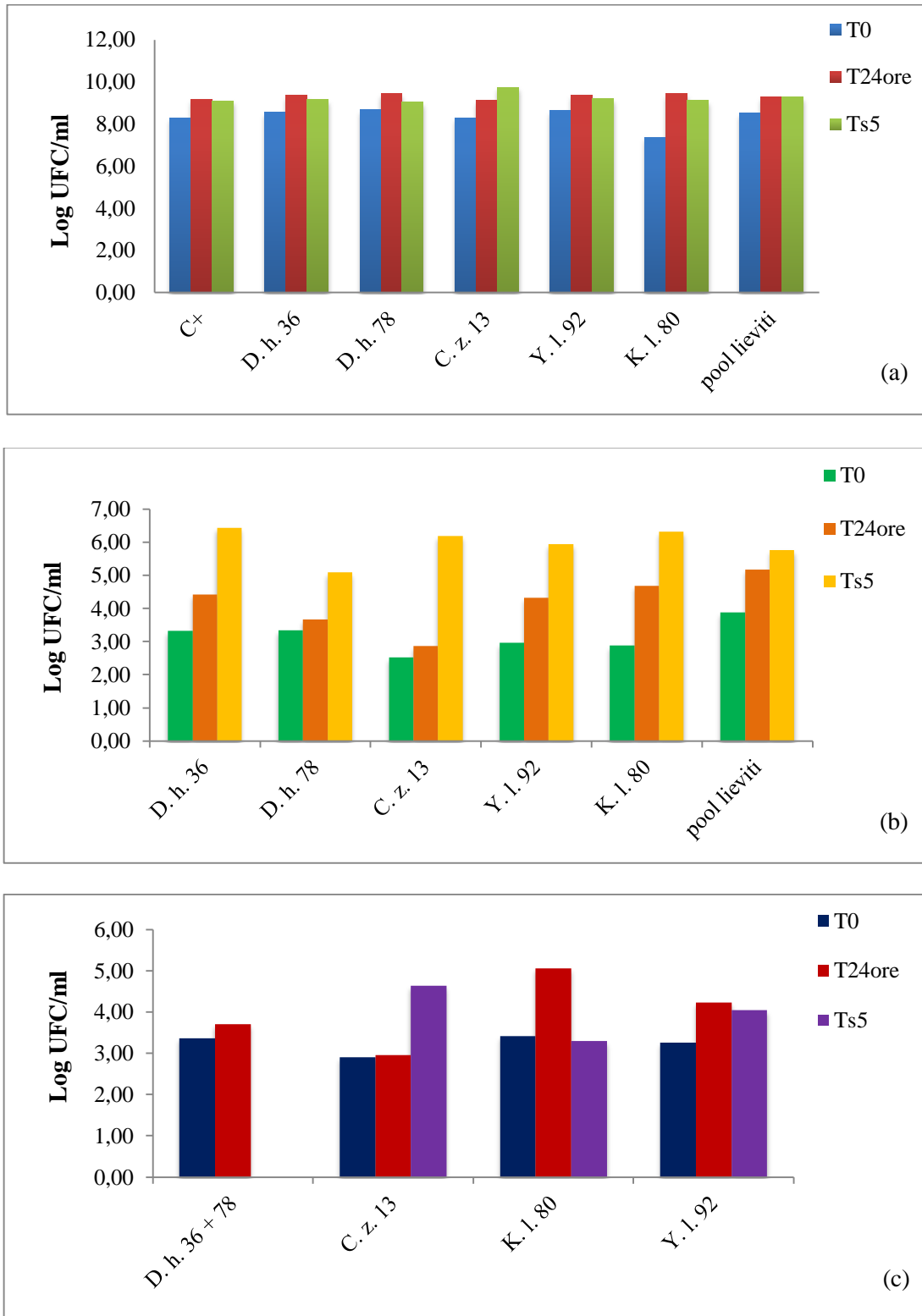


Figura 18– Cinetica di crescita dei batteri *Lb. casei Shirota* (a) e dei lieviti (b). Il grafico (c) riporta l'andamento nel tempo di ciascun lievito nel pool. T = tempo, s5 = settimana 5.

Infine per quanto riguarda la matrice latte di bufala, anche in quest' ultimo caso *C. zeylanoides* 13 e *Y. lipolytica* 92 sono le specie predominanti nella prova pool al termine delle cinque settimane, i due *D. hansenii* 36 e 78 non sono stati rilevati.

In generale, riguardo l'andamento nel tempo dei batteri, tutte le prove hanno mostrato un incremento di crescita dopo 24 ore di fermentazione, passando da una concentrazione di circa 8.00 Log UFC/ml a circa 9.50 Log UFC/ml. Questo valore di cellule vitali è stato mantenuto durante tutto il periodo di stoccaggio a 4° C (cinque settimane) con eccezione di alcune prove tra cui quelle condotte da:

Y. lipolytica 92 nella matrice latte di mucca (8.72 Log UFC/ml), *Y. lipolytica* 92 nella matrice latte di capra (8.33 Log UFC/ml), nelle prove C+ (8.43 Log UFC/ml), *D. hansenii* 36 (8.70 Log UFC/ml), *D. hansenii* 78 (8.43 Log UFC/ml) e *K. lactis* 80 (8.81 Log UFC/ml) nella matrice latte di pecora.

Relativamente alla cinetica di crescita dei lieviti, questi hanno mostrato un andamento variabile, ceppo specifico.

Le prove in singolo che vedono coinvolti i lieviti *C. zeylanoides* 13, *K. lactis* 80 e *Y. lipolytica* 92 hanno mostrato, in tutte le matrici latte, un aumento di circa 3 ordini di grandezza alla fine delle cinque settimane, passando da una concentrazione iniziale di 3.00 Log UFC/ml a circa 6.00 Log UFC/ml.

D. hansenii 78 impiegato nelle matrici latte di mucca senza lattosio, latte di capra e latte di pecora ha riscontrato difficoltà nella crescita, la sua concentrazione al termine delle cinque settimane di stoccaggio risulta inferiore all'inoculo iniziale.

Analizzando l'andamento di crescita dei lieviti nel pool, anche in queste seconde prove di fermentazione, *C. zeylanoides* 13 e *Y. lipolytica* 92 prendono il sopravvento sugli altri lieviti

in tutte le matrici nonostante i rispettivi inoculi iniziali siano stati abbassati rispetto alla prova precedente di 0.5 ordini di grandezza.

I due ceppi di *D. hansenii* 36 e 78 impiegati nel pool di lieviti con le matrici latte di capra, latte di pecora e latte di bufala non sono stati rilevati al termine delle cinque settimane nonostante i rispettivi inoculi siano stati aumentati di 0.5 ordini di grandezza rispetto alla prova preliminare di fermentazione.

4.2.3 ANALISI CHIMICHE

I principali prodotti di fermentazione valutati sono stati: acido lattico, acido acetico ed etanolo. Inoltre, è stata valutata anche la concentrazione di lattosio nel tempo, rispetto a quella presente nel latte di partenza (T0). Il lattosio rappresenta la principale fonte di energia per i batteri lattici che lo convertono in acido lattico durante il processo di fermentazione lattica. Quest' ultima analisi non è stata condotta per il latte di mucca senza lattosio, come dichiarato in etichetta.

In questa seconda prova di fermentazione le analisi sono state effettuate dopo le 24 ore di fermentazione (T24ore) e al termine del periodo di stoccaggio a 4° C (Ts5 = settimana 5).

I risultati sono riportati nelle tabelle seguenti, suddivisi per matrice (Tabella 10, 11, 12, 13 e 14).

Matrice latte di mucca intero:

PROVA	LATTOSIO % w/w			ACIDO LATTICO g/l		ACIDO ACETICO g/l		ETANOLO % v/v	
	T0	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5
C+	4.75	4.39± 0.07 ^b	3.02± 0.01 ^c	5.78± 0.01 ^c	9.32± 0.01 ^b	0.41± 0.01 ^e	0.71± 0.01 ^a	0.000	0.002
D. h. 36	4.75	4.72± 0.19 ^a	3.95± 0.14 ^a	5.93± 0.04 ^b	8.59± 0.03 ^d	0.51± 0.01 ^b	0.54± 0.01 ^d	0.001	0.003
D. h. 78	4.75	4.48± 0.05 ^b	3.74± 0.07 ^a	5.22± 0.05 ^e	9.52± 0.02 ^a	0.60± 0.01 ^a	0.62± 0.00 ^c	0.002	0.001
C. z. 13	4.75	4.48± 0.06 ^{cd}	1.01± 0.05 ^e	5.06± 0.04 ^f	9.13± 0.07 ^c	0.53± 0.00 ^b	0.53± 0.01 ^d	0.001	0.003
Y. I. 92	4.75	3.49± 0.00 ^{cd}	3.88± 0.08 ^a	5.61± 0.01 ^d	9.39± 0.01 ^b	0.49± 0.01 ^c	0.49± 0.01 ^e	0.000	0.001
K. I. 80	4.75	4.48± 0.14 ^d	1.98± 0.04 ^d	6.09± 0.01 ^a	8.62± 0.03 ^d	0.43± 0.00 ^d	0.43± 0.01 ^f	0.001	0.003
pool lieviti	4.75	3.86± 0.22 ^{bc}	3.27± 0.01 ^b	5.61± 0.02 ^d	8.36± 0.02 ^e	0.60± 0.01 ^a	0.66± 0.00 ^b	0.000	0.001

Tabella 10 – Contenuto, nel tempo, di acido lattico, acido acetico, etanolo e lattosio nei kefir ottenuti da latte di mucca intero. T = tempo, s5 = settimana 5. I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$). L'analisi statistica non è stata possibile eseguirla per l'etanolo in quanto i dati vengono considerati come gruppo omogeneo dal software utilizzato.

Dai risultati riportati, la concentrazione di acido lattico è aumentata nel corso delle settimane.

La prova che vede coinvolto il lievito *D. hansenii* 78 ne contiene il quantitativo più alto, di 9.52 g/l, mentre il pool di lieviti è quello che ne produce il quantitativo minore (8.36 g/l) alla fine delle cinque settimane.

Relativamente alla concentrazione di acido acetico, nelle prove che vedono coinvolti solamente i batteri (C+), i lieviti *D. hansenii* 36 e 78 ed il pool la concentrazione di acido acetico è aumentata nel corso delle settimane, invece nelle restanti prove si è mantenuta pressoché stabile rispetto al tempo T24ore. In tutte le prove, l'etanolo è pressoché prossimo a zero. Riguardo al consumo di lattosio ad opera del metabolismo microbico, il kefir ottenuto con l'impiego di *C. zeylanoides* 13 è quello che ne mostra il contenuto più basso (circa 1 %

w/w), mentre entrambi i *D. hansenii* e la *Y. lipolytica* 92 sono quelli che ne hanno utilizzato in minor quantità.

Matrice latte di mucca senza lattosio:

PROVA	ACIDO LATTICO g/l		ACIDO ACETICO g/l		ETANOLO % v/v	
	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5
C+	6.57± 0.01 ^e	7.95± 0.01 ^{cd}	0.47± 0.01 ^a	0.47± 0.01 ^a	0.000	0.000
D. h. 36	7.53± 0.04 ^b	8.33± 0.07 ^a	0.22± 0.01 ^e	0.28± 0.01 ^d	0.001	0.001
D. h. 78	7.34± 0.02 ^c	8.36± 0.04 ^a	0.40± 0.00 ^b	0.40± 0.01 ^b	0.000	0.002
C. z. 13	6.41± 0.03 ^g	7.95± 0.05 ^d	0.40± 0.00 ^b	0.40± 0.01 ^b	0.000	0.002
Y. l. 92	6.47± 0.01 ^f	8.07± 0.11 ^b	0.32± 0.01 ^d	0.32± 0.01 ^c	0.000	0.001
K. l. 80	6.76± 0.00 ^d	8.07± 0.04 ^{bc}	0.38± 0.01 ^c	0.38± 0.01 ^b	0.001	0.001
pool lieviti	7.91± 0.01 ^a	8.43± 0.06 ^a	0.31± 0.01 ^d	0.32± 0.00 ^c	0.000	0.001

Tabella 11 – Contenuto, nel tempo, di acido lattico, acido acetico, etanolo e lattosio nei kefir ottenuti da latte di mucca senza lattosio. T = tempo, s5 = settimana 5. I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$). L'analisi statistica non è stata possibile eseguirla per l'etanolo in quanto i dati vengono considerati come gruppo omogeneo dal software utilizzato.

L'acido lattico nel kefir senza lattosio ha visto un aumento nel corso delle settimane, la produzione maggiore si è verificata nelle prove che vedono coinvolti il pool di lieviti (8.43 g/l), ed entrambi i *D. hansenii*. Al contrario, il ceppo *D. hansenii* 36 è quello che produce la minor quantità di acido acetico, al termine del periodo di stoccaggio. Il contenuto di etanolo riflette la prova precedente.

Matrice latte di capra:

PROVA	LATTOSIO % w/w			ACIDO LATTICO g/l		ACIDO ACETICO g/l		ETANOLO % v/v	
	T0	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5
C+	5.60	5.00± 0.01 ^{cd}	4.02± 0.01 ^c	4.84± 0.02 ^e	7.24± 0.01 ^c	0.94± 0.02 ^a	0.94± 0.00 ^a	0.001	0.000
D. h. 36	5.60	5.01± 0.01 ^c	4.49± 0.04 ^a	5.22± 0.01 ^c	8.04± 0.07 ^a	0.65± 0.01 ^c	0.70± 0.02 ^c	0.001	0.001
D. h. 78	5.60	5.45± 0.04 ^b	3.45± 0.00 ^e	5.29± 0.01 ^b	8.04± 0.06 ^a	0.58± 0.01 ^d	0.66± 0.01 ^d	0.001	0.000
C. z. 13	5.60	4.66± 0.04 ^e	4.09± 0.01 ^b	4.61± 0.01 ^f	7.56± 0.01 ^b	0.78± 0.01 ^b	0.78± 0.00 ^b	0.000	0.000
Y. l. 92	5.60	4.98± 0.08 ^d	2.69± 0.01 ^f	5.32± 0.00 ^a	6.22± 0.01 ^e	0.24± 0.01 ^g	0.56± 0.00 ^f	0.000	0.000
K. l. 80	5.60	5.45± 0.01 ^{ab}	4.09± 0.03 ^b	5.32± 0.01 ^{ab}	7.11± 0.01 ^d	0.49± 0.01 ^e	0.62± 0.00 ^e	0.001	0.000
pool lieviti	5.60	5.52± 0.01 ^a	3.95± 0.04 ^d	5.03± 0.02 ^d	7.08± 0.02 ^d	0.41± 0.01 ^f	0.56± 0.01 ^f	0.001	0.000

Tabella 12 – Contenuto, nel tempo, di acido lattico, acido acetico, etanolo e lattosio nei kefir ottenuti da latte di capra. T = tempo, s5 = settimana 5. I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$). L'analisi statistica non è stata possibile eseguirla per l'etanolo in quanto i dati vengono considerati come gruppo omogeneo dal software utilizzato.

Come riscontrato per il kefir senza lattosio, anche in quello ottenuto da latte di capra ad opera dei lieviti *D. hansenii* 36 e 78 è stato riscontrato il più alto contenuto di acido lattico (8.04 g/l), al contrario, *Y. lipolytica* 92 è il ceppo più basso produttore (6.22 g/l).

L'acido acetico è aumentato nel corso delle settimane ad eccezione delle prove C+ (che comunque rappresenta il kefir con il maggior contenuto di questo acido organico) e *C. zeylanoides* 13 dove la concentrazione si è mantenuta stabile a 0.94 g/l e 0.78 g/l, rispettivamente. Il contenuto in etanolo riflette quanto già evidenziato precedentemente. Inoltre, *D. hansenii* 36 è quello che ha mostrato il maggior contenuto residuo di lattosio al termine dello stoccaggio, questo comportamento è stato rilevato anche nel kefir ottenuto da latte di mucca intero.

Matrice latte di pecora:

PROVA	LATTOSIO % w/w			ACIDO LATTICO g/l		ACIDO ACETICO g/l		ETANOLO % v/v	
	T0	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5
C+	4.18	3.91± 0.01 ^b	2.09± 0.01 ^e	8.55± 0.03 ^b	11.76± 0.03 ^c	0.45± 0.01 ^b	0.53± 0.01 ^c	0.004	0.001
D. h. 36	4.18	3.96± 0.03 ^b	3.00± 0.01 ^a	6.79± 0.04 ^f	13.14± 0.03 ^b	0.41± 0.01 ^c	0.41± 0.00 ^f	0.003	0.005
D. h. 78	4.18	3.99± 0.01 ^a	2.01± 0.01 ^f	7.88± 0.01 ^c	10.06± 0.00 ^f	0.64± 0.01 ^a	0.70± 0.01 ^a	0.001	0.004
C. z. 13	4.18	2.79± 0.01 ^d	2.20± 0.02 ^d	7.50± 0.03 ^d	10.45± 0.01 ^e	0.36± 0.01 ^d	0.49± 0.01 ^d	0.001	0.002
Y. l. 92	4.18	3.99± 0.01 ^a	2.70± 0.01 ^b	7.27± 0.04 ^e	14.26± 0.00 ^a	0.16± 0.01 ^f	0.47± 0.00 ^e	0.001	0.003
K. l. 80	4.18	3.62± 0.01 ^c	2.36± 0.02 ^c	6.66± 0.04 ^g	10.54± 0.02 ^d	0.37± 0.01 ^d	0.55± 0.01 ^b	0.003	0.002
pool lieviti	4.18	3.91± 0.01 ^b	1.86± 0.01 ^g	8.91± 0.01 ^a	11.73± 0.00 ^c	0.33± 0.01 ^e	0.40± 0.01 ^f	0.001	0.002

Tabella 13 – Contenuto, nel tempo, di acido lattico, acido acetico, etanolo e lattosio nei kefir ottenuti da latte di pecora. T = tempo, s5 = settimana 5. I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$). L'analisi statistica non è stata possibile eseguirla per l'etanolo in quanto i dati vengono considerati come gruppo omogeneo dal software utilizzato.

Il kefir di pecora ha riscontrato i valori più elevati di acido lattico rispetto a tutte le restanti matrici, con valori compresi tra 10 g/l e 14 g/l circa.

La concentrazione più elevata al termine della cinque settimane di stoccaggio è stata nella prova con il lievito *Y. lipolytica* 92 (14.26 g/l), mentre la più bassa nella prova con il lievito *D. hansenii* 78 (10.06 g/l).

Al contrario, quest'ultimo è risultato il più alto produttore di acido acetico al tempo Ts5 (0.70 g/l). Riguardo la produzione di questo composto nel tempo, *Y. lipolytica* 92 è quella che ha mostrato il maggior incremento, rispetto al tempo T24 ore. Il contenuto di etanolo risulta prossimo allo zero, come per tutte le prove precedenti. Riguardo al residuo di lattosio, i due ceppi *D. hansenii* mostrano un comportamento opposto, infatti il ceppo 36 è quello che

ne consuma meno, con residuo finale di 3.00 % w/w, invece il ceppo 78, insieme al pool, sono le tesi dove ne è stato rilevato di meno, circa 2.00 % w/w.

Matrice latte di bufala:

PROVA	LATTOSIO % w/w			ACIDO LATTICO g/l		ACIDO ACETICO g/l		ETANOLO % v/v	
	T0	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5	T24ore	Ts5
C+	3.73	3.62± 0.07 ^{ab}	2.17± 0.01 ^f	4.48± 0.01 ^e	5.76± 0.03 ^e	0.48± 0.01 ^a	0.61± 0.01 ^b	0.001	0.001
D. h. 36	3.73	3.62± 0.03 ^a	2.77± 0.04 ^d	4.77± 0.01 ^d	7.62± 0.04 ^c	0.26± 0.01 ^e	0.36± 0.01 ^e	0.003	0.003
D. h. 78	3.73	3.62± 0.01 ^a	2.85± 0.00 ^c	4.10± 0.03 ^f	5.15± 0.02 ^f	0.15± 0.01 ^f	0.68± 0.01 ^a	0.003	0.001
C. z. 13	3.73	3.50± 0.01 ^{bc}	2.93± 0.01 ^b	4.45± 0.01 ^e	8.81± 0.01 ^b	0.39± 0.02 ^b	0.53± 0.01 ^c	0.001	0.002
Y. l. 92	3.73	3.58± 0.01 ^d	2.47± 0.01 ^e	4.93± 0.04 ^c	9.38± 0.02 ^a	0.34± 0.01 ^{cd}	0.43± 0.01 ^d	0.002	0.001
K. l. 80	3.73	3.43± 0.04 ^{cd}	3.12± 0.02 ^a	5.83± 0.02 ^a	7.30± 0.03 ^d	0.30± 0.02 ^d	0.40± 0.01 ^d	0.001	0.002
pool lieviti	3.73	3.43± 0.01 ^{ab}	2.96± 0.00 ^b	5.67± 0.01 ^b	9.32± 0.03 ^a	0.35± 0.01 ^{bc}	0.41± 0.01 ^d	0.003	0.002

Tabella 14 – Contenuto, nel tempo, di acido lattico, acido acetico, etanolo e lattosio nei kefir ottenuti da latte di bufala. T = tempo, s5 = settimana 5. I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$). L'analisi statistica non è stata possibile eseguirla per l'etanolo in quanto i dati vengono considerati come gruppo omogeneo dal software utilizzato.

Infine, anche la matrice latte di bufala ha visto un aumento della concentrazione di acido lattico nel tempo, il valore più elevato al termine delle cinque settimane è stato riscontrato nella prova condotta da *Y. lipolytica* 92 e dal pool (circa 9.30 g/l). Una minor produzione si è verificata nella prova con *D. hansenii* 78 con 5.15 g/l, questo andamento riflette quanto rilevato nei kefir di latte di pecora.

La concentrazione di acido acetico ha visto, in tutte le prove, un aumento nel corso del periodo di stoccaggio, l'aumento maggiore si è verificato nella prova con *D. hansenii* 78 passando da 0.15 g/l a 0.68 g/l.

Nel complesso, dai risultati ottenuti emerge che la concentrazione di acido lattico prodotto in seguito a fermentazione è aumentata nel corso delle settimane in tutte le prove, raggiungendo un quantitativo variabile a seconda della specie impiegata e della matrice utilizzata.

Tutte le prove condotte da *Lb. casei* Shirota e dai lieviti (13, 36, 78, 80, 92 e pool) nella matrice latte di pecora sono quelle che hanno mostrato il più alto contenuto di acido lattico al tempo Ts5 con valori compresi tra 10.06 e 14.26 g/l.

La concentrazione di acido acetico risulta variabile in base alla matrice considerata e ai microrganismi impiegati, in particolare per le matrici latte di capra, latte di pecora e latte di bufala la concentrazione di acido acetico è aumentata nel corso delle settimane di stoccaggio. Riguardo il contenuto di etanolo, anche in questa seconda prova di fermentazione, tutte le prove hanno mostrato valori prossimi a zero, indicando una quasi totale assenza di fermentazione alcolica da parte dei lieviti.

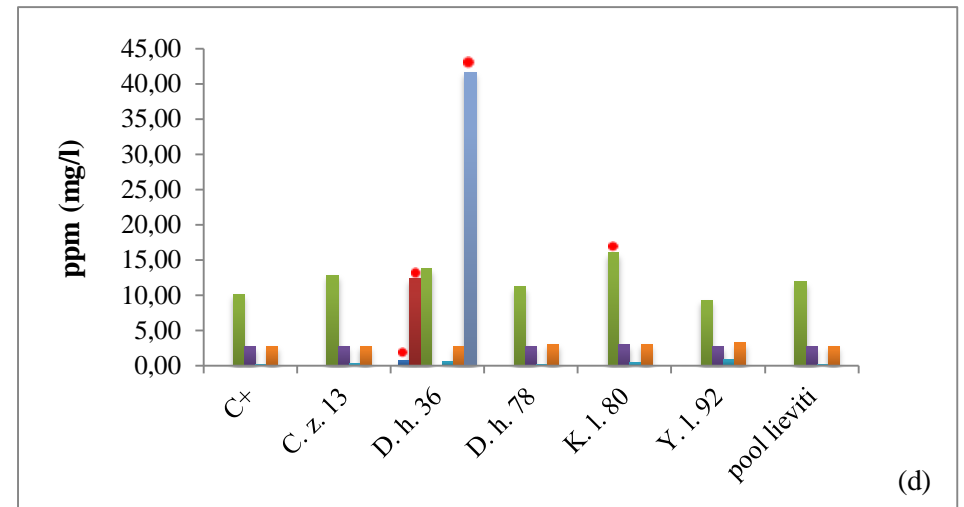
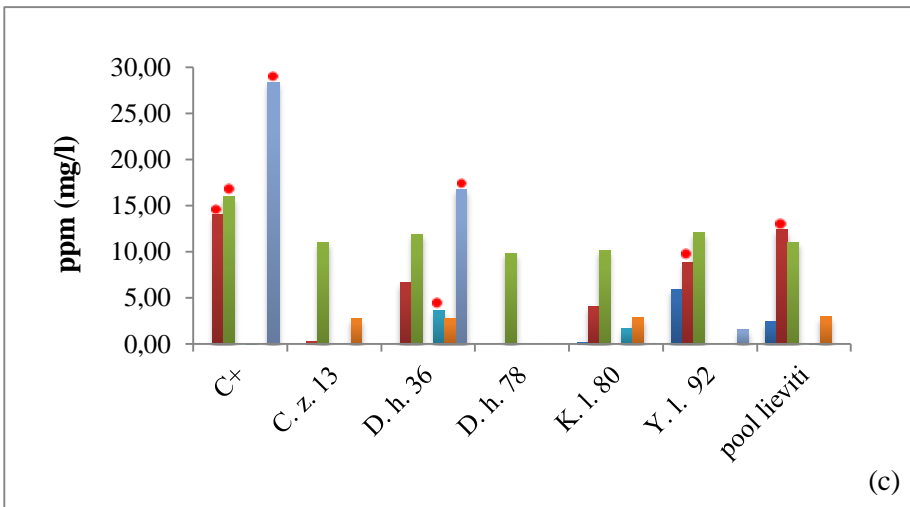
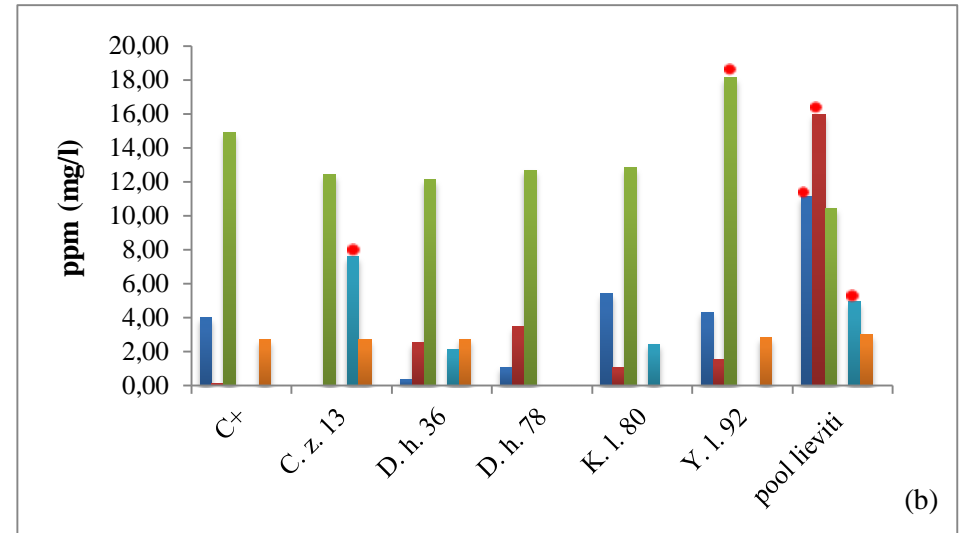
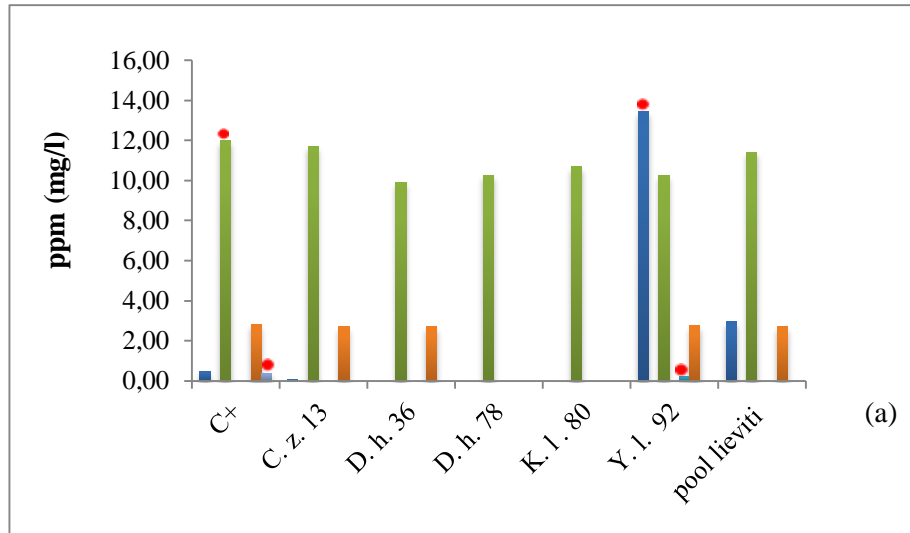
4.2.4 PRODOTTI SECONDARI DI FERMENTAZIONE

In questa seconda prova di fermentazione sono stati valutati i principali prodotti secondari di fermentazione: acetaldeide, etilacetato, n – propanolo, isobutanolo, alcol amilico ed isoamilico ed acetoino.

I risultati sono riportati nella tabella (Tabella 15) e grafici seguenti (Figura 19).

PROVE	MATRICE LATTE DI MUCCA							MATRICE LATTE DI MUCCA SENZA LATTOSIO							MATRICE LATTE DI CAPRA							MATRICE LATTE DI PECORA						
	Acetaldeide	Etilacetato	n-propanolo	Isobutanolo	Alcol amilico	Alcol isoamilico	Acetoino	Acetaldeide	Etilacetato	n-propanolo	Isobutanolo	Alcol amilico	Alcol isoamilico	Acetoino	Acetaldeide	Etilacetato	n-propanolo	Isobutanolo	Alcol amilico	Alcol isoamilico	Acetoino	Acetaldeide	Etilacetato	n-propanolo	Isobutanolo	Alcol amilico	Alcol isoamilico	Acetoino
C+	0.49 ± 0.01 ^c	nd	12.00 ± 0.04 ^a	nd	0.00 ± 0.00 ^b	2.83 ± 0.02 ^a	0.39 ± 0.01 ^a	3,99 ± 0.02 ^d	0,11 ± 0.01 ^f	14,88 ± 0.07 ^b	nd	0,04 ± 0.00 ^e	2,70 ± 0.02 ^{ab}	nd	0,00 ± 0.00 ^c	13,98 ± 0.07 ^a	15,95 ± 0.14 ^a	nd	0,01 ± 0.00 ^c	0,00 ± 0.00 ^c	28,39 ± 0.07 ^a	0,00 ± 0.00 ^b	0,00 ± 0.00 ^b	10,12 ± 0.03 ^f	2,66 ± 0.04 ^c	0,15 ± 0.01 ^e	2,73 ± 0.03 ^c	0,00 ± 0.00 ^b
C. z. 13	0.06 ± 0.01 ^d	nd	11.70 ± 0.02 ^b	nd	0.00 ± 0.00 ^b	2.68 ± 0.01 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^g	0.00 ± 0.00 ^g	12,42 ± 0.04 ^e	nd	7,59 ± 0.02 ^a	2,69 ± 0.25 ^b	nd	0,00 ± 0.00 ^c	0,24 ± 0.01 ^f	10,98 ± 0.14 ^d	nd	0,00 ± 0.00 ^c	2,72 ± 0.03 ^b	0,00 ± 0.00 ^d	0,00 ± 0.00 ^b	0,00 ± 0.00 ^b	12,84 ± 0.36 ^c	2,76 ± 0.03 ^b	0,30 ± 0.03 ^d	2,73 ± 0.04 ^c	0,00 ± 0.00 ^b
D. h. 36	0.00 ± 0.00 ^e	nd	9.91 ± 0.03 ^f	nd	0.00 ± 0.00 ^b	2.68 ± 0.04 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	0,36 ± 0.02 ^f	2,52 ± 0.04 ^c	12,11 ± 0.01 ^f	nd	2,12 ± 0.02 ^d	2,73 ± 0.04 ^{ab}	nd	0,00 ± 0.00 ^c	6,66 ± 0.21 ^d	11,92 ± 0.35 ^c	nd	3,62 ± 0.28 ^a	2,73 ± 0.14 ^b	16,79 ± 0.21 ^b	0,74 ± 0.02 ^a	12,31 ± 0.01 ^a	13,73 ± 0.02 ^b	0,00 ± 0.00 ^d	0,54 ± 0.03 ^b	2,70 ± 0.02 ^c	41,67 ± 0.22 ^a
D. h. 78	0.00 ± 0.00 ^e	nd	10.26 ± 0.03 ^e	nd	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	1,09 ± 0.02 ^e	3,45 ± 0.03 ^b	12,68 ± 0.04 ^d	nd	0,00 ± 0.00 ^f	0,00 ± 0.00 ^c	nd	0,00 ± 0.00 ^c	0,00 ± 0.00 ^g	9,83 ± 0.28 ^f	nd	0,00 ± 0.00 ^c	0,00 ± 0.00 ^c	0,00 ± 0.00 ^d	0,00 ± 0.00 ^b	0,00 ± 0.00 ^b	11,19 ± 0.02 ^e	2,69 ± 0.03 ^{bc}	0,04 ± 0.00 ^f	3,04 ± 0.03 ^b	0,00 ± 0.00 ^b
K. l. 80	0.00 ± 0.00 ^e	nd	10.69 ± 0.03 ^d	nd	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^b	5,43 ± 0.02 ^b	1,05 ± 0.03 ^e	12,86 ± 0.03 ^c	nd	2,43 ± 0.02 ^c	0,00 ± 0.00 ^c	nd	0,17 ± 0.01 ^c	4,04 ± 0.03 ^e	10,18 ± 0.01 ^e	nd	1,62 ± 0.03 ^b	2,79 ± 0.02 ^b	0,00 ± 0.00 ^d	0,00 ± 0.00 ^b	0,00 ± 0.00 ^b	15,99 ± 0.16 ^a	2,95 ± 0.03 ^a	0,39 ± 0.01 ^c	3,04 ± 0.06 ^b	0,00 ± 0.00 ^b
Y. l. 92	13.44 ± 0.03 ^a	nd	10.26 ± 0.02 ^e	nd	0.22 ± 0.01 ^a	2.75 ± 0.01 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	4,32 ± 0.03 ^c	1,55 ± 0.02 ^d	18,11 ± 0.01 ^a	nd	0,00 ± 0.00 ^f	2,82 ± 0.02 ^a	nd	0,17 ± 0.01 ^c	4,04 ± 0.03 ^e	10,18 ± 0.01 ^e	nd	1,62 ± 0.03 ^b	2,79 ± 0.02 ^b	0,00 ± 0.00 ^d	0,00 ± 0.00 ^b	0,00 ± 0.00 ^b	9,29 ± 0.03 ^g	2,64 ± 0.04 ^{bc}	0,78 ± 0.00 ^a	3,23 ± 0.01 ^a	0,00 ± 0.00 ^b
pool lieviti	2.96 ± 0.03 ^b	nd	11.40 ± 0.02 ^c	nd	0.00 ± 0.00 ^b	2.70 ± 0.02 ^c	0.00 ± 0.00 ^b	11,11 ± 0.02 ^a	15,97 ± 0.01 ^a	10,44 ± 0.07 ^g	nd	4,91 ± 0.01 ^b	2,99 ± 0,08 ^a	nd	5,97 ± 0.42 ^a	8,87 ± 0.15 ^c	12,06 ± 0.12 ^b	nd	0,00 ± 0.00 ^c	0,00 ± 0.00 ^c	1,54 ± 0.01 ^c	0,00 ± 0.00 ^b	0,00 ± 0.00 ^b	11,95 ± 0.26 ^d	2,65 ± 0.03 ^c	0,06 ± 0.00 ^f	2,74 ± 0.02 ^c	0,00 ± 0.00 ^b

Tabella 15 – Principali prodotti secondari di fermentazione nei kefir da varie matrici, ppm (mg/l). I dati sono riportati come valori medi ± deviazione standard. I valori che mostrano, in apice, lettere differenti all'interno di ciascuna colonna sono significativamente differenti (Duncan test; $p < 0.05$).



■ Acetaldeide ■ Etilacetato ■ n-propanolo ■ Isobutanolo ■ Alcol amilico ■ Alcol isoamilico ■ Acetoino

Figura 19 – Principali prodotti secondari di fermentazione nel kefir da latte di mucca intero (a), nel kefir da latte di mucca senza lattosio (b), nel kefir da latte di capra (c) e nel kefir da latte di pecora (d).

In tutti i kefir prodotti con latte di mucca intero è stato rilevato il composto n – propanolo, il quantitativo più alto è stato riscontrato nella prova con i soli batteri (C+) di 12.00 mg/l.

La prova che vede coinvolta *Y. lipolytica* 92 presenta il quantitativo di acetaldeide (aroma di mela verde, erba tagliata) più alto di 13.44 mg/l, questo stesso composto è stato rilevato con concentrazioni più basse anche nelle prove pool e con i soli batteri (C+).

L'alcol isoamilico è stato rilevato in tutte le prove, ad eccezione di quella condotta dal lievito *D. hansenii* 78 e *K. lactis* 80.

Acetoino (odore burroso) ed alcol amilico sono stati rilevati rispettivamente solo nelle prove C+ (0.39 mg/l) e con *Y. lipolytica* 92 (0.22 mg/l).

L'n – propanolo, come nella prova precedente, anche nei kefir prodotti con latte di mucca senza lattosio è il composto riscontrato in tutte le prove, il valore più elevato è presente nella prova con il lievito *Y. lipolytica* 92 (18.11 mg/l).

In tutte le prove, ad eccezione di quelle che vedono coinvolti *D. hansenii* 78 e *K. lactis* 80, è stato rilevato l'alcol isoamilico, la concentrazione maggiore è presente nella prova pool con 2.99 mg/l.

La prova pool è la più complessa dal punto di vista aromatico, presentando la maggiore concentrazione di etilacetato (aroma di ananas) (15.97 mg/l), di acetaldeide (11.11 mg/l) rispetto alle altre prove. In essa è presente anche alcol amilico con 4.91 mg/l.

La maggior concentrazione di alcol amilico è stata rilevata nella prova con *C. zeylanoides* 13 con 7.59 mg/l, minor concentrazioni sono presenti nelle prove con *D. hansenii* 36 e *K. lactis* 80 (2.12 mg/l e 2.43 mg/l).

I composti acetoino e isobutanolo (nota alcolica, solvente) non sono stati riscontrati in nessuna delle prove.

In generale, i kefir prodotti con la matrice latte di mucca senza lattosio mostrano un profilo di prodotti secondari di fermentazione, responsabili dell'aroma, più complesso rispetto ai kefir da latte di mucca intero.

In tutti i kefir ottenuti con latte di capra è stato rilevato il composto n – propanolo a concentrazione comprese tra 9.83 mg/l e 15.95 mg/l, la concentrazione maggiore (15.95 mg/l) è stata riscontrata nella prova C+.

Sempre nella prova C+ è stato rilevato il maggior quantitativo di etilacetato con 13.98 mg/l, seguito dal pool di lieviti (12.37 mg/l) e *Y. lipolytica* 92 (8.87 mg/l). La prova C+ e *D. hansenii* 36 sono le tesi che hanno prodotto la maggiore quantità di acetoino, 28.39 mg/l e 16.79 mg/l, rispettivamente.

Inoltre, il ceppo *D. hansenii* 36 è risultato anche il maggior produttore di alcol amilico con 3.62 mg/l; complessivamente è la tesi con il profilo aromatico più complesso, rispetto alle altre prove.

Similmente alle prove precedenti, anche nei kefir con latte di pecora in tutte le tesi è presente l'n – propanolo, la concentrazione maggiore è stata riscontrata nella prova con *K. lactis* 80 (15.99 mg/l).

L'alcol isoamilico, allo stesso modo, è stato riscontrato in tutte le prove, con concentrazioni variabili ma tutte inferiori a 1 mg/l.

Ad eccezione della prova condotta da *D. hansenii* 36, il composto isobutanolo è presente in tutte le prove con concentrazioni simili, comprese tra 2.64 mg/l e 2.95 mg/l.

La prova condotta da *D. hansenii* 36 risulta la più complessa dal punto di vista aromatico rispetto a tutte le altre, è l'unica dove sono presenti etilacetato (12.31 mg/l), acetoino (41.67 mg/l) e acetaldeide (0.74 mg/l).

4.2.5 ANALISI SENSORIALI

I kefir prodotti nella seconda prova di fermentazione sono stati sottoposti ad analisi sensoriale gusto – olfattiva e valutati dando ad ogni descrittore un punteggio compreso tra 1 e 10.

Insieme al kefir prodotto con latte di mucca intero e con il latte di mucca senza lattosio sono stati degustati anche due kefir industriali, con e senza lattosio.

I grafici di seguito riportano il confronto fra i vari campioni di kefir ottenuti a partire da una stessa matrice, riportando il valore medio per ogni indicatore. Non è stato possibile effettuare la degustazione del kefir prodotto con latte di bufala in quanto sono state riscontrate problematiche durante la conservazione.

Tutti i risultati sono riportati nella pagina seguente (Figura 23).

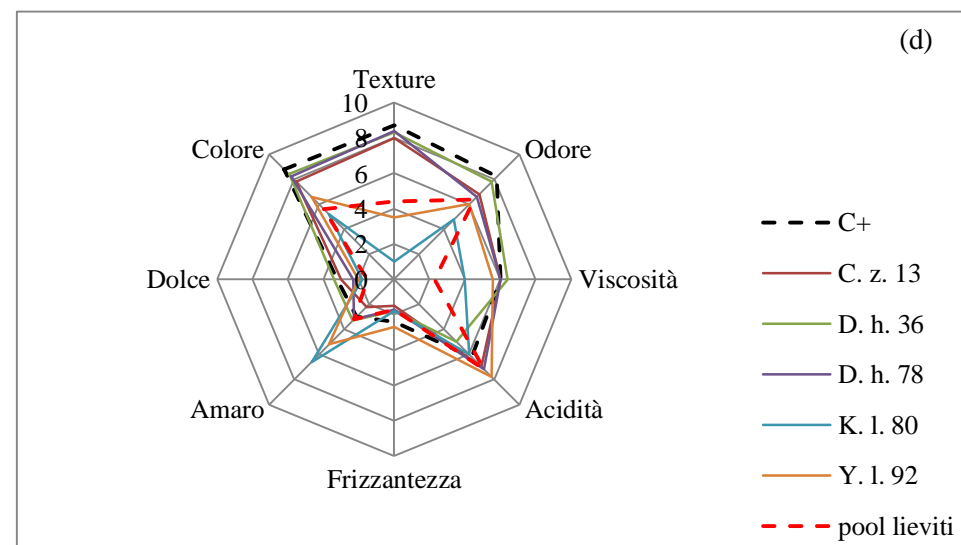
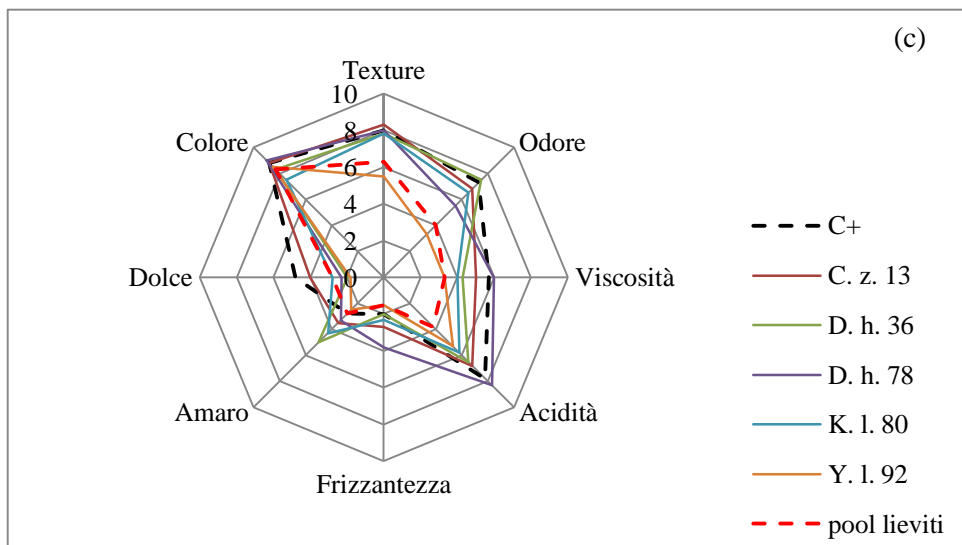
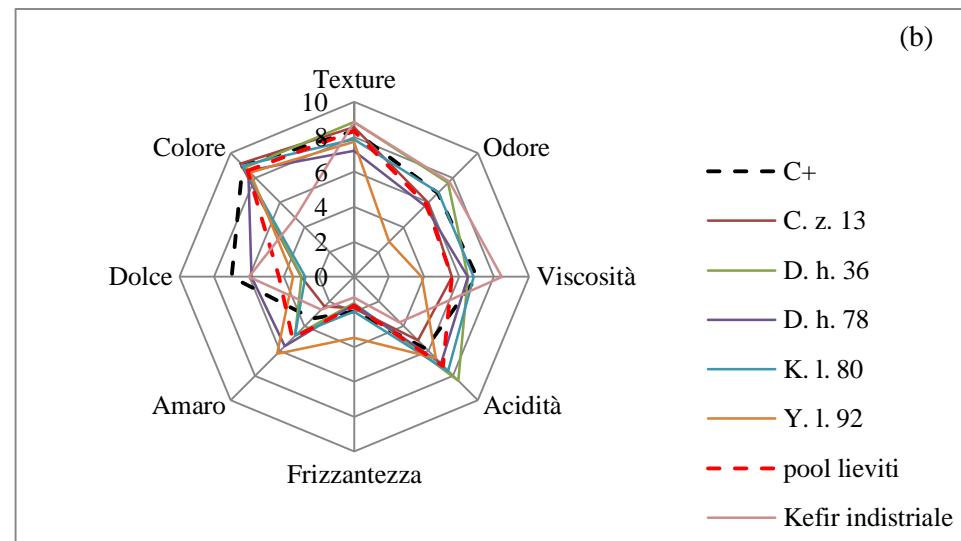
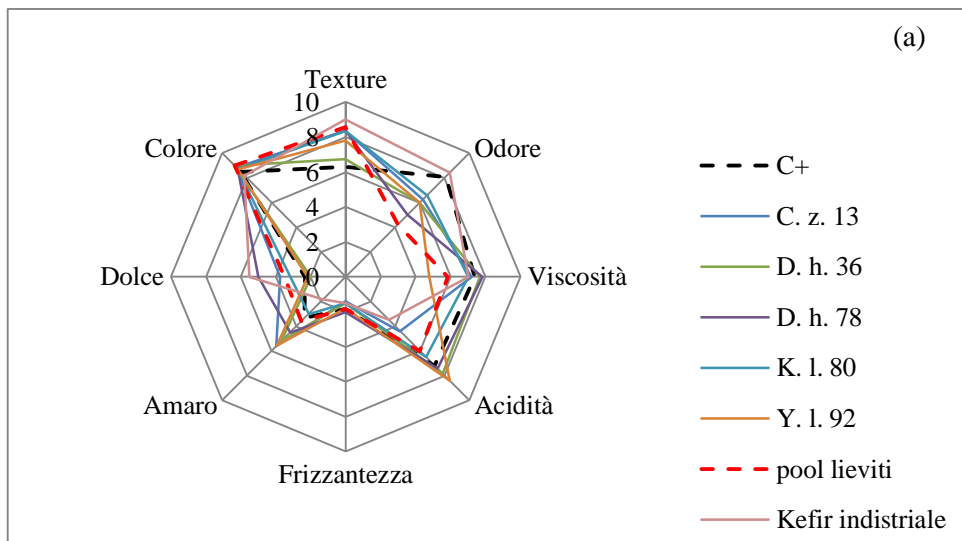


Figura 23 – Risultati delle degustazioni dei kefir prodotti con latte di mucca intero (a), latte di mucca senza lattosio (b), latte di capra (c) e latte di pecora (d).

I kefir prodotti con il latte di mucca intero mostrano differenze con il kefir industriale per quanto riguarda l'acidità, l'amaro, il gusto dolce e l'odore ottenendo punteggi rispettivamente compresi fra 6.0 e 8.4 per l'acidità, 3.0 e 5.6 per l'amaro, 2.0 e 5.0 per il dolce e 4.3 e 8.1 per l'odore.

Il kefir prodotto con i batteri e *Y. lipolytica* 92 è risultato il meno dolce con un punteggio di 2.2, il più acido con 8.4 ed amaro con un punteggio di 5.6. Questa medesima prova è quella che mostra un quantitativo di acetaldeide notevolmente maggiore a tutte le altre (paragrafo 4.2.4).

Gli stessi valori di acidità e amarezza si sono registrati anche con *C. zeylanoides* 13.

La prova contenente soltanto i batteri (C+) è parsa la più gradevole per l'odore con un punteggio di 8.1, al pari del kefir industriale con 8.4.

La prova costituita dai batteri e dal pool dei lieviti si è dimostrata discretamente amara con un punteggio di 3.6, acida con 6.0 ma con l'odore meno gradevole rispetto alle altre prove, ottenendo il punteggio più basso di 4.3.

La frizzantezza non è stata riscontrata in nessuna delle prove, compreso il kefir industriale.

Anche con la matrice latte di mucca senza lattosio la prova contenente il lievito *Y. lipolytica* 92 è risultata la più amara, la meno dolce e con l'odore più sgradevole ottenendo rispettivamente i seguenti punteggi: 6.3, 3.5 e 2.8.

Il kefir prodotto con *D. hansenii* 36 si è rivelato il più acido con 8.4, mentre quello risultante dalla fermentazione con i soli batteri (C+) il più dolce con un punteggio di 7.0.

La frizzantezza è stata riscontrata unicamente nella prova con *Y. lipolytica* 92 (3.5).

Nella degustazione dei kefir prodotti con il latte di capra la prova che vede coinvolto il lievito *D. hansenii* 78 è la più acida con un punteggio di 8.3, frizzante con 3.8 e la più viscosa con

un punteggio di 6.0; la prova con il secondo ceppo di *D. hansenii* 36 è la più gradevole per odore con 7.5 ma è anche risultata la più amara con un punteggio di 5.0.

Il kefir con il lievito *Y. lipolytica* 92 è ancora una volta il peggiore dal punto di vista olfattivo raggiungendo un punteggio di 3.3, come anche la prova che vede coinvolti tutti i lieviti, probabile conseguenza della presenza del lievito *Y. lipolytica* 92 stesso che, come risultato anche dalla cinetica di crescita nelle prove con il pool, prende il sopravvento nei confronti degli altri lieviti.

Infine riguardo la degustazione dei kefir con latte di pecora, la prova che vede coinvolti i batteri lattici e *K. lactis* 80 è quella che ha ricevuto i peggior punteggi sotto l'aspetto gustativo per l'elevata amarezza con 6.6 e la poca dolcezza con 1.8. Sempre la prova con *K. lactis* 80 presenta i punteggi peggiori per quanto riguarda la texture con 1.0, colore con 5.2 e odore con un punteggio di 4.8.

I punteggi più bassi per texture e viscosità sono stati riscontrati nei kefir che vedono l'impiego di *Y. lipolytica* 92 (3.5 e 5.6) e del pool di lieviti (4.4 e 2.3).

Quest' ultime sono le prove che, dopo il periodo di incubazione a 25° C per 24 ore, hanno visto la formazione di un coagulo molto compatto (paragrafo 4.2.1), risultano infatti anche le più acide con i punteggi più alti 7.8 e 7.2.

La prova con *D. hansenii* 36 è risultata la migliore dal punto di vista olfattivo con un punteggio di 7.8 e la più dolce con 3.4. Dall'analisi degli alcoli superiori, la prova con *D. hansenii* 36 è risultata la più complessa sotto il profilo aromatico, con un quantitativo di acetoino molto alto (paragrafo 4.2.4) e una leggera nota fruttata.

In generale fra tutte le prove di fermentazione effettuate, sotto il profilo aromatico (prodotti secondari di fermentazione) e sensoriale (prove di degustazione), la prova con latte di pecora condotta da *D. hansenii* 36 è risultata la migliore.

CAPITOLO 5 – DISCUSSIONI E CONCLUSIONE

Negli ultimi anni si sta assistendo ad un incremento dell'acquisto di prodotti fermentati a base latte, da parte di consumatori attenti al proprio stile di vita. È noto infatti, che la rivalutazione dei prodotti lattiero – caseari a basso contenuto di colesterolo, come i fermentati, sono stati riscattati dall'ingiustificata denigrazione degli anni '90. Come conseguenza diretta, in Europa e anche in Italia, è sempre più frequente trovare varietà crescenti di latte fermentato kefir, negli scaffali del supermercato. Si tratta di una bevanda unica in cui microrganismi differenti, quali lieviti e batteri, stabiliscono un rapporto di tipo simbiotico conferendole proprietà e caratteristiche nutrizionali e sensoriali uniche.

Questo prodotto, con una lunga storia alle spalle, si propone oggi ai consumatori come alimento probiotico con un elevato potenziale funzionale.

Proprio per questi motivi, sempre più aziende ne hanno avviato la produzione impiegando i grani di kefir, colture pure microbiche isolate dagli stessi grani di kefir o colture selezionate come starter per la fermentazione, introducendo nel mercato il kefir industriale (<https://kefiritalia.it/cose-il-kefir/>; Leite et al., 2013).

I benefici di questa bevanda fermentata sono da ricercare nel complesso e diversificato microbiota al suo interno dove i batteri lattici, comuni probiotici, rappresentano i principali microrganismi (Leroy&De Vuyst, 2014), d' altronde se pur ancora poco studiati anche i lieviti probiotici rivestono la loro fondamentale importanza nel conferire proprietà funzionali a questa bevanda fermentata.

Alla luce di questo, nel presente lavoro di tesi è stata testata, su scala di laboratorio, l'attitudine di quattro diverse specie di lievito non commerciali di tipo non – *Saccharomyces*, insieme a ceppi batterici comunemente impiegati nella produzione di kefir, a partire da vari

tipi di latte. Tutte le specie di lievito impiegate, precedentemente valutate per le loro capacità probiotiche (Agarbaty et al., 2020), sono state utilizzate in coltura pura e nella creazione di un pool di lieviti con lo scopo di proporre un mix ideale ed unico da utilizzare come starter di fermentazione.

Analizzando tutte le tesi dal punto di vista microbiologico, i batteri si mantengono vivi e vitali fino al termine del periodo di stoccaggio, mantenendo pressoché la stessa concentrazione rilevata alla fine delle 24 ore di fermentazione. Lo stesso andamento è stato riportato anche da Leite e collaboratori (2013) e Gul et al. (2015) dove le analisi microbiologiche sono state seguite rispettivamente fino a quattro e tre settimane di stoccaggio del kefir. Al contrario, Grønnevik et al. (2010) ha riportato che le concentrazioni dei batteri presenti si sono ridotte di circa 3 ordini di grandezza nel corso della conservazione a 5.5° C fino alla quarta settimana, per poi mantenersi costanti fino all'ottava.

Per quanto riguarda i lieviti la cinetica di crescita è ceppo specifica, generalmente la loro concentrazione è aumentata di circa 2/3 ordini di grandezza nel corso delle settimane, come riportato anche da Grønnevik e collaboratori (2010). In particolare, nelle prove pool, *C. zeylanoides* 13 e *Y. lipolytica* 92 hanno preso il sopravvento sugli altri lieviti in tutti i kefir prodotti, al contrario *D. hansenii* 36 e 78 tendono a subire l'effetto competizione con le altre specie, infatti questi scompaiono o si riducono al termine del periodo di stoccaggio. Inoltre *D. hansenii* 78 ha mostrato sofferenza di crescita anche in coltura pura nei kefir da latte di mucca con e senza lattosio, latte di capra e pecora, infatti la sua concentrazione si è ridotta più del doppio rispetto all'inoculo iniziale o addirittura scompare.

Riguardo i principali composti di fermentazione, la produzione di acido lattico è aumentata in tutte le tesi nel corso dello stoccaggio come evidenziato anche da Güzel – Seydim e collaboratori (2000) e Gul et al. (2015). L'entità dell'aumento è stato variabile e ceppo

dipendente, in particolare la tesi con il lievito *D. hansenii* 36 nel kefir da latte di pecora ha raddoppiato il quantitativo rispetto a quello rilevato dopo le 24 ore di fermentazione. Inoltre nei kefir da latte di mucca, capra e pecora dove è stato impiegato questo lievito è stato evidenziato il più elevato contenuto di lattosio residuo, indicandone un minor utilizzo. Per quanto riguarda le altre tesi non sono state rilevate sostanziali differenze tra di loro.

Relativamente alla produzione di acido acetico, non è stato evidenziato alcun incremento ad eccezione di piccoli aumenti in alcune tesi. Questo potrebbe essere dovuto al mancato utilizzo di batteri acetici come parte del pool fermentativo.

L'etanolo è prossimo allo zero, nonostante i lieviti rimangano vivi e vitali per tutto il periodo. Al contrario, in letteratura è stata riportata una produzione di etanolo sia al termine della fermentazione che durante lo stoccaggio (Grønnevik et al. 2011; Gul et al. 2015; Yıldız – Akgül et al., 2018). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che i lieviti hanno utilizzato i nutrienti del substrato per la crescita cellulare e non per la fermentazione alcolica.

Relativamente ai prodotti secondari di fermentazione, questi risultano essere ceppo specifici e in stretta relazione alla matrice impiegata. In generale, il kefir che vede impiegato il lievito *D. hansenii* 36 e il pool di lieviti è quello che ha mostrato la maggior varietà di sottoprodotti di fermentazione. Ad esempio il kefir prodotto da latte di pecora con l'inoculo di *D. hansenii* 36 ha esibito il più elevato contenuto di acetoino (odore burroso) ed etilacetato (aroma di ananas), risultando anche il più gradevole a livello gusto – olfattivo.

Generalmente nei kefir ottenuti con l'utilizzo di *Y. lipolytica* 92 sono stati osservati i più alti livelli di acetaldeide (aroma di mela verde, erba tagliata), questo riflette il suo considerevole contenuto anche nei kefir inoculati con il pool di lieviti dove *Y. lipolytica* 92 ha comunque preso il sopravvento. Il contenuto di acetaldeide, quando presente in eccesso può influire negativamente sul prodotto conferendo note aromatiche di solvente. A tale proposito dalla

degustazione è emerso che i kefir ottenuti dall'impiego di *Y. lipolytica* 92 e il pool di lieviti sono stati quelli che hanno ottenuto il maggior punteggio in acidità e sentore amaro. Questo non è stato riscontrato nei kefir ottenuti con latte di pecora, dove l'acetaldeide non è stata rilevata in nessuna tesi, sottolineando l'importanza di interazione lieviti – matrice nella produzione dei sottoprodotti di fermentazione, responsabili di aroma e gusto dei prodotti finali.

In conclusione, i lieviti e i batteri mantenendosi vivi e vitali fino al termine del periodo di conservazione, hanno dimostrato di poter coesistere senza influenzarsi negativamente l'uno con l'altro e contribuire ciascuno alla complessità aromatica del prodotto finale, la quale è risultata maggiore nel pool di lieviti proprio dovuta all'apporto di ciascuno di essi.

Il pool microbico così messo a punto ha dimostrato la sua valenza anche nella fermentazione di diverse matrici – latte, e quindi di poter essere proposto come valido mix nella produzione di kefir come bevanda probiotica.

Sicuramente ulteriori studi saranno necessari, ma i risultati ottenuti su scala di laboratorio, incoraggiano alla valutazione dell'efficacia del pool di lieviti, dapprima su scala pilota e poi su scala industriale.

CAPITOLO 6 – RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Adolfsson, O., Meydani, S. N., & Russell, R. M. (2004). Yogurt and gut function. *The American journal of clinical nutrition*, 80(2), 245-256.
- 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.
- Agarbati, A., Marini, E., Galli, E., Canonico, L., Ciani, M., & Comitini, F. (2020). Characterization of wild yeasts isolated from artisan dairies in the Marche region, Italy, for selection of promising functional starters. *LWT*, 110531.
- Alissa, E. M., & Ferns, G. A. (2012). Functional foods and nutraceuticals in the primary prevention of cardiovascular diseases. *Journal of nutrition and metabolism*, 2012.
- Balthazar, C. F., Pimentel, T. C., Ferrão, L. L., Almada, C. N., Santillo, A., Albenzio, M., ... & Cruz, A. G. (2017). Sheep milk: physicochemical characteristics and relevance for functional food development. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 16(2), 247-262.
- Barłowska, J., Szwajkowska, M., Litwińczuk, Z., & Król, J. (2011). Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10(6), 291-302.
- Bottazzi, V. (1993). *Microbiologia e biotecnologia lattiero-casearia*. Edagricole.
- Bourrie, B. C., Willing, B. P., & Cotter, P. D. (2016). The microbiota and health promoting characteristics of the fermented beverage kefir. *Frontiers in microbiology*, 7, 647.
- Butel, M. J. (2014). Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, 44(1), 1-8.
- Cappelli P., Vannucchi V., *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazione*, Zanichelli Editore terza edizione (2005).
- Capurso, L. (2016). Il microbiota intestinale. *Recenti Progressi in Medicina*, 107(6), 257-266.
- Chandan, R. C., & Kilara, A. (Eds.). (2013). *Manufacturing yogurt and fermented milks* (p. 496). Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell.
- Cocchi, M., & Mordenti, A. L. (2005). Gli alimenti per la salute. *Gli alimenti per la salute*, 1000-1084.

- Corradini, C. (1995). *Chimica e tecnologia del latte. Tecniche nuove.*
- Cozzani, I., & Dainese, E. (2006). *Biochimica degli alimenti e della nutrizione.* Piccin.
- Delavenne, E., Mounier, J., Asmani, K., Jany, J. L., Barbier, G., & Le Blay, G. (2011). Fungal diversity incow, goat and ewe milk. *International journal of food microbiology*, 151(2), 247-251.
- Doron, S., & Snyderman, D. R. (2015). Risk and safety of probiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 60(suppl_2), S129-S134.
- El Sohaimy, S. A. (2012). Functional foods and nutraceuticals-modern approach to food science. *World Applied Sciences Journal*, 20(5), 691-708.
- Farag, M. A., Jomaa, S. A., El-Wahed, A., & R El-Seedi, H. (2020). The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*, 12(2), 346.
- Farnworth, E. R., & Mainville, I. (2003). Kefir: a fermented milk product. *Handbook of fermented functional foods*, 2, 89-127.
- Farris G. A., Gobbetti M., Neviani E., Vincenzini M., *Microbiologia dei prodotti alimentari.* Casa editrice Ambrosiana prima edizione (2012).
- Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., de Souza Vandenberghe, L. P., & Soccol, C. R. (2017). Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. *Food Microbiology*, 66, 86-95.
- Fologné, B., Dewulf, J., Vandekerckove, P., Pignède, G., & Pot, B. (2010). Probiotic yeasts: anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World journal of gastroenterology: WJG*, 16(17), 2134.
- Frank, J. F. (2007). Milk and dairy products. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Third Edition (pp. 141-155). American Society of Microbiology.
- Gagliardi, A., Totino, V., Cacciotti, F., Iebba, V., Neroni, B., Bonfiglio, G., ... & Schippa, S. (2018). Rebuilding the gut microbiota ecosystem. *International journal of environmental research and public health*, 15(8), 1679.
- Garrote, G. L., Abraham, A. G., & De Antoni, G. L. (2010). Microbial Interactions in Kefir: A natural probiotic drink. *Biotechnology of lactic acid bacteria: novel applications*, 327.
- Griffiths, M. (Ed.). (2010). *Improving the safety and quality of milk: Milk production and processing.* Elsevier.

- Grønnevik, H., Falstad, M., & Narvhus, J. A. (2011). Microbiological and chemical properties of Norwegian kefir during storage. *International Dairy Journal*, 21(9), 601-606.
- Guetouache, M., Guessas, B., & Medjekal, S. (2014). Composition and nutritional value of raw milk. *J Issues Biol Sci Pharm Res*, 2350, 1588.
- Gul, O., Mortas, M., Atalar, I., Dervisoglu, M., & Kahyaoglu, T. (2015). Manufacture and characterization of kefir made from cow and buffalo milk, using kefir grain and starter culture. *Journal of dairy science*, 98(3), 1517-1525.
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., & Donkor, O. N. (2019). Characterization of yeasts isolated from traditional kefir grains for potential probiotic properties. *Journal of Functional Foods*, 58, 56-66.
- Güzel-Seydim, Z. B., Seydim, A. C., Greene, A. K., & Bodine, A. B. (2000). Determination of organic acids and volatile flavor substances in kefir during fermentation. *Journal of Food composition and Analysis*, 13(1), 35-43.
- Hantsis-Zacharov, E., & Halpern, M. (2007). *Chryseobacterium haifense* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from raw milk. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(10), 2344-2348.
- Hati, S., Mandal, S., & Prajapati, J. B. (2013). Novel starters for value added fermented dairy products. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, 1(1), 83-91.
- Hotel, A. C. P., & Cordoba, A. (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *Prevention*, 5(1), 1-10.
- Hrelia S., Leoncini E., Angeloni C., *Piante per alimenti funzionali e probiotici.*, in: *Le piante industriali per una agricoltura multifunzionale*, MILANO, Edizioni Avenue Media, (2009), pp. 39 – 58.
- Jones, P. J. (2002). Clinical nutrition: 7. Functional foods—more than just nutrition. *Cmaj*, 166(12), 1555-1563.
- Khalid, K. (2011). An overview of lactic acid bacteria. *International journal of Biosciences*, 1(3), 1-13.
- Karl, J. P., Margolis, L. M., Madslien, E. H., Murphy, N. E., Castellani, J. W., Gundersen, Y., ... & Pasiakos, S. M. (2017). Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(6), G559-G571.

- Khan, I. T., Nadeem, M., Imran, M., Ullah, R., Ajmal, M., & Jaspal, M. H. (2019). Antioxidant properties of Milk and dairy products: a comprehensive review of the current knowledge. *Lipids in Health and Disease*, 18(1), 1-13.
- Kourelis, A., Kotzamanidis, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Scouras, Z. G., Tzanetakis, N., & Yiangou, M. (2010). Preliminary probiotic selection of dairy and human yeast strains. *Journal of Biological Research*, 13, 93.
- 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.
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (Eds.). (2011). *Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects*. Crc Press.
- Leite, A. M. O., Leite, D. C. A., Del Aguila, E. M., Alvares, T. S., Peixoto, R. S., Miguel, M. A. L., ... & Paschoalin, V. M. F. (2013). Microbiological and chemical characteristics of Brazilian kefir during fermentation and storage processes. *Journal of dairy science*, 96(7), 4149-4159.
- 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.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2014). Fermented food in the context of a healthy diet: how to produce novel functional foods?. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 17(6), 574-581.
- Liguri G., *Nutrizione e dietologia. Aspetti clinici dell'alimentazione*. Zanichelli Editore prima edizione (2015).
- Lopitz-Otsoa, F., Rementeria, A., Elguezabal, N., & Garaizar, J. (2006). Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Revista Iberoamericana de Micología*, 23(2), 67-74.
- Lugli, G. A., Milani, C., Turrone, F., Duranti, S., Mancabelli, L., Mangifesta, M., ... & Ventura, M. (2017). Comparative genomic and phylogenomic analyses of the Bifidobacteriaceae family. *BMC genomics*, 18(1), 1-15.
- Martín-Diana, A. B., Janer, C., Peláez, C., & Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(10), 827-833.
- Nielsen, B., Gürakan, G. C., & Ünlü, G. (2014). Kefir: a multifaceted fermented dairy product. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 6(3-4), 123-135.

- Nuraida, L. (2015). A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, 4(2), 47-55.
- Oliver, S. P., Boor, K. J., Murphy, S. C., & Murinda, S. E. (2009). Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne pathogens and disease*, 6(7), 793-806.
- Otles, S., & Cagindi, O. (2003). Kefir: A probiotic dairy-composition, nutritional and therapeutic aspects. *Pakistan journal of nutrition*, 2(2), 54-59.
- Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Lactic acid bacteria: genetics, metabolism and applications*, 279-289.
- 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.
- Prudencio, E. S., Esmerino, E. A., da Silva, M. C., & da Cruz, A. G. (2020). *Probiotic and Prebiotics in Foods: Challenges, Innovations and Advances*. Academic Press.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2011). Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International journal of food microbiology*, 150(2-3), 81-94.
- Quigley, L., O'Sullivan, O., Stanton, C., Beresford, T. P., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Cotter, P. D. (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), 664-698.
- Rattray, F.P. and O'Connell, M.J. (2011). Fermented Milks Kefir. In: Fukay, J. W. (ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (2th ed). Academic Press, San Diego, USA, p.518-524.
- Rollema, H. S. (1992). Casein association and micelle formation. *Advanced dairy chemistry-1: Proteins.*, (Ed. 2), 111-140.
- Rosa, D. D., Dias, M. M., Grześkowiak, Ł. M., Reis, S. A., Conceição, L. L., & Maria do Carmo, G. P. (2017). Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits. *Nutrition research reviews*, 30(1), 82-96.
- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Le lait*, 85(1-2), 39-56.
- Sacristán, N., González, L., Castro, J. M., Fresno, J. M., & Tornadijo, M. E. (2012). Technological characterization of *Geotrichum candidum* strains isolated from a traditional Spanish goats' milk cheese. *Food microbiology*, 30(1), 260-266.
- Sarkar, S. (2007). Potential of kefir as a dietetic beverage—a review. *British Food Journal*.

- Serra, M., Trujillo, A. J., Quevedo, J. M., Guamis, B., & Ferragut, V. (2007). Acid coagulation properties and suitability for yogurt production of cows' milk treated by high-pressure homogenisation. *International Dairy Journal*, 17(7), 782-790.
- Tamime, A. Y. (2002). Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56(4), S2-S15.
- Tsakalidou, E., & Odos, I. (2012, April). Microbiota of goat's milk and goat's milk cheese. In *First Asia Dairy Goat Conference* (Vol. 9, p. 39).
- Van den Tempel, T., & Jakobsen, M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *International dairy journal*, 10(4), 263-270.
- 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.
- Wouters, J. T., Ayad, E. H., Hugenholtz, J., & Smit, G. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 12(2-3), 91-109.
- Yıldız-Akgül, F., Yetişemiyen, A., Şenel, E., & Yıldırım, Z. (2018). Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir produced by secondary fermentation. *Mljekarstvo/Dairy*, 68(3).
- https://www.crea.gov.it/documents/59764/0/Dossier+LG+2017_CAP10.pdf/627ccb4d-4f80-cc82-bd3a-7156c27ddd4a?t=1575530729812
- <https://www.informaimpresa.it/item/alimentazione-etichettatura-prodotti-caseari>
- <https://www.istitutodanone.it/wp-content/uploads/2014/09/1998-I-latti-fermentati.pdf>
- <https://kefiritalia.it/cose-il-kefir/>