

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA CORSO DI
LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE
ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

**Valutazione delle potenzialità di ceppi selezionati di lieviti per
l'ottenimento di ingredienti alimentari a partire da farina di grillo**

Tesi in

Microbiologia delle fermentazioni

Microbiologia avanzata e predittiva (c.i.)

Relatore

Prof.ssa Rosalba Lanciotti

Correlatrici

Dott.ssa Francesca Patrignani

Dott.ssa Lucia Camprini

Presentata da

Cristina Brusei

Sessione II

Anno Accademico 2017-2018

Sommario

1. Insetti edibili	1
1.1 Grillo domestico (<i>Acheta domestica</i>)	3
1.2 Farina di grillo.....	5
2. <i>Yarrowia lipolytica</i>	6
2.1 <i>Yarrowia</i> come fonte di ingredienti alimentari e coadiuvanti tecnologici	9
2.2 Attività lipolitica di <i>Yarrowia lipolytica</i>	12
3. <i>Debaryomyces hansenii</i>	13
3.1 Proprietà fisiologiche e biochimiche	15
3.2 Applicazioni tecnologiche di <i>Debaryomyces hansenii</i>	16
4. Obiettivi	22
5. Materiali e metodi	24
5.1 Preparazione idrolizzato	24
5.2 Analisi microbiologiche.....	25
5.3 Analisi chimico-fisiche	25
5.4 Analisi Gas cromatografica degli acidi grassi	27
5.5 Analisi del profilo in molecole volatili	28
6. Risultati	29
6.1 Analisi microbiologiche.....	29
6.2 Determinazione del pH	30
6.3 Quantificazione del chitinizzato	31
6.4 Estrazione ed analisi degli acidi grassi	31
6.5 Analisi degli acidi grassi.....	32
6.6 Analisi delle molecole volatili	40
6.7 Principal Component Analysis (PCA).....	45
7. Conclusioni	47
8. Bibliografia	50

1. Insetti edibili

Gli insetti commestibili sono stati tradizionalmente consumati come cibo in Africa, Asia e America latina grazie al loro alto valore nutritivo derivante dalla loro composizione in proteine, grassi, vitamine e minerali (Tab.1) (van Huis et al., 2013).

Tab 1. Quantificazione dei principali nutrienti (g/100g) in insetti edibili quali *Hermetia illucens*, *Acheta domestica* e *Tenebrio molitor* (González et al., 2018).

Samples	Wheat	<i>H. illucens</i>	<i>A. domestica</i>	<i>T. molitor</i>
Protein	12.69 ± 0.60 ^a	45.09 ± 0.82 ^b	56.58 ± 0.86 ^d	48.82 ± 0.76 ^c
NPN	-	0.52 ± 0.02 ^a	0.66 ± 0.00 ^b	0.85 ± 0.07 ^c
Fat	1.19 ± 0.02 ^a	35.82 ± 0.66 ^d	27.08 ± 0.72 ^b	30.69 ± 0.80 ^c
Ash	0.64 ± 0.01 ^a	4.25 ± 0.00 ^c	4.02 ± 0.01 ^b	4.25 ± 0.01 ^c
Carbohydrates	85.57 ± 0.58 ^d	14.84 ± 0.35 ^b	12.33 ± 0.41 ^a	16.24 ± 0.63 ^c
Chitin	-	3.52 ± 0.22 ^a	4.46 ± 0.44 ^b	4.73 ± 0.51 ^b

NPN= non protein nitrogen

Gli insetti sono consumati da 2,5 miliardi di persone in tutto il mondo (Van Huis et al., 2013), le specie più consumate appartengono agli ordini dei Coleotteri, Ditteri, Imenotteri, Isotteri, Lepidotteri e Ortotteri (Payne et al., 2016).

L'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) ha recentemente proposto un elenco di specie di insetti con il maggior potenziale per essere utilizzati come alimenti e mangimi nell'UE, compresi i seguenti:

- *Musca domestica*,
- *Hermetia illucens*,
- *Tenebrio molitor*,
- *Zophobas atratus*,
- *Alphitobius diaperinus*,
- *Galleria mellonella*,
- *Achroia grisella*,
- *Bombyx mori*,
- *Acheta domesticus*,

- *Grylodes sigillatus*,
- *Locusta migratoria migratorioides*,
- *Schistocerca americana* (Comitato scientifico EFSA, 2015).

È stato di recente suggerito che gli insetti edibili possano essere una risorsa alimentare alternativa adatta a proteggere e prevenire la carenza proteica di origine animale globale presente e futura (van Huis et al., 2013). Con il crescente interesse per il consumo di insetti edibili, l'allevamento industriale di insetti (grillo domestico in particolare) è in rapida espansione grazie alla sua fornitura costante ed economicità (Hanboonsong e al., 2013). Mangiare insetti interi non è ancora diffuso nei paesi occidentali, a causa delle caratteristiche visive dell'insetto che provocano sentimenti di neofobia alimentare (Megido et al., 2016). Per calmare la percezione negativa è stata suggerito l'utilizzo di forme non riconosciute di insetti commestibili, ad esempio come farina polverizzata in polvere (Kim et.al., 2016; Megido et.al., 2016; Schouteten et.al., 2016).

Oltre 2000 specie di insetti commestibili sono considerate come cibo a livello globale (Jongema 2016). Le proprietà funzionali di pochi insetti edibili sono state investigate, ad esempio le proteine della cavalletta adulta (*Zonocerus variegatus*) e delle larve di Westwood (*Cirina forda*) sono note per avere proprietà di idratazione ed emulsione migliori rispetto alle proteine vegetali come quelle della soia (Olaofe et al., 1998; Omotoso 2006; Osasona e Olaofe 2010).

Al giorno d'oggi, una delle sfide alimentari più diffuse è la fornitura adeguata di proteine e / o energia (Alexandratos e Bruinsma, 2003; Klunder et al., 2012; Van Huis et al., 2013). Le proteine ricavate da insetti sono una alternativa economicamente vantaggiosa e più sostenibile delle proteine animali, ad es. carne e pollame (Steinfeld et al., 2006; van Huis et al., 2013; Msangi e Rosegrant, 2012). Si è scoperto che le proteine contenute negli insetti hanno un grande potere nutrizionale potenziale, in quanto ricchi di aminoacidi essenziali (Belluco et al., 2013; Blasquez et al., 2012; Finke, 2002; Rumpold e Schlüter, 2013; Verkerk et al., 2007). L'alto valore nutritivo degli insetti commestibili ha attratto l'attenzione dei ricercatori e dell'industria alimentare per il loro potenziale utilizzo nella formulazione di alimenti con caratteristiche nutrizionali avanzate funzionali. Inoltre, gli insetti possono essere buone fonti di acidi grassi polinsaturi il cui consumo è considerato un mezzo per migliorare la salute (Haddad et al., 2012; Mozzon

et al., 2002; Pacetti et al., 2013) e sono ricchi di minerali (ad esempio ferro, selenio e zinco) e vitamine (principalmente quelle del gruppo B) (Van Huis et al., 2013).

In alcuni paesi europei come Belgio e Paesi Bassi sono già disponibili insetti e alimenti a base di insetti destinati al consumo umano, ad es. crocchette e hamburger di grillo (Poma et al., 2017; Stoops et al., 2017). De Oliveira et al., 2017 hanno suggerito l'uso di scarafaggio cinereo (*Nauphoeta cinerea*) per arricchire il contenuto proteico del pane di grano.

1.1 Grillo domestico (*Acheta domesticus*)

Composizione nutrizionale

Il contenuto nutrizionale dei grilli domestici varia a seconda della fonte, ma generalmente è un alimento con elevate quantità di proteine insieme ad acidi grassi insaturi, carboidrati e minerali essenziali. Un fattore importante che determina il contenuto nutrizionale è il mangime fornito agli insetti. In media 100 g di farina di grillo contengono 67,8 g di proteine, 5,5 g di carboidrati e 5,6 g di grassi fornendo fino a 350 kilocalorie (European Journal of Clinical Nutrition, 2016; Finsect Oy, 2017).

Le proteine sono composti organici costituiti da amminoacidi. La tipologia di aminoacido costituente la catena proteica influenza la qualità di quest'ultima. La tabella 1.1 presenta i 13 aminoacidi presenti nei grilli domestici, di cui sette sono essenziali per il metabolismo umano. Gli aminoacidi essenziali sono istidina, iso-leucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina.

I grilli domestici contengono anche arginina, cisteina e glutammina che pur non essendo essenziali sono necessari per le difese del nostro organismo contro la malattia o lo stress. (Organizzazione per l'alimentazione e l'agricoltura delle Nazioni Unite, 2013, Nature Education, 2010; MedPlus, 2015).

Tab. 1.1 Composizione amminoacidica del grillo (Finke, 2002)

Amino acids	g/16 g nitrogen
Alanine	8.8 (8.8, 8.9)
Arginine	6.1 (6.1, 6.1)
Aspartic acid	7.7 (7.1, 8.4)
Cystine	0.8 (0.8, 0.8)
Methionine	1.4 (1.3, 1.5)
Lysine	5.4 (5.4, 5.4)
Isoleucine	4.4 (4.3, 4.6)
Leucine	9.8 (9.5, 10.0)
Phenylalanine	3.0 (2.8, 3.2)
Threonine	3.6 (3.6, 3.6)
Tryptophan	0.6 (0.5, 0.6)
Glutamic acid	10.4 (10.4, 10.5)
Histidine	2.3 (2.2, 2.3)

La composizione glucidica del grillo è costituita da glucosio immagazzinato in forma di glicogeno (polisaccaride a più ramificazioni) negli adipociti, e può essere facilmente degradato quando necessario tramite glicolisi (Solunetti, 2006b). I lipidi nel grillo domestico si trovano sotto forma di trigliceridi, all'interno degli adipociti unitamente al glicogeno. Sono la forma più comune di lipidi e agiscono come riserva energetica degli animali (Solunetti, 2006a).

I trigliceridi sono costituiti da una molecola di glicerolo esterificata con tre molecole di acido grasso. Gli acidi grassi presenti nei grilli domestici sono: acidi linoleico, oleico palmitico e stearico, che compongono la maggior parte degli acidi grassi presenti nei grilli domestici, e piccole quantità di acido palmitoleico, miristico e linolenico. (Hutchins e Martin, 1968).

Oltre ad essere una riserva di energia nel corpo, i grassi aiutano l'assorbimento di alcune vitamine e minerali e svolgono un ruolo chiave diverse funzioni corporee. I grassi possono essere classificati come grassi monoinsaturi, polinsaturi, saturi (cis e trans). I grassi mono e polinsaturi sono considerati grassi "buoni" mentre i grassi saturi trans sono quelli più dannosi per la salute (Harvard Medical School, 2015).

Il 7% della massa corporea dei grilli domestici è costituito da fibre grezze e circa il 3% è costituito da minerali come fosforo, potassio, calcio, magnesio e zolfo. Inoltre, si possono trovare piccole quantità di zinco, manganese, ferro, rame, alluminio e sodio

(Defoliart et al., 1992).

La chitina è il più importante componente dell'esoscheletro di insetti. Appartiene alla classe degli zuccheri: è infatti un polisaccaride azotato $(C_8H_{13}O_5N)_n$ costituito da unità di N acetil-D-glucosammina unite da legami β (1-4) glicosidici che formano delle lunghe catene a cui di solito sono legate proteine e altri polisaccaridi; quando le catene si aggregano, grazie a legami idrogeno che vanno a formare delle lamine, il polisaccaride presenta definite caratteristiche di elevata resistenza ed elasticità.

La chitina negli umani sensibili causa reazioni mediate dal sistema immunitario attraverso le immunoglobuline E. Chi è allergico ai crostacei dovrebbe essere consapevole del fatto che una reazione allergica potrebbe verificarsi anche durante il consumo di insetti.

Ulteriori studi hanno però dimostrato come la chitina, anche se è un allergene, può avere la funzione contraria, rinforzando la risposta del sistema immunitario di specifici gruppi di persone. La chitina potrebbe quindi risultare un'ottima alternativa agli antibiotici attualmente utilizzati negli allevamenti grazie alla sua capacità di indurre una resistenza non specifica nei confronti di batteri patogeni e virus, anche se andranno sicuramente effettuati degli studi per esaminare la qualità della pratica nel campo medico e industriale (Van Huis et al., 2013).

1.2 Farina di grillo

Le proprietà funzionali delle proteine del grillo, solubilità e formazione di gel dipendono fortemente dalla concentrazione di tali proteine e dal pH (Adebowale et al., 2005; Yi et al., 2013).

La farina di grillo può andare incontro a deterioramento idrolitico, ossidativo, microbico ed enzimatico. L'irrancidimento dei grassi causa l'insorgenza di una colorazione anomala, sapori e odori sgradevoli. L'idrolisi dei trigliceridi comporta la rottura della molecola di trigliceride che si rompe liberando gli acidi grassi dai loro legami esteri con la molecola di glicerolo (Nordic Food Lab, 2016). Acidi grassi particolarmente corti possono essere facilmente rilevati in piccole quantità attraverso un cattivo odore o sapore. La presenza di acqua agisce come catalizzatore del fenomeno idrolitico (Mattila et al., 2001). L'ossidazione è provocata dall'esposizione all'ossigeno presente nell'aria che comporta la formazione dei radicali liberi, radicali perossilici e diversi composti non

radicalici come aldeidi e chetoni (World Food Logistics Organization, 2008; Dave e Ghaly, 2011). Il deterioramento microbico è causato da microrganismi come batteri, muffe e lieviti. La rapidità con cui questa degradazione avviene dipende molto dal tempo di conservazione, dall'igiene durante manipolazione, dalla temperatura di conservazione e dalla quantità iniziale di microrganismi presenti nel prodotto. Oltre all'odore e al sapore sgradevoli causati da idrolisi e ossidazione, batteri, muffe e lieviti possono causare viscosità, scolorimento, inacidimento e gas nella e della matrice (Garg et al., 2009).

Gli enzimi possono fungere da catalizzatore del processo di scadimento della qualità del prodotto accelerando le reazioni chimiche causa dell'irrancidimento. Gli enzimi possono già essere nel prodotto o derivanti dalla crescita batterica (Garg et al., 2009).

I danni enzimatici e microbiologici possono essere controllati attraverso uno stoccaggio a basse temperature, con la mancanza di aria e la manipolazione sterile del prodotto, incrementando considerevolmente la durata di conservazione del prodotto. (Garg et al., 2009).

2. *Yarrowia lipolytica*

Yarrowia appartiene alla famiglia *Hemiascomycetes*. Il nome generico *Yarrowia* è stato proposto da Van der Walt e Von Arx (1980), a seguito di un nuovo genere identificato da David Yarrow nel laboratorio di microbiologia di Delft (Yarrow, 1972). Il nome della specie "lipolytica" deriva dalla capacità di questo lievito di idrolizzare i lipidi. Inizialmente è stata classificata nel genere *Candida spp.* Con la scoperta della formazione di ascospore (osservata alla fine degli anni '60) la specie è stata successivamente descritta nel genere *Endomycopsis* come *Endomycopsis lipolytica*.

I problemi tassonomici associati alla denominazione del genere *Endomycopsis* fecero sì che fosse cambiato in *Saccharomycopsis* negli anni '70, e la specie divenne nota come *Saccharomycopsis lipolytica*. Tuttavia, *Saccharomyces lipolytica* è stata osservata significativamente diversa da altre specie nel genere, specialmente nelle caratteristiche morfologiche delle sue ascospore e nella sua capacità di produrre il coenzima Q-9 (Barth e Gaillardin, 1996). Sulla base di queste differenze, è stato creato un nuovo genere *Yarrowia* e la classificazione tassonomica più recente la descrive come *Yarrowia lipolytica*. È l'unica specie del genere. Alberi filogenetici costruiti dai sequenziamenti

della grande subunità 26s ribosomiale del DNA e della piccola subunità RNA ribosomiale hanno confermato lo stato tassonomico unico di questa specie.

Questo lievito è considerato non patogeno ed è classificato come GRAS (generalmente riconosciuto come sicuro), è inoltre utilizzato in diversi processi industriali. Questo lievito non convenzionale è anche un organismo modello in diverse aree di ricerca, in particolare secrezione, dimorfismo, tolleranza salina e metabolismo lipidico (Beopoulos et al., 2010). *Y. lipolytica* cresce su estratto di malto agarizzato, dando colonie di colore bianco-tannico che possono essere da morbide, lisce e luccicanti a opache, dure, vecchie e rugose. La crescita asessuata avviene per germogliamento multilaterale su una base stretta. Le cellule sono sferoidali, ellissoidali o allungate e si presentano singolarmente come coppie o piccoli grappoli. L'organismo è caratteristicamente dimorfico, oltre alle cellule di lievito, produce abbondanza di pseudo micelio e vero e proprio micelio (ife) con dimensioni di 3-5 μm di larghezza e fino a diversi millimetri di lunghezza. Lo stress da calore e la crescita in presenza di N-acetilglucosamina inducono il passaggio dal lievito alla crescita micellare, mentre la coltura su idrocarburi tende a dare più cellule di lievito.

La riproduzione sessuale con la formazione di ascospore è indotta dalla coltura di cellule diploidi su agar Yeast Mold. Il citrato stimola la sporulazione. Gli asci sono da sferici a ovali, e contengono da uno a quattro ascospore di forma abbastanza variabile. Le ascospore possono essere sferoidali, a forma di cappello e piatte e possono avere una superficie liscia o ruvida, con o senza sporgenza.

Altre caratteristiche chiave della specie sono le seguenti:

- incapacità di fermentare zuccheri;
- assimilazione di una gamma di alcoli, polioli e acidi organici;
- produzione di ureasi, coenzima Q-9 e lipasi extracellulari e proteasi;
- incapacità di assimilare il nitrato.

Y. lipolytica non è fermentativa, la sua energia deriva dall'assimilazione aerobica di substrati dal carbonio. Ad eccezione del glucosio, non è in grado di assimilare la maggior parte degli zuccheri esosi e pentosi, ma è ben nota la capacità di questa specie

di lievito di accumulare lipidi e di utilizzare composti idrofobi come grassi, olio, acidi grassi e n-alcane (Mafakher et al., 2010; Mirbagheri et al., 2012).

Questa specie è capace di una buona crescita a temperature fino a 4-5 °C, il limite superiore per la crescita è di 35-37 °C. È stata segnalata la crescita in yogurt, latte e formaggio conservati a 4-10 °C. Forte crescita si verifica anche in range di pH compresi tra 3.0-8.0. La crescita è debole a pH 2,0 e assente a pH 1,5 e 9,0.

La *Y. lipolytica* non è mai stata considerata come un lievito salino o tollerante allo zucchero, ma recentemente è stata riscontrata la tolleranza al sale in presenza di concentrazione di NaCl al 10% (p/v) a pH 3,0. La proprietà tollerante al sale di questa specie spiega, in parte, il suo frequente isolamento dai formaggi.

In natura, ceppi lipolitici di *Yarrowia* sono spesso isolati da prodotti lattiero-caseari come formaggi (ad es. Camembert, Livarot, Rokpol, Roquefort), yogurt e salsicce (Fickers et al., 2005a). Si trova in una vasta gamma di ecosistemi quali suoli, acque marine, micorrize, ambienti inquinati dal petrolio (Beopoulos et al., 2010; Thevenieau et al., 2009).

La *Y. lipolytica* è frequentemente associata al deterioramento dei prodotti caseari, tra cui latte, kefir e formaggi, e può anche essere trovata negli yogurt. È capace di una forte crescita nel latte, dando una popolazione finale di 10^7 - 10^8 UFC. Sebbene non sia in grado di utilizzare il lattosio nel latte, metabolizza altri componenti come proteine, grassi e acidi organici lattici, citrici, piruvici e acetici. I principali prodotti finali di questa crescita includono aminoacidi liberi quali leucina, acido glutammico, valina, fenilalanina e arginina che sono indicatori di degradazione proteica, mentre glicerolo e acidi grassi liberi, tra cui oleico, caprilico, laurico, caproico, mistico e palmitico sono indicatori dell'attività lipolitica.

Sviluppandosi nei formaggi crea off flavour e addolcimento della cagliata. Inoltre, metabolizza la tirosina con produzione di pigmenti di melanina che conferiscono una colorazione marrone superficiale del formaggio.

La *Y. lipolytica* è spesso isolata dalle superfici e zone interne di formaggi morbidi e stagionati, come il Camembert e le varietà a venature blu, dove può essere la specie predominante di lievito essendo un componente naturale della flora secondaria o di maturazione di questi prodotti. Tuttavia, il suo contributo preciso alla qualità di questi

formaggi non è chiaro.

Esistono pochissime informazioni quantitative sulla presenza di lieviti nel burro, nella crema e negli oli (Lanciotti et al., 2005a). Tuttavia, le specie lipolitiche come la *Y. lipolytica* possono crescere sulla superficie del burro (Liu et al., 2015) e nella crema, con conseguente produzione di aromi.

La lipolitica è associata al deterioramento dei prodotti a base di carne rossa, frutti di mare, pollame, Il deterioramento dei frutti di mare è generalmente attribuito alla crescita dei batteri, ma la capacità di *Y. lipolytica* di sopravvivere ad aw di 0,89 e di migrare alla frazione lipidica gli conferisce un vantaggio competitivo sui batteri in ambiente salino e ittico.

2.1 *Yarrowia* come fonte di ingredienti alimentari e coadiuvanti tecnologici

La *Y. lipolytica* esibisce una gamma di proprietà biochimiche di potenziale valore per l'industria alimentare. L'acido citrico è ampiamente usato nell'industria alimentare e farmaceutica come agente acidificante e aromatizzante. I ceppi nativi di *Y. lipolytica* sono utilizzati per la produzione di acido citrico (Pfizer Inc. e ADM, USA) ad alte concentrazioni di questo acido. Tale produzione di acido citrico lo rende generalmente considerato come alterativo. Aggiungendo come co-substrati per lo sviluppo di *Y. lipolytica* stearina e glicerolo grezzo forniti si è assistito a un aumento della sintesi lipidica e ad un aumento della produzione di acido citrico, il quale viene espulso dalla cellula in quantità relativamente elevate (fino a 14 g/L) (Papanikolaou et al., 2002).

Nello studio di Lanciotti et al., 2005a tra gli scopi c'era quello di identificare, tra i molteplici ceppi di *Y. lipolytica* analizzati, quelli che davano risultati migliori in termini produzione dell'acido citrico. La produzione di acido citrico può arrivare fino a 5,2 g/L nei ceppi isolati da alimenti refrigerati.

La produzione di specifici agenti aromatizzanti alimentari di *Y. lipolytica* è un'altra area di interesse commerciale. L'acido α chetoglutarico da *Y. lipolytica* viene impiegato come precursore di esaltatori di sapidità (Krzysztof et al., 2018). L'agente aromatizzante alla pesca, l' γ -decalattone, ha un valore significativo per l'industria alimentare ed è prontamente prodotto dalla *Y. lipolytica* dalla bio-conversione dell'acido ricinoleico da olio di ricino. *Y. lipolytica* è stata utilizzata per la biotrasformazione di monoterpeni a basso prezzo come limonene e piperitone in sostanze aromatiche ad alto valore

commerciale. Il processo, condotto in coltura di fermentazione, comporta la conversione di limonene in acido perillico (conversione al 50%) e piperitone in 7-idrossipiperitone (conversione all'8%) (Encyclopedia of Food Microbiology, 1999).

Y. lipolytica produce un emulsionante, liposan, che presenta una buona attività di emulsione nell'intervallo di pH 2-5 e ha un potenziale utilizzo nella lavorazione degli alimenti. Liposan contiene circa l'85% di carboidrati e il 17% di proteine e può essere utilizzato per stabilizzare le emulsioni olio-in-acqua con oli vegetali commerciali. È stabile a temperature fino a 70 °C.

Le forti attività proteolitiche e lipolitiche di *Yarrowia* hanno attirato un interesse commerciale significativo nel settore lattiero-caseario. Esistono numerosi brevetti per l'uso di *Y. lipolytica* come una nuova cultura starter per la produzione di formaggio in quanto:

- in grado di favorire lo sviluppo degli aromi durante la maturazione,
- ha la capacità di competere con altri lieviti presenti nel formaggio,
- è compatibile i batteri lattici utilizzati nella produzione di formaggio,
- produce gli enzimi proteolitici appropriati per il miglioramento del sapore.

Potrebbero esserci applicazioni di questo lievito nella produzione di salsicce di carne fermentata. Inoltre, proteasi o lipasi isolate dai lieviti potrebbero essere aggiunte direttamente al formaggio o alle salsicce per migliorare lo sviluppo del sapore. Negli anni Ottanta, vi sono stati diversi brevetti su *Y. lipolytica* per la secrezione di proteine ricombinate (Darvishi et al., 2017; Madzak 2015), lipasi (Artechno, Belgio), eritritolo (Baolingbao Biology Co., Cina), lievito di foraggio e probiotici (Skotan SA, Polonia).

British Petroleum (UK) ha prodotto proteine monocellulari da questo lievito per l'alimentazione del bestiame (Toprina G) fino al 1978 coltivandolo su farina di soia, oli grezzi, scarti di lavorazione dell'olio d'oliva, saponi e materiale vegetale (Groenewald et al., 2014; Darvishi e Harzevili, 2014). Inoltre, i ceppi di *Y. lipolytica* geneticamente modificati sono utilizzati per la produzione di acido eicosapentenoico (EPA) (DuPont, USA), enzimi lisosomiali umani per il trattamento delle malattie da accumulo lisosomiale (Oxyrane, Belgio e Regno Unito), e lipasi per il trattamento dell'insufficienza pancreatica esocrina (Mayoly Spindler, Francia,) come terapie

sostitutive enzimatiche (Sibirny et al., 2014). Inoltre, i ceppi nativi di *Y. lipolytica* sono applicati per il biorisanamento di ambienti contaminati con composti aromatici alifatici, inquinanti organici, 2,4,6-trinitrotoluene e metalli (Darvishi e Harzevili, 2014). Pertanto, questo lievito oleaginoso non convenzionale è un valido candidato per applicazioni industriali e ambientali. Lo scopo della ricerca svolta da Lanciotti et al. 2005a è stato quello di valutare la capacità di diversi ceppi di *Y. lipolytica*, di origine diversa, di crescere nelle acque di scarico dei frantoi (OMW) e di ridurre il livello di COD. Tutti i ceppi sono stati in grado di crescere in OMW non diluito; Alcuni ceppi hanno determinato una significativa riduzione del contenuto di polifenoli, mentre altri hanno causato il suo apparente aumento. Inoltre, alcuni ceppi di *Y. lipolytica* hanno prodotto alte concentrazioni di acido citrico. Questi risultati hanno evidenziato che alcuni ceppi di *Y. lipolytica* sono buoni candidati per la riduzione del potenziale di inquinamento di OMW e per la produzione di enzimi e metaboliti come la lipasi e l'acido citrico.

Obiettivi dello studio svolto da Papanikolaou et al. 2002 è stato di studiare la risposta biochimica di *Y. lipolytica* durante la crescita su glicerolo (il principale sottoprodotto della produzione di biodiesel) al fine di produrre prodotti metabolici di importanza industriale. Il basso contenuto di azoto ha portato all'escrezione dell'acido citrico. Vong et.al., 2016 hanno utilizzato *Y. lipolytica* per la fermentazione di Okara (residuo di soia), un sottoprodotto della produzione di latte di soia e tofu. Il lievito in seguito alla fermentazione di okara ha aumentato significativamente la quantità di aminoacidi, lipidi, succinati, acidi grassi liberi e la capacità antiossidante. In particolare, c'è stato un netto aumento di umami.

Gardini et al., 2006 hanno identificato e caratterizzato alcune importanti proprietà tecnologiche di specie di lievito presenti durante tutto il processo di maturazione del Pecorino Crotonese. Tutti i ceppi di *Y. lipolytica* hanno assimilato il citrato e il lattato. Gli isolati di *Y.* hanno evidenziato anche le più alte attività proteolitiche e lipolitiche e la capacità di catabolizzare la tirosina producendo un pigmento marrone. Inoltre, sono stati in grado di decarbossilare ornitina, fenilalanina, tirosina e lisina. Tuttavia, non erano in grado di produrre istamina, ammina biogenica prodotta da tre ceppi di *D. hansenii*.

Y. lipolytica è stata utilizzata da Lopes et al., 2018 per sintetizzare simultaneamente i lipidi ex novo e per produrre acido citrico e lipasi dal grasso animale (lardo di maiale), aggiungendo un valore aggiunto ad una materia prima a basso costo.

Y. lipolytica è normalmente presente nella carne cruda. Obiettivo dello studio svolto da Nagy nel 2014 è stato di caratterizzare i lieviti presenti nella matrice. Da 62 campioni di diverse carni crude sono stati isolati 291 ceppi di lievito, dai quali 118 ceppi si sono dimostrati membri del gruppo *Yarrowia*. Tre di queste sono nuove. Alcuni prodotti derivanti da *Y. lipolytica* vengono impiegati nell'industria farmaceutica, come l'acido β idrossibutirrico per la diminuzione dei rischi cardiovascolari (Bankar et al., 2009) e l'alcol deidrogenasi per la produzione di β bloccanti a partire da alcoli alogenati (Gatter et al., 2016).

2.2 Attività lipolitica di *Yarrowia lipolytica*

L'insorgenza, la crescita e l'attività biochimica di *Y. lipolytica* negli alimenti è molto legata alla sua forte produzione di proteasi extracellulari e lipasi. L'*XPR2* è il gene che codifica per queste proteasi (Davidow et al., 1987; Matoba et al., 1988; Nicaud et al., 1989). La biochimica e la genetica della produzione e dell'escrezione delle proteasi sono state studiate approfonditamente. Sono state identificate almeno quattro diverse proteasi, che includono tre proteasi acide, una proteasi alcalina (pH ottimale 9.0) e una proteasi neutra. Altri enzimi extracellulari o legati alla parete prodotti da questo lievito sono RNasi, fosfatasi acida e α -mannosidasi.

Il lievito *Y. lipolytica* degrada substrati idrofobici molto efficienti come n-alcani, acidi grassi, grassi e oli, che hanno specifiche vie metaboliche, per la produzione di proteine mono cellulari, acidi organici e lipasi (Fickers et al., 2005b; Kamzolova, 2005). Le lipasi (EC 3.1.1.3) sono tra le classi più importanti di enzimi industriali. Le lipasi sono utilizzate nella produzione di detersivi, cosmetici, prodotti farmaceutici, esaltatori di sapidità e alimenti (Corzo e Revah, 1999, Cancino, 2008). Il fatto che le lipasi rimangano attive in vari solventi organici ha permesso il loro uso nella catalisi delle reazioni inter- e di trans esterizzazione degli oli e nella trans esterificazione (Song, 2006). La *Y. lipolytica* è in grado di produrre diverse lipasi (extracellulari, legate alla membrana e intracellulari) in base alla composizione dei media e dalle condizioni ambientali (Pereira-Meirelles, 2000, Fickers et al., 2004). Choupina et al., 1999 hanno

identificato due geni produttori di lipasi (LIP1 e LIP3). Pignede et al., 2000 hanno isolato e caratterizzato il gene LIP2, che codifica per la lipasi extracellulare YLip2 (38,5 kDa) che agisce preferenzialmente nelle posizioni 1 e 3 del gliceride. Hanno inoltre dimostrato che questo gene è responsabile di tutta l'attività lipolitica extracellulare di *Y. lipolytica*. Yu et al., 2007 e Fickers et al., 2005b hanno riferito che la produzione di lipasi extracellulare è stata migliorata dalla mutazione chimica e che le proprietà della lipasi mutante erano le stesse di quelle del tipo selvaggio (peso molecolare 38kDa, pH ottimale 7 e temperatura ottimale 37 ° C). Fickers et al., 2005b sono riusciti ad isolare i geni LIP7 e LIP8, che codificano per lipasi extracellulari.

3. *Debaryomyces hansenii*

Specie di *Debaryomyces* si trovano comunemente nel suolo, acqua di mare, piante, alimenti (formaggio, carne, vino, birra, frutta e prodotti ad alto grado zuccherino) e campioni clinici.

La classificazione tassonomica attuale comprende 15 specie all'interno del genere, sebbene sia stata proposta una specie aggiuntiva *Debaryomyces prosopidis*. *Debaryomyces hansenii* (forma imperfetta *Candida famata*) è di gran lunga la specie più significativa trovata negli alimenti. Delle altre specie, ci sono solo occasionali segnalazioni sull'isolamento di *Debaryomyces polymorphus*, *Debaryomyces etchellsii*, *Debaryomyces maramus* e *Debaryomyces carsonii* dai cibi.

L'inclusione di specie all'interno del genere ha subito una revisione significativa nel corso degli anni. La prima grande descrizione del genere di Lodder e Kreger-van Rij nel 1952 comprendeva solo cinque specie, cioè *D. hansenii*, *Debaryomyces kloeckeri*, *Debaryomyces subglobosus*, *Debaryomyces nicotianae* e *Debaryomyces vini*. La classificazione di Lodders 1970, basata in gran parte su test di fermentazione e assimilazione, combinò le prime quattro di queste specie in una specie di *D. hansenii* e introdusse sette nuove specie, *Debaryomyces castellii*, *Debaryomyces coudertii*, *Debaryomyces marama*, *Debaryomyces phaffii*, *Debaryomyces cantarellii*, *Debaryomyces tamarisii* e *Debaryomyces vanriji*. Nel 1978 Price et al. proposero una revisione delle specie nel genere dopo uno studio dettagliato della similarità della sequenza del DNA mediante cinetica di riassociazione / ibridazione. In particolare, hanno dimostrato che diverse specie di *Pichia* erano legate ad alcune specie di

Debaryomyces. Di conseguenza, *D. cantarellii* e *D. phaffii* sono stati fusi con *Pichia polymorpha* per diventare *D. polymorfus*. Usando i dati del sequenziamento parziale delle subunità dell'RNA ribosomiale, Kurtzman et al., 1997 hanno ulteriormente perfezionato la descrizione del genere, e questo ha dato l'attuale riconoscimento di 15 specie. Un risultato notevole da questi studi è stata la stretta somiglianza di *Schwanniomyces occidentalis* con la specie *Debaryomyces*, e la sua ridefinizione come *D. occiodis* con due varietà.

Zopf nel 1889 pubblicò la prima descrizione di *D. hansenii* var. *hansenii* e Ota nel 1924 quella della var. *fabryii*. Oltre alla sequenza divergente dei loro geni 26S rRNA, vi sono differenze nella mobilità elettroforetica delle loro glucosio-6-fosfato deidrogenasi e delle temperature di crescita medie (var. *hansenii* crescere a temperature fino a 35° C mentre var. *fabryii* cresce fino a 39 ° C).

Corredor et al., 2003 ha fortemente caldeggiato l'uso di elettroforesi su gel a campo pulsato (PFGE), per separare lunghi sequenze di DNA, per un'accurata discriminazione dei ceppi di *D. hansenii*. Usando questo strumento per l'analisi del cariotipo si è scoperto che i ceppi di *D. hansenii* differiscono marcatamente al livello dell'organizzazione genomica. Il polimorfismo della lunghezza cromosomica osservata di *D. hansenii* var. *hansenii* e *D. hansenii* var. *fabryii* sembra derivare da variazioni nel numero di sequenze ripetute o riarrangiamenti cromosomici. Ceppi appartenenti a *D. hansenii* var. *fabryii* rappresentano in realtà un diverso gruppo tassonomico da *D. hansenii* var. *hansenii*.

Le specie del genere subiscono una riproduzione asessuata, con formazione di cellule singole, a coppie, a catene corte o a piccoli grappoli. Di solito manca la pseudo micelio, ma in alcune specie si possono trovare pseudo ife primitive o ben sviluppate. La riproduzione sessuale avviene tipicamente per coniugazione tra cellula madre e figlia, ma si osserva occasionalmente la coniugazione tra cellule separate Forrest et al., 1987. La variazione della morfologia e il numero di ascospore per asco fornisce un buon criterio per la differenziazione tra le specie. Le ascospore sono di solito di forma sferoidale o ovoidale e sono spesso caratterizzate da una superficie verrucosa o rugose. Il numero di ascospore per asco varia da uno a quattro a seconda della specie e, ad eccezione di tre specie, di solito non vengono liberate dall'asco.

La capacità di fermentare zuccheri varia a seconda del ceppo, il nitrato non viene

assimilato, l'ubiquinone Q-9 è presente.

La composizione lipidica è caratterizzata dalla presenza di acidi grassi linoleici (C18: 2) e linolenici (C18: 3).

3.1 Proprietà fisiologiche e biochimiche

D. hansenii è considerato non fermentativo. Metabolizza gli zuccheri a piruvato tramite la via di Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e poi ossida il piruvato attraverso il ciclo dell'acido tricarbossilico (TCA). Gli acidi organici come citrico, lattico e succinico sono assimilati attraverso il ciclo TCA. La via del pentoso fosfato funziona anche in questo lievito. Contrariamente alla visione generale, ci sono rapporti di alcuni ceppi di *D. hansenii* e *C. famata* che fermentano glucosio e altri esosi. La produzione extracellulare e la produzione di lipasi sono state riportate in alcuni ma non in tutti i ceppi. Questi enzimi non sono stati isolati e caratterizzati. Sono assenti attività amilolitiche e batteriolitiche. La caratteristica più distintiva di *D. hansenii* è la sua capacità di crescere in presenza di concentrazioni di NaCl estremamente elevate. Sebbene la risposta di crescita a NaCl vari con il ceppo, la maggior parte cresce in presenza di NaCl al 15% (p / v) e ci sono alcuni ceppi che crescono al 20-24% (p / v) di NaCl (Butinar et al., 2005). È stata riportata anche tolleranza al sale elevata per *D. etchellsii*. La tolleranza al sale di *D. hansenii* è maggiore a valori di pH vicini a 5,0 e diminuisce a pH 3,0 e pH 7,0. La crescita di *D. hansenii* è molto debole a pH 2,5 ma forte nell'intervallo di pH 3,0-8,0. Molti autori hanno fatto l'osservazione qualitativa che *D. hansenii* mostra una crescita più veloce a 1-5 ° C rispetto ad altre specie di lievito. *D. hansenii* non è particolarmente tollerante nei confronti di conservanti o trattamenti termici. Alcuni ceppi hanno una forte tendenza al flocculo e questo potrebbe essere un potenziale meccanismo di sopravvivenza in ambienti ostili.

Debaryomyces hansenii può essere causa deterioramento di:

- salami,
- salumi fermentati,
- carni macinate,
- frutti di mare,

- salse di pesce,
- yogurt,
- formaggi,
- verdure in salamoia,
- insalate a base di maionese,
- insilati.

3.2 Applicazioni tecnologiche di *Debaryomyces hansenii*

D. hansenii viene impiegato in ambito biotecnologico come coltura starter per salsicce fermentate e non fermentate, in prodotti come wurstel, pancetta, prosciutti; per la stagionatura dei formaggi; come agente di biocontrollo del deterioramento batterico (*Clostridium*) e fungino; come produttore di xilitolo (Gírio et.al., 2000) e amilasi; e per la produzione di proteine mono cellulari (Gardini et al.,2001; Sørensen, 1997; Ramos et al.,2017).

In alcuni casi, la presenza del lievito, era associata allo sviluppo di uno strato superficiale viscoso sul prodotto. La predominanza di *D. hansenii* nei prodotti a base di carne rispetto ad altri lieviti, e queste conclusioni sono state estese ai prodotti ittici come il pesce fresco. L'impatto di questa crescita del lievito sul sapore dei prodotti a base di carne non è chiaro, ma non può essere considerato negativo. Esiste una correlazione positiva tra il sapore desiderato di alcuni salumi italiani e la presenza di *D. hansenii*. Alcuni, ma non tutti, i ceppi di *D. hansenii* isolati dai prodotti a base di carne producono proteasi extracellulari e lipasi che potrebbero contribuire allo sviluppo dei sapori attraverso la degradazione delle proteine e dei grassi della carne. La capacità di questi enzimi di funzionare bene a basso pH può essere una proprietà desiderabile.

I fattori di selezione per la crescita di *D. hansenii* nei prodotti a base di carne sono:

- tolleranza al sale,
- utilizzo di acidi organici (ad esempio lattico),
- proteasi e lipasi,
- buona crescita a basse temperature,
- la capacità di alcuni ceppi di utilizzare nitrito di sodio.

D. hansenii / *C. famata* sono ora diventati i lieviti più importanti nel settore lattiero-caseario. Le specie debolmente fermentanti sono state collegate al deterioramento degli yogurt, ma il loro più grande significato è nella produzione di formaggio, specialmente per i formaggi molli con muffa come il Camembert, il Brie e le varietà a venature blu (Deak e Beuchat, 1996).

Molte indagini su questi e altri tipi di formaggi hanno rivelato un'incidenza elevata di *D. hansenii*, spesso in popolazioni di 10^6 - 10^7 cfu g/L. Il lievito ha origine come contaminante naturale del formaggio, crescendo sia nella parte esterna che interna della cagliata durante la fase di maturazione. Welthagen e Viljoen , 1998 e Laubscher e Viljoen, 1999 suggerirono che la capacità di *D. hansenii* di moltiplicarsi nel formaggio, insieme alla sua capacità di assimilare il lattato, citrato, lattosio e galattosio, favoriscono questo organismo come un componente delle colture starter per la produzione di formaggio. Sono stati trovati casi in cui l'attività metabolica di *D. hansenii* è stata in grado di modificare il microambiente del formaggio a beneficio di alcuni batteri desiderati e / o *Penicillium roqueforti*, e di proteggere il formaggio da fermentazioni di carboidrati indesiderati (Van den Tempel e Jacobsen, 2000; Yamauchi et al., 1976). Il formaggio Danbo danese è un formaggio semiduro stagionato in superficie, che prima della maturazione viene immerso in salamoia fino a 24 ore. Solo per *D. hansenii* sono stati riscontrati conteggi ≥ 3.5 log CFU / mL nella salamoia, ciò a ulteriore dimostrazione della capacità di questo lievito di tollerare concentrazioni di NaCl paria a 8% (p / v) (Haastrup et al., 2018).

Arfi et al., 2002 hanno riscontrato che il lievito sviluppa acidi volatili, sapore alcolico e composti carbonilici. *D. hansenii* ha un odore di rosa appassita che potrebbe essere spiegato da un'alta concentrazione di 2-feniletanolo.

Le specie *Debaryomyces*, in particolare *D. etschellsii*, sono spesso isolate da salamoie utilizzate per fermentare prodotti come olive e cetrioli e sono anche associate a prodotti fermentati tradizionali giapponesi come la salsa di soia e il miso (Seiler, 1991; Viljoen e Greyling, 1995).

Durante la crescita del latte, *D. hansenii* produce solo piccole quantità di amminoacidi liberi (prevalentemente acido glutammico, glicina, arginina, prolina e alanina) e acidi grassi liberi (Roostita e Fleet, 1996)

Il lievito metabolizza piccole quantità di acido succinico e produce piccole quantità di etanolo (<5 g/l) e acido lattico durante la stagionatura superficiale del formaggio danese (Petersen et al. 2002). Van den Tempel e Jacobsen nel 2000 hanno studiato il contenuto di enzimi di vari ceppi di *D. hansenii*, fosfatasi, C4-esterasi, C8-esterasi-lipasi, leucina arilamidasi, valina arilamidasi, aminopeptidasi, β -galattosidasi e α - e β -glucosidasi. L'attività intrapeptidasi è stata trovata in *Brevibacterium linens* e *D. hansenii* da Leclercq-Perlat et al., 2000; Klein et al., 2002 confermarono questo risultato e trovarono una peptidasi in *D. hansenii* con attività nei confronti dei peptidi derivati dalla β -caseina, che ha significativamente influenzato la proteolisi nel formaggio. Kumura et al., 2002 riportarono anche la digestione della caseina (sia α che β -caseina) di *D. hansenii* isolato dal formaggio.

È stato suggerito che *D. hansenii* potrebbe fornire importanti fattori di crescita per i batteri, come vitamine (lacto flavone, tiamina, acido pantotenico, acido nicotinico, acido folico e biotina) e amminoacidi (Schlegel, 1993), insieme a componenti aromatici, lipolitici e enzimi proteolitici che contribuiscono al processo di maturazione (La Riviere, 1969 e Lenoir, 1984).

Il coinvolgimento di *Debaryomyces* nella fermentazione della carne è noto da molto tempo; Rankine nel 1964 ha brevemente descritto i ceppi *Debaryomyces* come produttori di idrogeno solfito. Dura et al., 2004 hanno dimostrato che *Debaryomyces* può generare ammoniaca e diversi composti volatili, alterare il contenuto di amminoacidi liberi delle salsicce essiccate. Flores et al., 2004 hanno riportato che *Debaryomyces spp.* può avere effetti importanti sulla generazione di composti volatili durante la maturazione delle salsicce fermentate a secco inibendo la generazione di prodotti di ossidazione dei lipidi e promuovendo lo sviluppo di esteri etilici (tipico aroma di salsiccia). Corral et al., 2018 inoculando con *D. hansenii* salami di carne di cinghiale hanno osservato che durante la maturazione è stata limitata la produzione di molecole aromatiche sgradevoli caratteristiche della carne proveniente da cacciagione, infatti la lipolisi effettuata dal lievito ha prodotto acidi grassi a corta catena, esteri e aldeidi ramificate che contribuiscono a un odore fruttato. Inoltre in uno studio condotto da Cano-García et al., 2014, l'inoculo del ceppo di *D. hansenii* P2 ha provocato una diminuzione dei valori di ossidazione dei lipidi (TBARS) e conseguentemente una

riduzione delle aldeidi derivati dall'ossidazione dei lipidi.

Esistono diversi rapporti riguardanti gli enzimi di *D. hansenii* che possono essere coinvolti nella fermentazione della carne, il primo dei quali è stato pubblicato da Bolumar et al., 2003a che identificarono e purificarono una prolil aminopeptidasi. In un altro studio riguardante l'attività di esopeptidasi durante la maturazione di una salsiccia fermentata, hanno purificato e caratterizzato un'ulteriore (arginil) aminopeptidasi (Bolumar et al., 2003b). Dura et al., 2004 hanno descritto una glutaminasi che è attiva durante la lavorazione delle salsicce essiccate.

Gli enzimi litici di *D. hansenii* sono stati, e continueranno a essere, sfruttati nell'industria alimentare. Le proteasi del lievito potrebbero essere utilizzate per rimuovere i batteri dalla birra e dal vino (Fleet, 1992) e gli enzimi idrolitici extracellulari del lievito sono stati studiati a causa della loro importanza nella fermentazione del vino (Charoenchai et al., 1997). Ahearn et al., 1968 hanno studiato 68 ceppi di *D. hansenii* a causa della sua associazione con il deterioramento degli alimenti, e hanno trovato solo quattro ceppi con attività proteolitica extracellulare, mentre Lagace e Bisson, 1990 hanno trovato poca o nessuna attività proteasica extracellulare in *D. hansenii*. Saha e Bothast, 1996 hanno esplorato la produzione di β -glucosidasi extracellulari tolleranti il glucosio e termofili nella produzione di vino da 48 ceppi di lievito appartenenti ai generi *Candida*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces* e *Pichia*. Queste glicosidasi hanno dimostrato di essere in grado di idrolizzare la cellulosa in glucosio. Loman et al., 2018 hanno studiato la produzione di arabitolo da parte di *D. hansenii* utilizzando un idrolizzato di farina di soia (una nuova materia prima rinnovabile di bioraffineria contenente esosi, pentosi e fonti di azoto organico). L'arabitolo è un alcol zuccherino a basso contenuto calorico con proprietà anti-cariogene. Le β -glucosidasi di *Debaryomyces* possono liberare i monoterpenoli da β -D-glucopiranoside, β -D-xilopiranoside, α -L-arabinofuranoside e α -L-ramnopiranoside. Questa proprietà potrebbe essere utile per un possibile trattamento enzimatico come parte del trattamento dei succhi contenenti terpenolo, portando ad un aumento di composti aromatici nel vino (Yanai e Sato, 1999). Lieviti non convenzionali, come *Debaryomyces*, hanno mostrato livelli significativamente più alti di attività della β -glucosidasi in assenza di glucosio rispetto a *Saccharomyces cerevisiae*, indicando che avrebbero avuto un ruolo più importante nello sviluppo del gusto durante la produzione

del vino rispetto al lievito di birra (Charoenchai, 1997). Besancon et al., 1995 hanno isolato e parzialmente caratterizzato un'esterasi (CE 4.1.1.1) da un ceppo di *D. hansenii*. Questo enzima è stato trovato anche in altri lieviti di vino non *Saccharomyces*, ed è uno dei principali enzimi coinvolti nella vinificazione (Charoenchai et al., 1997).

Il ceppo di *D. hansenii* B-2, in uno studio condotto da Brooks, 2008, è risultato in grado di fermentare il 40% ((v / V) di glucosio a 30 ° C per produrre il 3,6 % di etanolo. Questo ceppo risulta perciò un potenziale candidato per la produzione di etanolo da bucce di banana o altre fonti di amido locali.

D. hansenii è una potenziale fonte di superossido dismutasi (SOD), un metallo enzima che catalizza la dismutazione dei radicali superossido. SOD ha importanti applicazioni nella medicina e nell'industria alimentare, tra cui l'anti infiammatorio, la modulazione della risposta immunitaria, la regressione tumorale maligna, la protezione da radiazioni e chemioterapia, la sindrome premenstruale, l'artrite e i trattamenti anti-invecchiamento, durante l'uso di camere iperbariche e contro stress ossidativo in generale (Garcia-Gonzalez e Ochoa, 1999; Orozco et al., 1998).

Debaryomyces spp. non sono generalmente considerate patogene per l'uomo e non è stata attribuita a questi organismi alcuna escrescenza di malattie di origine alimentare. Tuttavia, *D. hansenii* / *C. famata* sono stati implicati in casi isolati di setticemia e infezioni della superficie della pelle e delle mucose, dove sono considerati come patogeni opportunisti, specialmente per i pazienti immuno-compromessi (Van Uden e Fell, 1968 e Wong et al., 1982).

D. hansenii è in grado di sintetizzare tossine, ciò potrebbe essere interessante per la produzione delle tossine stesse o per facilitare la moltiplicazione di *D. hansenii*, poiché tali tossine possono limitare o prevenire la crescita di organismi indesiderati. All'inizio del 1993 Gunge et al., riferirono di una tossina (miocina) secreta da *Debaryomyces*. L'attività di questa tossina è dimostrata in presenza di sali come NaCl o KCl (Llorente et al., 1997 e Marquina et al., 2001). *D. hansenii* produce una tossina, che ha un'attività stabile contro la tossina "killer" prodotta da *Trichosporon cutaneum* and *C. zeylanoides* (Nout et al., 1996). Ad esempio, l'uso di preparati concentrati di tossina purificata in terapie contro i lieviti patogeni è abbastanza plausibile (Buzzini e Martini, 2001).

Marquina et al., 2001 hanno indagato sulle condizioni ottimali per la produzione di

tossine e hanno dimostrato che in presenza di proteine, in terreni di coltura complessi, con detergenti non ionici e additivi come dimetilsolfossido, la produzione della tossina cresce in modo significativo.

Un'altra osservazione molto interessante è stata quella che *D. hansenii* ha un'elevata tolleranza al biossido di cloro, un potente biocida (Ramirez-Orozco et al., 2001). Questa resistenza potrebbe essere usata per coltivare il lievito in un substrato contenente fino a 0,3 mg / l di ClO₂ per controllare lo sviluppo di microrganismi indesiderati.

4. Obiettivi

Gli insetti edibili sono tradizionalmente consumati in differenti parti del mondo (Africa, Asia, sud e centro America) da circa 2,5 miliardi di persone, essi hanno un alto valore nutritivo dato dalla loro composizione in proteine, grassi, vitamine e minerali. Per questa ragione è stato recentemente suggerito come gli insetti edibili possano essere una risorsa alimentare alternativa per evitare la carenza proteica animale futura (Van Huis et al., 2013). Con questo crescente interesse, l'allevamento industriale di insetti (soprattutto grillo domestico) è in rapida espansione (Hanboonsong et al., 2013). Sono oltre 2000 le specie di insetti considerate come cibo a livello globale (Jongema, 2016). Le proprietà funzionali di pochi insetti edibili sono state investigate, ad esempio le proteine della cavalletta adulta (*Zonocerus variegatus*) e delle larve di Westwood (*Cirina forda*) che sono note per avere proprietà idratanti ed emulsionanti migliori rispetto alle proteine vegetali come quelle della soia (Olaofe et al., 1998; Omotoso, 2006; Osasona e Olaofe, 2010). Recentemente l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare ha proposto una lista di specie di insetti come i più promettenti per essere utilizzati come alimenti e/o mangimi nell'UE (Comitato scientifico EFSA, 2015).

Nei paesi occidentali però non è ancora diffuso il consumo di insetti interi, probabilmente a causa delle caratteristiche visive dell'insetto che provocano sentimenti di neofobia alimentare (Megido et al., 2016). È stato quindi suggerito, per attenuare la percezione negativa, di utilizzare forme non riconoscibili di insetti commestibili (farina polverizzata o estratto di proteine in polvere) (Kim et al., 2016; Megido et al., 2016; Schouteten et al., 2016). In questo contesto la farina di grillo è uno dei prodotti che è o può, in virtù della diversa legislazione in campo alimentare dei diversi paesi, essere utilizzato in formulazioni alimentari. Ad esempio, in Belgio e Paesi Bassi sono già disponibili insetti e alimenti a base di insetti destinati al consumo umano, ad es. crocchette e hamburger di grillo (Poma et al., 2017; Stoops et al., 2017).

L'attenzione dei ricercatori e dell'industria alimentare si è quindi focalizzata sull'alto valore nutritivo degli insetti commestibili e sul loro potenziale utilizzo nella formulazione di alimenti con caratteristiche nutrizionali funzionali. Inoltre, gli insetti possono essere buone fonti di acidi grassi polinsaturi il cui consumo è considerato un

mezzo per migliorare salute (Haddad et al., 2012; Mozzon et al., 2002; Pacetti et al., 2013).

Nei prodotti ora presenti in commercio si utilizza la farina di grillo come ingrediente tal quale, tuttavia questo può rappresentare una limitazione al suo uso, dato che non sempre il sapore viene considerato gradevole ed è quindi necessario mascherarlo o limitarne la percentuale all'interno della formulazione. Inoltre, la farina di grillo è soggetta a diverse forme di deterioramento idrolitico, ossidativo, microbico ed enzimatico (Nordic Food Lab, 2016). Infatti, acidi grassi particolarmente corti possono essere facilmente rilevati in piccole quantità attraverso un cattivo odore o sapore. La presenza di acqua agisce come catalizzatore del fenomeno idrolitico (Mattila et al., 2001). L'ossidazione è provocata dall'esposizione all'ossigeno presente nell'aria che comporta la formazione dei radicali liberi, radicali perossilici e diversi composti non radicalici (aldeidi e chetoni) che possono essere facilmente rilevati da un punto di vista organolettico e che concorrono ad una percezione negativa della matrice (World Food Logistics Organization, 2008; Dave e Ghaly, 2011). Per quanto concerne il deterioramento microbico, esso è causato da microrganismi come batteri, muffe e lieviti che possono causare la comparsa di viscosità, scolorimento, inacidimento e formazione di gas nella e della matrice (Garg et al., 2009).

In questo contesto lo scopo della mia tesi di laurea è stato quello di valutare l'attitudine tecnologica di due ceppi di *Yarrowia lipolytica* e due di *Debaryomyces hansenii*, dalle comprovate capacità proteolitiche e lipolitiche in sistemi alimentari quali salami e formaggi (Patrignani et al., 2007; Patrignani et al., 2011; Lanciotti et al., 2005b; Cano-García et al., 2014; Santos et al., 2001), a sviluppare in una matrice composta da farina di grillo e acqua al fine di produrre un idrolizzato facilmente impiegabile per la successiva produzione di un alimento innovativo. Obiettivo non minoritario è stato quello di determinarne gli effetti sulla composizione in acidi grassi e sulla produzione di molecole volatili.

5. Materiali e metodi

Le prove sono state svolte al fine di caratterizzare la matrice (farina di grillo) e i campioni inoculati con i ceppi di lievito selezionati per le loro capacità lipolitiche e proteolitiche. In particolare, la scelta di *D. hansenii* è stata guidata soprattutto dal suo utilizzo come co-starter nella carne fermentata, mentre *Y. lipolytica* è stata selezionata in quanto lievito non convenzionale di grande interesse, a causa delle sue diverse applicazioni nell'industria alimentare, farmaceutica, ecc.

5.1 Preparazione idrolizzato

Per la preparazione del campione è stata utilizzata una parte di “farina”, precedentemente sterilizzata sotto lampada UV per 20 minuti, e tre parti di acqua (p/v).

I ceppi impiegati sono stati:

Specie	Ceppo	Isolamento
<i>Yarrowia lipolytica</i>	PO11	Acqua del fiume Po
	RO25	Burro light
<i>Debaryomyces hansenii</i>	DB	Crescenza
	SP6L12	Speck

Il campione è stato preparato in un becker sterile e successivamente aliquotato in beute da 250 ml con un quantitativo pari a 60 ml, al fine di mantenere uno spazio di testa, e inoculato con i lieviti ad un livello di 10^5 - 10^6 ufc/ml. Le beute sono state poste in agitatore a 25°C per 72h.

Durante l'incubazione sono stati effettuati campionamenti microbiologici e sono stati prelevate aliquote per le successive analisi chimiche quali: analisi degli acidi grassi liberi e neutri, analisi delle molecole volatili e quantificazione del chitinizzato presente nei campioni.

5.2 Analisi microbiologiche

Le analisi sono state eseguite sulla farina di grillo, sugli inoculi e sugli idrolizzati dopo 24, 48, 72 ore dall'inoculo. Per risalire al carico microbico mesofilo e di lieviti sono state eseguite diluizioni seriali decimali. I campionamenti sono stati effettuati inoculando un'aliquota nota di ciascuna diluizione su terreni selettivi di coltura agarizzati, tramite piastramento superficiale. In particolare, sono stati ricercati lieviti su Yeast extract Peptone Dextrose medium (YPD) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) e i mesofili aerobi totali su Plate Count Agar (PCA) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito).

Tutte le piastre inoculate sono state poi incubate per 48h a 30 °C in termostato.

5.3 Analisi chimico-fisiche

pH

Per la farina di grillo e gli idrolizzati a 72 ore dall'inoculo sono stati determinati i pH.

Il pH è stato misurato tramite pH-metro (BASIC 20, Crison, Modena, Italy), inserendo la sonda all'interno di una eppendorf da 2 ml contenente o il campione idrolizzato o il campione di farina diluito in acqua sterile.

Le analisi di pH sono state eseguite in triplo.

Chitinizzato

Al fine di valutare il quantitativo di chitinizzato sia per la farina che per gli idrolizzati al tempo finale (72 ore dall'inoculo) è stato impiegato il filth-test adattato alla matrice. Sono stati aliquotati 5 g di campione in una beuta (farina di grillo, PO11 T72, RO T 72, SP6L12 T 72, DB T 72) a cui sono stati aggiunti 3 mL di acido acetico al 30%, 1,5 mL di acido nitrico 65% e qualche goccia di alcool isoamilico.

L'alcool isoamilico è stato addizionato per la sua azione anti-schiuma.

È stato innestato il refrigerante sulla beuta per evitare la dispersione dei vapori.

La beuta è stata posta in agitazione su una piastra riscaldante, una volta raggiunta l'ebollizione far bollire per 5 minuti (evitando la formazione di schiuma aggiungendo

alcool isoamilico se necessario). La beuta è stata fatta raffreddare, il contenuto è stato passato in un'altra beuta dotata alla sommità di imbuto separatore. Il filtro di carta è stato pesato prima della filtrazione.

Il filtro è stato lasciato asciugare per una notte sotto cappa. Calcolando la differenza di peso tra il disco di carta vuoto e a seguito della filtrazione è stato possibile risalire al contenuto di chitinizzato nei campioni.

Estrazione di acidi grassi da farina di grillo

A 1 g di campione (posto in falcon da 15 ml) sono stati addizionati 3 g di Na_2SO_4 , 0,3 g di H_2SO_4 2.5M e 3 mL di dietiletere/eptano. Il campione ottenuto è stato centrifugato per 2 minuti a 500 rpm. Il surnatante è stato prelevato e posto in troncoconica. Il deposito solido è stato trattato nuovamente con dietiletere/eptano e centrifugato per altri due cicli in modo da favorire il passaggio degli acidi grassi nel surnatante.

La troncoconica è stata portata a secco tramite azoto e pesata. È stato aggiunto 1 g di NaSO_4 alla troncoconica e riempita con eptano.

Frazionamento

Gli acidi grassi neutri e totali sono stati frazionati tramite colonnine SPE con fase solida amminica (NH_2). Le colonnine sono state condizionate con 10 mL di eptano poi scartato. In colonna è stato addizionato il campione (20 mg). Gli acidi grassi neutri sono stati estratti con 10 mL di cloroformio-2-propanolo (2:1), e in una nuova troncoconica sono stati raccolti gli acidi grassi liberi (FFA) estratti con 10 mL di etere etilico al 2% di acido formico. Le frazioni sono state conservate a -20°C fino ad analisi gas-cromatografica.

Esterificazione e derivatizzazione

Prima dell'analisi gas-cromatografica, gli acidi grassi neutri e liberi sono stati derivatizzati mediante esterificazione.

Per quanto riguarda gli acidi grassi neutri, essi sono stati sottoposti ai seguenti passaggi:

- portati a secco con azoto,
- aggiunti 1 mL di KOH metanolico 2N e 1 mL di esano,
- vortex per 3 minuti,
- aggiungere 1 mL di esano,
- prelevare il surnatante,
- portare a secco con azoto,
- mettere esano in volume proporzionale al peso.

L'esterificazione e derivatizzazione degli acidi grassi liberi è stata effettuata portando prima a secco il campione con azoto a cui è stato poi aggiunto diazometano. Il campione è stato portato di nuovo a secco con azoto, pesato e poi vi è stato aggiunto esano in volume proporzionale al peso.

5.4 Analisi Gas cromatografica degli acidi grassi

Ai campioni è stato aggiunto C11:00 1000 ppm come standard interno, un acido grasso non presente nel campione, al fine di ottenere una sua concentrazione finale di 0,2 ppm nel campione iniettato (1 μ L). I picchi eluiti sono stati identificati confrontandone gli spettri di massa con quelli di composti puri contenuti nelle librerie NIST (NIST/EPA / NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 2011 e WILEY (sesta edizione, Stati Uniti d'America) del 1995 e con i picchi di un mix standard di acidi organici FAME (Fatty Acid Methyl Ester, Sigma-Aldrich). Per la separazione degli acidi grassi è stato usato in gascromatografo Agilent Technology 6890N, Network GC System abbinato a uno spettrometro di massa Network Mass Selective detector HP 5973. Per la separazione dei composti è stata usata una colonna capillare SPB5 SUPELCO di 60 metri di lunghezza, 0.25 mm di diametro interno e con una fase interna di 0.25 μ m. Il gas di trasporto usato è stato l'elio con un flusso di 1.5 ml/min. Il programma di temperatura utilizzato prevedeva 130° C per 7 min; poi un incremento a 180° C, con incremento 14 °C/min; incremento a 240° C, con incremento 8° C/min e infine una isoterma a 240° C.

5.5 Analisi del profilo in molecole volatili

Questa analisi è stata condotta sui campioni in modo da poter riconoscere i composti volatili in essi contenuti in relazione al ceppo utilizzato. Sono stati prelevati 3g di campione, che sono stati inseriti in vials di vetro sterili. Al campione sono stati aggiunti 10 μ L di una soluzione standard (4-metil-2-pentanololo a 5000 ppm), al fine di poter quantificare i composti presenti. La metodologia utilizzata per la caratterizzazione dei profili in molecole volatili dei campioni oggetto di studio, è la tecnica di microestrazione in fase solida (SPME), abbinata alla gas-cromatografia (GC) e spettrometria di massa (MS). Ogni campione è stato condizionato, per 10 minuti, ad una temperatura di 45 °C, al fine di consentire il passaggio delle molecole volatili dalla matrice allo spazio di testa del vial; dopodiché si è inserita, attraverso il tappo del vial, la fibra (SPME-DVB-Carboxen/PDMS 85 m, Supelco, Bellefonte, PA, USA). La fibra è stata esposta al campione per 40 minuti per permettere l'assorbimento dei composti volatili (fase di adsorbimento); trascorso il tempo indicato, le molecole adsorbite sulla superficie della fibra sono state fatte desorbire (fase di desorbimento) in colonna Chrompack CP-Wax 52 CB (Chrompack, Middelburg, Olanda) aventi le seguenti specifiche: lunghezza 50 metri, diametro interno 0,32 mm. per un tempo di 10 minuti. L'analisi è stata eseguita con un gascromatografo Agilent Technology 7890N, Network GC System abbinato a uno spettrometro di massa Network Mass Selective detector HP 5975C (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Il programma di temperatura consisteva in una partenza a 50 °C per 1 minuto, aumento di 4.5 °C/min fino a 65 °C e ulteriore aumento di 10 °C/min fino a 230 °C, permanenza a 230 °C. Il gas utilizzato come carrier era elio, con un flusso di 1mL/min. Le temperature dell'iniettore, interfaccia e sorgente di ioni erano 250, 250 e 230 °C, rispettivamente. La frammentazione ionica è avvenuta tramite impatto elettronico a 70 eV. L'identificazione delle diverse molecole aromatiche è stata svolta mediante confronto tra gli spettri di massa ottenuti e quelli di composti puri contenuti nelle librerie NIST (NIST/EPA / NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 2011 e WILEY (sesta edizione, Stati Uniti d'America) del 1995.

I dati relativi ai volatili sono stati elaborati mediante analisi della componente principale (PCA) mediante un programma di statistica (Statistica 6.0 for Windows).

6. Risultati

La farina di grillo utilizzata nella sperimentazione è stata sottoposta a campionamento microbiologico al fine di valutare il carico cellulare di batteri mesofili totali e di lieviti. L'analisi ha mostrato la presenza di un carico batterico mesofilo iniziale pari a $3,29 \pm 0,36$ log ufc/g e di lieviti pari a $3,22 \pm 0,46$ log ufc/g.

Le farine sono state addizionate di acqua (rapporto farina:acqua 1:3) e i campioni, inoculati con 10^6 log ufc/ml dei lieviti prescelti e mantenuti a 25°C, sono stati analizzati durante le 72 ore successive all'inoculo.

6.1 Analisi microbiologiche

Al fine di determinare le variazioni della matrice indotte dall'inoculo dei ceppi selezionati di lievito sono state svolte differenti analisi chimico-fisiche e microbiologiche. Tutte le analisi sono state svolte sia sulla matrice tal quale (farina di grillo) che sui campioni inoculati a diversi tempi: 24,48,72 ore dall'inoculo (Fig.1).

Come si può notare, il ceppo di *Y. lipolytica* P011 ha sviluppato e si è mantenuto a più alti valori di carico cellulare (superiori a 10^8 ufc/ml) rispetto a tutti gli altri ceppi. I ceppi RO25, DB, SP6L12 hanno mantenuto una elevata vitalità per tutto il periodo considerato. Il fatto di avere carichi cellulari al di sopra di 6.0 log ufc/ml per tutto il periodo di osservazione considerato può essere ritenuto un risultato molto interessante data la matrice inusuale in cui sono stati posti. Infatti, normalmente *Y. lipolytica* può essere ritrovata in formaggi, carne rossa, frutti di mare, pollame (Fickers et al., 2005a) mentre di *D. hansenii* in suolo, acqua di mare, formaggio, carne, vino, birra, frutta e prodotti ad alto grado zuccherino (Barnett et.al., 2000).

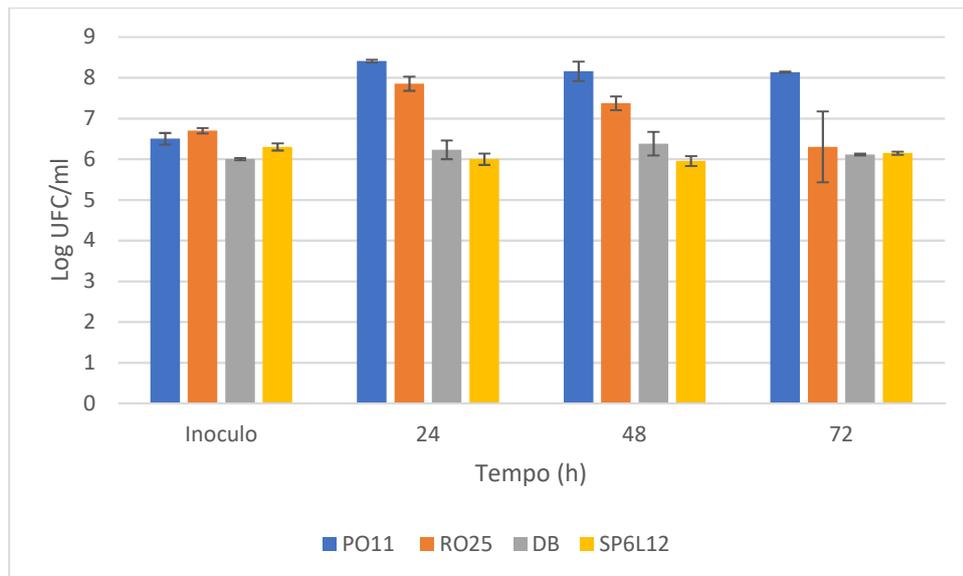


Fig. 1 Evoluzione della carica dei lieviti inoculati (log ufc/ml) nella matrice osservata nel tempo.

Analisi chimico-fisiche

6.2 Determinazione del pH

Le determinazioni del pH sono state eseguite sulla farina di grillo tal quale e sugli idrolizzati dopo 72 ore dall' inoculo con i ceppi PO11, RO25, DB, SP6L12. Come mostrato nella tabella 2 i campioni inoculati presentano un pH differente rispetto alla matrice iniziale ad eccezione del campione inoculato con *Y. lipolytica* PO11. Gli idrolizzati ottenuti con il ceppo di *Y. lipolytica* RO25 e con il ceppo di *D. hansenii* SP6L12 hanno un pH superiore, mentre quello ottenuto con *D. hansenii* DB ha un pH più acido.

Per quanto riguarda l'innalzamento del pH, esso può essere dovuto all'attività proteolitica dei ceppi che decarbossilando le proteine, oltre alla possibile trasformazione degli acidi grassi liberi in altre molecole (ad esempio esteri, aldeidi ecc.).

Tab. 2 Valori di pH della matrice tal quale e degli idrolizzati dopo 72 ore.

	Farina Grillo	PO11 T72	RO25 T72	DB T72	SP6L12 T72
pH	6,33±0,02	6,21±0,04	7,47±0,01	5,52±0,02	7,76±0,04

6.3 Quantificazione del chitinizzato

Il quantitativo di chitinizzato su g di farina o di campione è stato ottenuto tramite filth-test. L'analisi, adattata alla matrice, ha reso possibile la quantificazione del chitinizzato presente nei campioni. È possibile notare in tabella 2.1 che il quantitativo di chitinizzato risulta ridotto dopo 72 ore dall'inoculo negli idrolizzati ottenuti con i lieviti PO11, RO25 e DB rispetto alla farina tal quale. D'altra parte, l'idrolizzato ottenuto con SP6L12 ha mantenuto un contenuto di chitinizzato maggiore.

Il calo del chitinizzato è probabilmente dovuto al suo utilizzo da parte dei lieviti come fonte di carbonio per il loro sviluppo.

Tab. 2.1 Contenuto di chitinizzato calcolato per grammo di farina

	chitinizzato/g farina
Farina di grillo	0,823
PO11 T 72	0,617
RO25 T 72	0,590
DB T 72	0,504
SP6L12 T 72	0,793

6.4 Estrazione ed analisi degli acidi grassi

Il contenuto di acidi grassi della farina di grillo è pari a 27 mg/g. Negli idrolizzati il calo più significativo si nota nelle prime 24 ore, ad eccezione di quello ottenuto con RO25. D'altra parte, le differenze si attenuano già dopo 48 ore (Tabella 2.2).

È ben nota la capacità di *Y. lipolytica* di accumulare acidi grassi insaturi all'interno delle

cellule e la capacità lipolitica sia di quest'ultima che di *D. hansenii* (Sorensen, 1997; Patrignani et al., 2007; Patrignani et al., 2011), per questo sono stati analizzati i profili in acidi grassi liberi e neutri dei campioni in modo tale da poter valutare le modifiche avvenute nella matrice.

Tab. 2.2 Quantitativo di acidi grassi nella farina di grillo e negli idrolizzati (mg/g).

	mg/g
Farina di grillo	27
PO11 T24	7
PO11 T48	6
PO11 T72	4,8
RO25 T24	22
RO25 T48	8
RO25 T72	5,5
DB T24	13
DB T48	6,5
DB T72	6
SP6L12 T24	7
SP6L12 T48	5
SP6L12 T72	5

6.5 Analisi degli acidi grassi

La farina di grillo e gli idrolizzati (dopo 24, 48 e 72 ore dall'inoculo) sono stati caratterizzati per quanto riguarda la loro composizione in acidi grassi liberi e neutri durante il tempo.

Come è possibile notare dalle tabelle 2.3 e 2.4, sono stati riconosciuti 17 e 21 acidi grassi

rispettivamente liberi e neutri. Di grande importanza la presenza di acidi grassi essenziali omega 3 e 6, poiché non possono essere sintetizzati dal nostro organismo ma devono essere ottenuti tramite la dieta, già nella farina di grillo. I dati ottenuti sulla matrice tal quale sono in accordo con quelli della letteratura, in cui si nota come la composizione risulti essere piuttosto varia, con buone quantità di acidi grassi insaturi (Osimani et al., 2017). In tabella 2.5 sono esplicitati i contenuti totali di acidi grassi saturi ed insaturi dei campioni analizzati. Quelli inoculati con PO11, DB e SP6L12 mostrano un aumento della presenza di acidi grassi insaturi. Nello specifico, i campioni con ceppi di *D. hansenii* quadruplicano il quantitativo di insaturi a 72 ore dall'inoculo. Anche i grassi saturi seguono un andamento crescente, ad eccezione del campione PO11 a 72 ore dall'inoculo e SP6L12 a 48 ore dall'inoculo dove il quantitativo di acidi grassi saturi è decisamente inferiore rispetto anche alla matrice di partenza. I campioni inoculati con RO25 mantengono dei quantitativi di insaturi e saturi simili a quelli della matrice di partenza.

Tab. 2.3 Composizione in acidi grassi liberi espressi in ppm (mg/kg) equivalenti caratterizzati nella farina di grillo e negli idrolizzati (dopo 24, 48 e 72 ore dall'inoculo).

Acidi grassi		Farina di Grillo	PO11 T24	PO11 T48	PO11 T72	RO25 T24	RO25 T48	RO25 T72	DB T24	DB T48	DB T72	SP6L12 T24	SP6L12 T48	SP6L12 T72
C12:0	Dodecanoic acid	4783,4	3881,7	5487,6	6187,8	6186,1	4737,0	5307,2	2576,5	3223,3	3353,7	848,4	6423,6	4903,1
	1-iodo-dodecane	165,6	160,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	96,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C13:0	Tridecanoic Acid	0,0	0,0	0,0	0,0	839,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	122,6	0,0	0,0
C14:1n9	Myristoleic Methyl Z-9 tetradecenoate	0,0	115,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0	Tetradecanoic acid	210,0	1631,4	254,0	250,1	756,9	317,3	685,2	320,5	0,0	0,0	353,2	828,6	0,0
C15:0	Pentadecanoic acid	0,0	229,2	0,0	0,0	190,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C16:1n7	cis-7-Hexadecenoic acid	0,0	857,1	0,0	0,0	531,7	186,3	536,7	0,0	0,0	0,0	0,0	568,1	0,0
C16:1	Palmitoleic 9-Hexadecenoic acid	0,0	1614,7	0,0	233,3	726,3	339,7	949,1	0,0	0,0	0,0	0,0	763,0	0,0
C16:0	Palmitic	4616,0	91681,3	0,0	269,0	38220,9	0,0	42373,3	6970,0	0,0	2853,9	0,0	35503,6	0,0
C17:0	Heptadecanoic acid	0,0	1946,3	0,0	795,5	0,0	758,2	1608,0	0,0	873,6	509,8	0,0	1648,9	630,6
C18:2n6 c	Z 9,12-octadecadienoic acid (linoleic)	7830,2	111096,7	11516,7	16252,6	58113,7	27646,8	49587,2	12282,2	2847,6	6533,7	13568,2	57794,4	3551,0
C18:1n9 c	Z 9-ottadecenoic acid (Oleic)	5589,4	126575,8	8668,6	16779,1	60065,8	24934,6	62223,7	7345,0	1462,4	2654,9	9868,6	61211,6	3861,9
C18:1n9 t	E-9-ottadecenoic acid (Elaidic)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	25892,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2857,4
C18:0	Stearic	0,0	75320,6	0,0	0,0	29078,0	0,0	22321,4	32216,0	0,0	0,0	65140,5	0,0	0,0
C18:2n6 t	E,E-9,12-Octadecadienoic acid	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	7069,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1049,0
C20:4n6	Arachidonic acid	0,0	0,0	0,0	0,0	1710,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	850,6	0,0	0,0
C20:0	Eicosanoic acid	0,0	757,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	Insaturi	13419,7	240259,5	20185,3	33265,1	121147,6	53107,4	139189,3	19627,2	4310,0	9188,7	24287,4	120337,1	10270,3
	Saturi	9774,9	175608,2	5741,6	7502,4	75272,1	5812,5	79364,3	42179,2	4096,9	6717,5	66464,7	44404,8	6582,8

Tab. 2.4 Composizione in acidi grassi neutri (mg/kg) equivalenti nella farina di grillo e negli idrolizzati (dopo 24, 48 e 72 ore dall'inoculo).

Acidi grassi		Farina di Grillo	PO11 T24	PO11 T48	PO11 T72	RO25 T24	RO25 T48	RO25 T72	DB T24	DB T48	DB T72	SP6L12 T24	SP6L12 T48	SP6L12 T72
C12:0	Dodecanoic acid	263,5	387,2	889,3	0,0	0,0	663,4	0,0	391,1	633,1	1198,4	393,4	0,0	1829,7
	1-iodo-dodecane	0,0	0,0	1736,8	97,9	0,0	1249,9	449,5	0,0	0,0	0,0	186,1	324,6	276,5
C14:1n9	Myristoleic Methyl Z-9 tetradecenoate	0,0	0,0	152,9	0,0	0,0	115,1	0,0	0,0	0,0	291,6	0,0	0,0	346,7
C14:0	Tetradecanoic acid	1878,3	4730,9	5622,6	196,8	1183,2	4638,9	605,4	2596,6	4588,1	10493,8	2805,8	296,2	13640,8
C14:0n9	9-methyltetradecanoate	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	273,8
C14:0n12	12-methyl-tetradecanoic acid	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	444,3
C15:1	cis-10-Pentadecenoic acid	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	86,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	Pentadecanoic acid	238,3	532,4	642,7	0,0	0,0	558,7	0,0	295,8	641,9	1384,7	406,2	0,0	1616,3
C16:2n7-10	7,10-Hexadecadienoic acid	0,0	0,0	470,8	0,0	0,0	386,7	0,0	0,0	335,3	1028,3	0,0	0,0	1029,2
C16:1n7	cis-7-Hexadecenoic acid	1173,6	1557,5	3498,1	186,1	757,5	2764,0	410,5	1470,1	2766,3	7092,5	1748,7	1292,4	8254,1
C16:1	Palmitoleic 9-Hexadecenoic acid	1842,2	2625,2	5400,2	176,7	1109,7	4276,0	617,3	2253,6	4172,6	10810,8	2735,5	2818,6	12963,9
C16:0	Palmitic	111713,0	142323,4	252389,6	10259,8	70313,2	218887,5	38310,0	146245,9	236411,2	440613,0	161109,0	17135,0	519673,2
C16:1n9	9-hexadecenoic acid	0,0	0,0	208,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	440,1	0,0	0,0	0,0
C16:1n14	Hexadecanoic acid, 14 methyl	0,0	0,0	312,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	779,4	0,0	0,0	871,5
C17:0	Heptadecanoic acid	960,7	1384,0	2641,6	0,0	700,0	2365,0	349,0	1303,3	2983,3	5429,2	1401,8	0,0	6840,7
C18:2n6c	Z 9,12-octadecadienoic acid (linoleic)	120163,9	141967,0	293209,3	12899,5	76985,3	247488,8	53068,2	153688,7	260748,5	0,0	177293,9	17904,1	0,0
C18:1n9c	Z 9-ottadecenoic acid (Oleic)	120812,0	0,0	0,0	11478,9	79031,9	239934,4	57446,1	161077,0	0,0	512515,8	0,0	16260,7	629557,7
C18:3n3	Z-9,12,15-ottadecatrienoic acid (alpha-linoleic) (ALA)	0,0	127009,4	284090,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	263778,8	0,0	182987,6	0,0	0,0
C18:1n9t	E-9-ottadecenoic acid (Elaidic)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	496280,9	0,0	0,0	599216,3
C18:0	Stearic	41844,5	50896,6	111604,3	4892,0	26739,3	101872,3	16848,5	54875,2	102143,0	217506,7	66009,3	7129,4	262118,3
C20:0	Eicosanoic acid	929,6	1537,4	2227,4	0,0	0,0	2119,6	0,0	1158,0	1981,4	5244,3	1356,1	0,0	6010,6
	Insaturi	243991,6	273159,1	587341,9	24741,0	157884,5	495051,8	111542,0	318489,3	531801,6	1029239,5	364765,8	38275,7	1252239,4
	Saturi	157827,9	201791,9	377754,3	15446,5	98935,7	332355,2	56562,4	206865,9	349382,2	681870,2	233667,7	24885,1	812724,1

Tab. 2.5 Contenuti totali di acidi grassi saturi ed insaturi dei campioni analizzati.

	Farina di Grillo	PO11 T24	PO11 T48	PO11 T72	RO25 T24	RO25 T48	RO25 T72	DB T24	DB T48	DB T72	SP6L12 T24	SP6L12 T48	SP6L12 T72
Liberi Insaturi	13419,67	240259,5	20185,27	33265,08	121147,6	53107,42	139189,3	19627,2	4310,019	9188,653	24287,41	120337,1	10270,29
Neutri Insaturi	243991,6	273159,1	587341,9	24741,03	157884,5	495051,8	111542	318489,3	531801,6	1029239	364765,8	38275,74	1252239
Liberi Saturi	9774,936	175608,2	5741,597	7502,417	75272,07	5812,495	79364,26	42179,24	4096,907	6717,46	66464,71	44404,81	6582,779
Neutri Saturi	157827,9	201791,9	377754,3	15446,51	98935,73	332355,2	56562,36	206865,9	349382,2	681870,2	233667,7	24885,13	812724,1
Tot Insaturi	257411,3	513418,6	607527,2	58006,11	279032,1	548159,2	250731,4	338116,5	536111,6	1038428	389053,2	158612,8	1262510
Tot Saturi	167602,9	377400,1	383495,9	22948,93	174207,8	338167,7	135926,6	249045,2	353479,1	688587,6	300132,4	69289,94	819306,9

È stata effettuata l'analisi statistica Principal Component Analysis al fine di valutare se i diversi campioni fossero caratterizzati da peculiarità in termini acidi grassi liberi e neutri.

Per quanto riguarda gli acidi grassi liberi è possibile notare in Fig 2 come la maggior parte dei campioni è raggruppata vicino all'origine degli assi indicando la presenza di profili molto simili tra loro. D' altra parte il campione inoculato con PO11 a 24 ore si differenzia in maniera significativa, probabilmente perché era l'unico che mostrava la presenza di C20:0. Anche i campioni con RO25 a 24 e 72 ore si distinguono dal raggruppamento centrale per la presenza di acidi grassi quali C20:4n6 e C13:0 il primo e C18:2n6t, C18:1n9t e C12:0 il secondo (Fig.3).

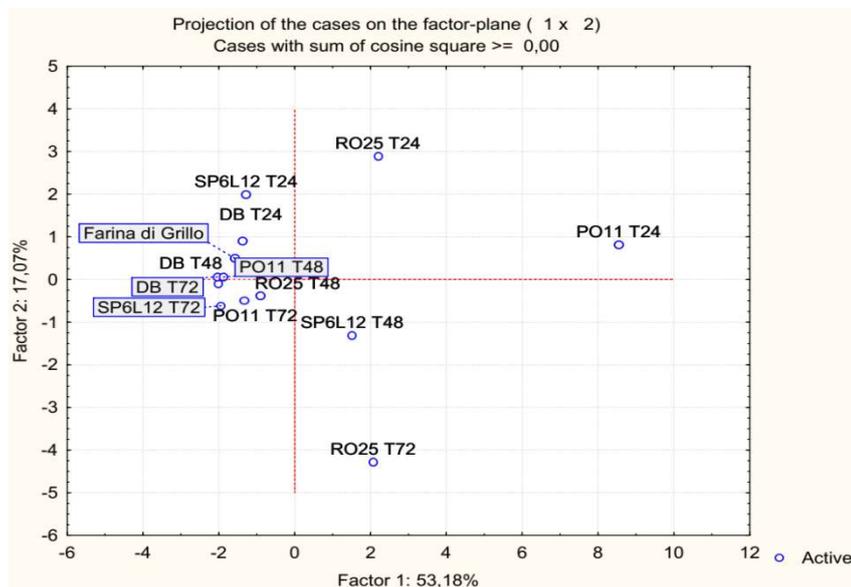


Fig. 2 Analisi del profilo in acidi grassi liberi mediante PCA. Proiezione dei casi sul piano fattoriale (1_2)

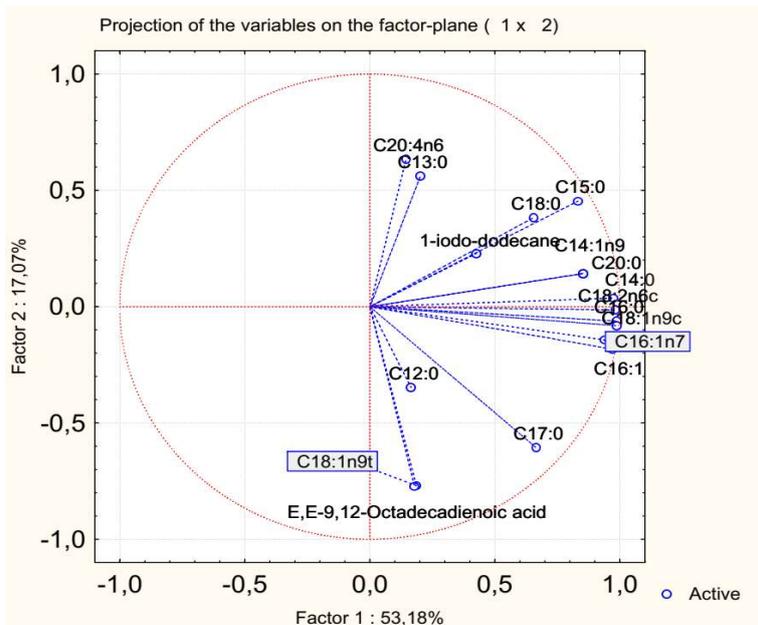


Fig. 3 Proiezione delle variabili sul piano fattoriale (1_2).

L'analisi dei risultati (Fig.4) riguardanti gli acidi grassi neutri mostra la distinzione tra un gruppo posizionato all'origine degli assi e i campioni SP6L12 e DB a 72 ore, caratterizzati entrambi da C18:1n9c e C18:1n9t e il primo anche da 9-metiltetradecanoato. Inoltre, si differenziano anche i campioni inoculati con PO11, RO25 e DB a 48 ore per la presenza di C14:2n6c, C18:3n3, C15:1 e 1-iodio-dodecane (Fig.5).

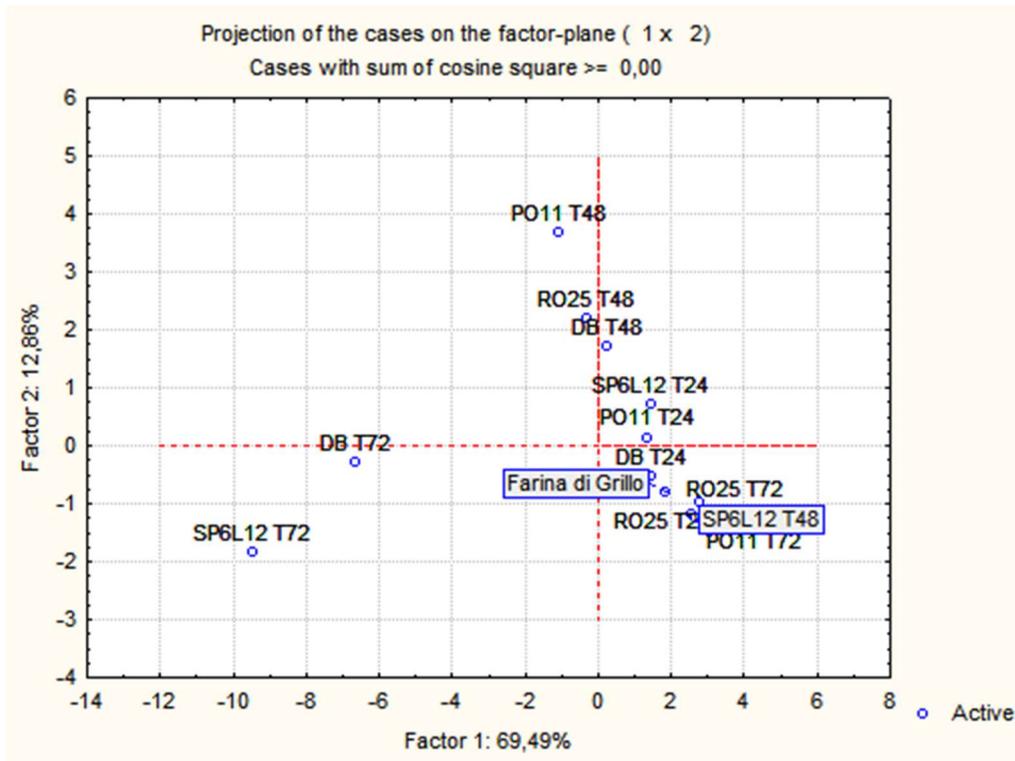


Fig. 4 Analisi del profilo in acidi grassi neutri mediante PCA.

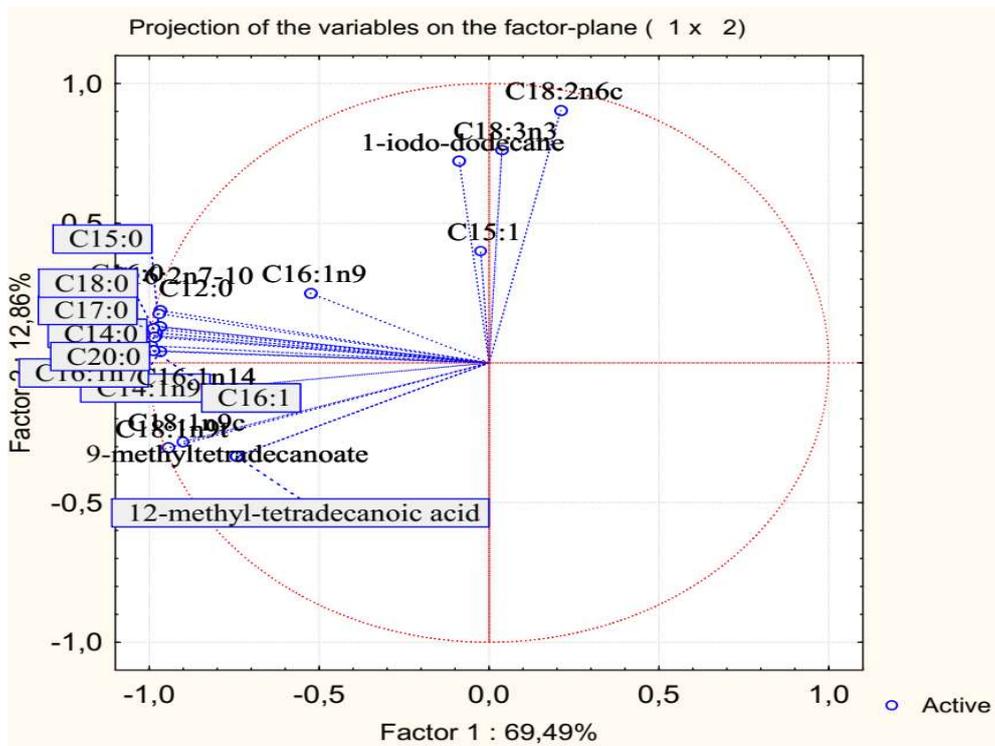


Fig. 5 Proiezione dei casi sul piano fattoriale (1_2)

6.6 Analisi delle molecole volatili

Le molecole volatili sono state rilevate tramite GC-MS-SPME e i profili ottenuti per la farina di grillo e per gli idrolizzati dopo 24,48,72 ore sono riportati in tabella 2.6 e in tabella 2.7 come ppm (mg/kg) equivalenti.

Sono state rilevate diverse molecole appartenenti a diverse classi di composti: acidi, idrocarburi, chetoni, aldeidi, alcoli, furanoni e altro. Le molecole volatili sono maggiormente presenti nella farina che negli idrolizzati. Infatti, come si può notare nella tabella 2.6 la farina presenta 69,89 mg/kg di molecole volatili, mentre gli idrolizzati con più molecole volatili sono quelli ottenuti da i ceppi RO25 dopo 72 ore e DB dopo 24 e 72 ore dall'inoculo (rispettivamente 42,87 mg/kg, 49,56 mg/kg e 45,64 mg/kg).

I composti volatili più rappresentativi nella matrice tal quale sono gli acidi seguiti da aldeidi ed alcoli. D'altra parte, per quanto riguarda gli idrolizzati ottenuti si può notare come non ci sia una vera e propria categoria dominante, ad eccezione dell'idrolizzato ottenuto con *D. hansenii* DB a tutti i tempi e quello con RO25 dopo 72 ore dall'inoculo che mostrano un'elevata presenza di acidi.

Tab. 2.6 Profili in molecole volatili ottenuti dalla farina di grillo e dagli idrolizzati dopo 24,48,72 ore.

	Farina di Grillo	PO11 T24	PO11 T48	PO11 T72	RO25 T24	RO25 T48	RO25 T72	DB T24	DB T48	DB T72	SP6L12 T24	SP6L12 T48	SP6L12 T72
Acidi	34,11	2,43	4,90	0,96	0,99	3,34	16,25	24,86	16,05	17,67	4,13	2,54	5,85
Idrocarburi	2,23	1,60	2,37	2,05	1,49	0,89	5,17	1,81	1,24	1,59	2,06	0,96	1,16
Chetoni	5,12	2,71	6,76	4,88	4,51	5,19	4,78	4,97	5,02	4,78	5,10	5,63	6,89
Aldeidi	13,36	4,32	2,01	1,10	3,94	2,96	4,64	7,89	6,53	5,94	10,10	2,96	2,92
Alcoli	8,30	3,30	3,99	4,25	3,88	3,73	7,27	4,78	4,71	5,37	5,53	2,87	8,61
Furanoni	2,87	5,86	7,77	4,99	4,27	3,84	3,44	3,33	2,46	2,87	4,63	4,50	3,64
Altro	3,91	4,86	4,72	4,53	0,96	1,92	1,31	1,93	2,57	7,44	6,26	4,19	7,28
Totale	69,89	25,07	32,52	22,77	20,05	21,88	42,87	49,56	38,59	45,64	37,82	23,66	36,35

È possibile trovare una grande varietà di diversi composti aldeidici e chetonici in piccole quantità, derivanti dal deterioramento ossidativo della farina, nello specifico l'ossidazione dei lipidi presenti. Importante notare la presenza di furanoni già nella farina di grillo, questa categoria di composti analoghi ai lattoni sembra interferire con lo sviluppo della tipica struttura dei biofilm microbici, lasciando questi microorganismi più sensibili al trattamento con antimicrobici (Ren et al., 2001; Janssens et al., 2008). Molti microrganismi Gram-negativi usano N-acyl-L-per - homoserine lactones (AHLs) per controllare la sintesi di prodotti che

facilitano l'interazione con l'ambiente circostante (*quorum sensing*). I furanoni alogenati possono inibire l'espressione genica di geni AHL-dipendenti (Manefield et al., 2002, Defoirdt et al., 2007)

Tabella 2.7 Molecole volatili in ppm (mg/kg) equivalenti riscontrate in farina di grillo e idrolizzati (T 24,48,72 successive all'inoculo).

Molecole volatili divise per classi di composti	Farina di Grillo	PO11 T24	PO11 T48	PO11 T72	RO25 T24	RO25 T48	RO25 T72	DB T24	DB T48	DB T72	SP6L12 T24	SP6L12 T48	SP6L12 T72
ACIDI													
4-(dimethylamino)-3-hydroxy-butanoic acid	3,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,26	0,00	0,00
Pentyl ester acetic acid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,51	0,40	0,15	0,13	0,00	0,00	0,35	0,25
hexyl ester acetic acid	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,34	0,27	0,25	0,24	0,00	0,19	0,19
hexyl ester formic acid	0,00	1,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Acetic Acid	7,56	0,38	2,59	0,27	0,19	1,40	2,73	5,28	6,72	7,25	0,87	0,54	0,80
Propanoic acid	1,28	0,10	0,48	0,33	0,31	0,41	0,87	0,38	0,21	0,28	0,00	0,21	0,49
Butanoic acid	0,88	0,00	0,18	0,00	0,00	0,00	0,26	0,13	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00
3-methyl-Pentanoic acid	1,07	0,00	1,65	0,00	0,24	0,80	4,18	2,09	2,17	2,44	0,00	1,12	1,60
Pentanoic acid	2,05	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,44	0,43	0,43	0,08	0,00	0,00
4-methyl-pentanoic acid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	7,06	0,00	0,00	0,32	0,00	0,00	0,00
Phenyl ester octanoic acid	0,00	0,51	0,00	0,00	0,21	0,22	0,00	0,00	0,13	0,16	0,16	0,13	2,52
Hexanoic acid	10,98	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,59	5,94	6,02	1,77	0,00	0,00
Heptanoic acid	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,07	0,40	0,00	0,00	0,00
Octanoic acid	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Nonanoic acid	0,96	0,00	0,00	0,29	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
n-hexadecanoic-acid	3,97	0,00	0,00	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Octadecanoic acid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
(E)-9-Octadecenoic acid	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
IDROCARBURI													
2,4,4-trimethyl-1-Pentene	0,00	0,08	0,00	0,16	0,20	0,00	0,00	0,16	0,00	0,12	0,00	0,00	0,00
Octane	0,00	0,00	0,16	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00	0,00
2,2,4,6,6-pentamethyl-heptane	0,60	0,03	0,15	0,00	0,10	0,00	0,00	0,08	0,08	0,08	0,11	0,00	0,00
(E)-4-Undecene	0,00	0,10	0,16	0,08	0,11	0,14	0,11	0,15	0,14	0,11	0,20	0,04	0,11
5-Undecene	0,25	0,13	0,08	0,14	0,12	0,10	0,11	0,10	0,13	0,12	0,00	0,00	0,00
2-Undecene	0,17	0,13	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

1,3,5-trimethyl-benzene	0,09	0,00	0,28	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
Dodecane	0,00	0,24	0,16	0,21	0,17	0,04	3,52	0,00	0,00	0,22	0,15	0,17	0,44
1-chloro-octane	0,12	0,19	0,12	0,11	0,17	0,15	0,19	0,25	0,12	0,20	0,36	0,40	0,00
1-methyl-2-(1-methylethyl)-Benzene	0,45	0,10	0,15	0,00	0,00	0,00	0,54	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Tetradecane	0,16	0,22	0,47	0,32	0,17	0,15	0,11	0,17	0,19	0,15	0,00	0,00	0,00
Pentadecane	0,00	0,23	0,21	0,16	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3-ethyl-2,4-dimethyl-pentane	0,38	0,17	0,00	0,00	0,21	0,00	0,00	0,08	0,00	0,03	0,42	0,00	0,00
(E)-3-Dodecene	0,00	0,00	0,36	0,39	0,23	0,30	0,59	0,67	0,56	0,56	0,67	0,35	0,61
CHETONI													
Acetone	0,79	0,09	2,49	1,86	0,38	0,28	1,66	0,51	0,35	0,00	0,00	0,29	1,84
2-Butanone	0,49	0,09	0,40	0,32	0,18	0,20	0,30	0,28	0,23	0,23	0,12	0,00	0,19
Methyl Isobutyl Ketone	0,10	0,33	0,37	0,37	0,25	0,17	0,17	0,20	0,18	0,22	0,00	0,25	0,20
2-Pentanone	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
4-methyl-3-Penten-2-one	0,35	0,33	0,20	0,21	0,29	0,24	0,18	0,28	0,21	0,32	0,25	0,11	0,23
2,6-dimethyl-4-heptanone	0,30	0,39	0,48	0,45	0,65	0,00	0,00	0,56	0,49	0,36	0,15	0,33	0,00
2-Heptanone	1,20	0,25	0,13	0,00	0,32	0,81	0,00	0,19	1,04	0,82	0,16	1,71	1,74
3-hydroxy-2-butanone	0,00	0,21	0,38	0,27	0,00	0,41	0,74	0,27	0,21	0,26	0,53	0,08	0,00
7-octen-2-one	0,00	0,32	0,00	0,00	0,18	0,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2-Octanone	0,22	0,00	0,00	0,00	0,32	0,58	0,00	0,24	0,24	0,21	0,43	0,76	0,90
2-Nonanone	0,14	0,50	0,52	0,33	0,42	0,47	0,39	0,53	0,38	0,33	0,55	0,46	0,59
3-octen-2-one	1,03	0,00	0,30	0,14	0,25	0,29	0,32	0,84	0,71	0,59	0,96	0,18	0,37
2-Decanone	0,00	0,00	1,35	0,82	0,15	0,90	0,72	0,00	0,00	0,55	0,93	0,57	0,83
(E,E)-3,5-Octadien-2-one	0,49	0,00	0,00	0,00	1,12	0,31	0,30	0,97	0,80	0,70	1,04	0,90	0,00
2-Undecanone	0,00	0,00	0,14	0,11	0,00	0,00	0,00	0,11	0,17	0,18	0,00	0,00	0,00
ALDEIDI													
Butanal	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,00
3-methyl-butanal	0,44	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Pentanal	0,79	0,01	0,12	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00	0,14	0,13	0,00
Hexanal	5,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,09	0,00	0,89	0,00	0,00
(E)-2-methyl-2-butenal	0,31	0,13	0,11	0,06	0,12	0,11	0,03	0,09	0,09	0,09	0,00	0,00	0,06
Heptanal	0,64	0,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	0,00	1,60	0,00	0,00
Octanal	0,67	0,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,15	0,20	0,56	0,00	0,00

6.7 Principal Component Analysis (PCA)

È stata effettuata l'analisi statistica Principal Component Analysis al fine di valutare se i diversi campioni fossero caratterizzati da peculiarità in termini di composti volatili. La maggior parte dei campioni è raggruppata vicino all'origine degli assi (Fig 6) indicando la presenza di profili molto simili tra loro. I campioni inoculati con *D. hansenii* DB a 24, 48 e 72 ore dall'inoculo, come descritto anche in precedenza, si differenziano per la presenza di acidi (acido acetico ed acido esanoico). L'inoculo di *Debaryomyces spp.* può avere effetto inibente sull'ossidazione lipidica in quanto produce etil esteri, ma inoculi troppo alti possono aumentare la produzione di acidi che mascherano questo effetto positivo (Flores et al., 2004). *Y. lipolytica* RO25 a 72 ore dall'inoculo si differenzia dagli altri a causa della presenza di alcoli, soprattutto di alcool etilico. Il campione inoculato con *D. hansenii* SP6L12 mostra una differenziazione nel tempo, infatti a 24 ore dall'inoculo è caratterizzato da un maggior contenuto di aldeidi (2-butil-2-octenale, eptanale, nonanale, benzaldeide), mentre a 48 e a 72 ore dall'inoculo i campioni si riavvicinano all'origine degli assi, mostrando un riavvicinamento del campione all'origine degli assi (Fig. 7)

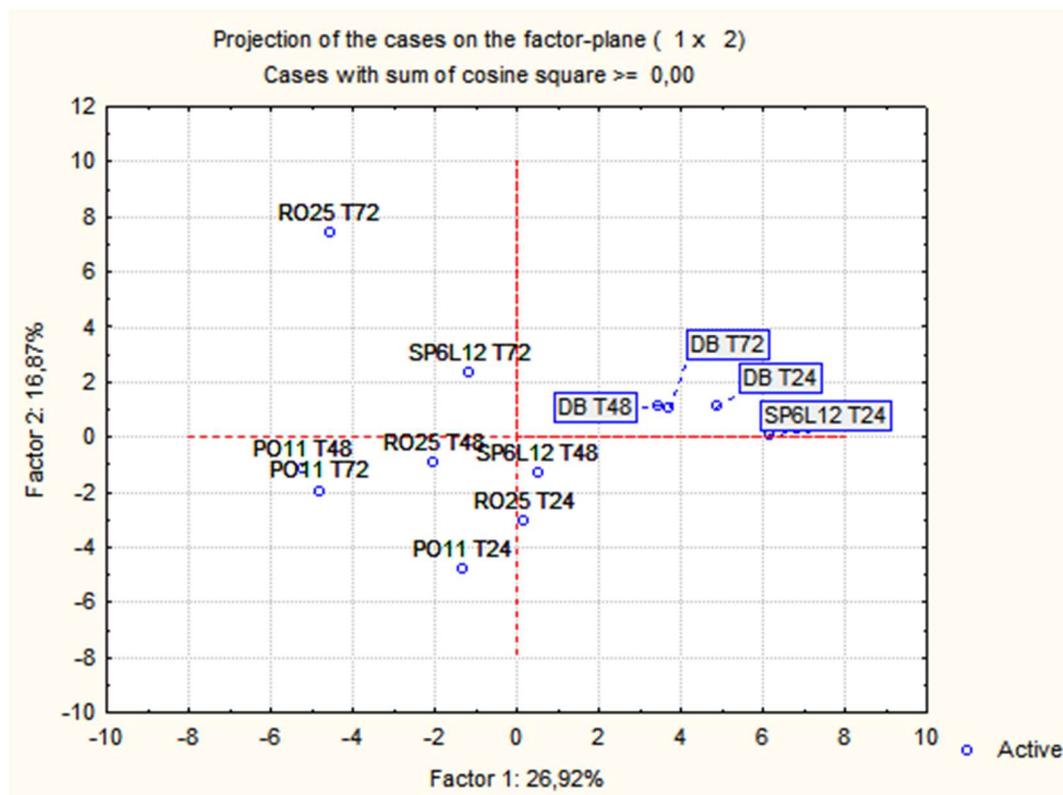


Fig. 6 Analisi del profilo in molecole volatili mediante PCA. Proiezione dei casi sul piano fattoriale (1_2)

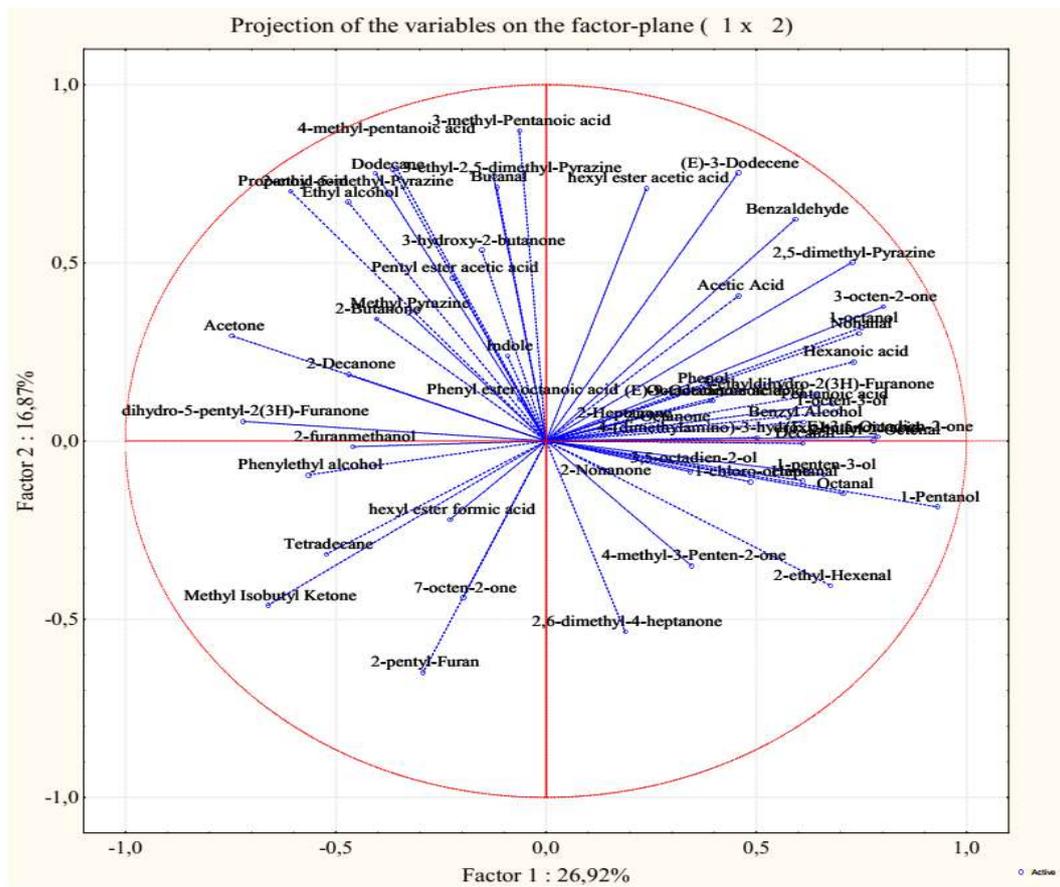


Fig. 7 Proiezione delle variabili sul piano fattoriale (1_2).

7. Conclusioni

Lo scopo della mia tesi di laurea era quello di valutare l'attitudine tecnologica di due ceppi di *Yarrowia lipolytica* (PO11 e RO25) e due di *Debaryomyces hansenii* (DB e SP6L12) a sviluppare in una matrice composta da farina di grillo e acqua. Inoltre, ne sono stati determinati gli effetti sulla composizione in acidi grassi e sulla produzione di molecole volatili nella matrice, al fine di selezionare i ceppi più promettenti per produrre un idrolizzato facilmente utilizzabile come successivo ingrediente per la preparazione di un prodotto innovativo.

L'attitudine dei ceppi a sviluppare nella matrice è risultata buona, dopo l'inoculo pari a 10^6 log ufc/ml tutti hanno mantenuto la vitalità fino a 72 ore all'inoculo. Il ceppo di *Y. lipolytica* P011 è quello che ha aumentato maggiormente il suo carico cellulare (circa 10^8 ufc/ml) mantenendolo fino alle 72 ore dall'inoculo. Questo è un risultato molto interessante data la matrice inusuale in cui sono stati posti.

Le determinazioni del pH eseguite sulla farina di grillo tal quale e sugli idrolizzati dopo 72 ore dall'inoculo mostrano differenze tra i ceppi. Infatti, gli idrolizzati ottenuti con *Y. lipolytica* RO25 e con il *D. hansenii* SP6L12 hanno un pH superiore probabilmente dovuto all'attività proteolitica dei ceppi, mentre quello ottenuto con *D. hansenii* DB ha un pH più acido, mentre il campione inoculato con *Y. lipolytica* PO11 presenta un pH simile a quello della matrice iniziale.

Il quantitativo di chitinizzato nei campioni risulta ridotto dopo 72 ore dall'inoculo con i ceppi rispetto alla farina tal quale. Gli idrolizzati ottenuti con i lieviti PO11, RO25 e DB mostrano una riduzione maggiore (quasi la metà rispetto al quantitativo di partenza) rispetto all'idrolizzato ottenuto con SP6L12. Il calo del chitinizzato è probabilmente dovuto al suo utilizzo da parte dei lieviti come fonte di carbonio per il loro sviluppo.

La farina di grillo e gli idrolizzati (dopo 24, 48 e 72 ore dall'inoculo) sono stati caratterizzati per quanto riguarda la loro composizione in acidi grassi liberi e neutri. Tramite l'analisi gas cromatografica sono stati riconosciuti 17 e 21 acidi grassi, rispettivamente liberi e neutri. Di grande importanza la presenza di acidi grassi essenziali omega 3 e 6, già presenti nella farina di grillo. I campioni inoculati con PO11, DB e SP6L12 mostrano un aumento della presenza di acidi grassi insaturi. Nello specifico, i campioni con ceppi di *D. hansenii* quadruplicano il quantitativo di insaturi

a 72 ore dall'inoculo. Anche i grassi saturi seguono un andamento crescente, ad eccezione del campione PO11 a 72 ore dall'inoculo e SP6L12 a 48 ore dall'inoculo dove il quantitativo di acidi grassi saturi è decisamente inferiore rispetto anche alla matrice di partenza. I campioni inoculati con RO25 mantengono dei quantitativi di insaturi e saturi simili a quelli della matrice di partenza.

In particolare, la PCA degli acidi grassi liberi si distinguono dagli altri i campioni inoculati con PO11 a 24 ore e RO25 a 24 e 72 ore dall'inoculo. Il primo è l'unico ad avere C20:0 mentre gli altri si distinguono per la presenza di acidi grassi quali C20:4n6 e C13:0 il primo e C18:2n6t, C18:1n9t e C12:0 il secondo. Invece, dall'analisi degli acidi grassi neutri si distinguono: i campioni SP6L12 e DB a 72 ore, caratterizzati entrambi da C18:1n9c e C18:1n9t e il primo anche da 9-metiltetradecanoato e i campioni inoculati con PO11, RO25 e DB a 48 ore per la presenza di C14:2n6c, C18:3n3, C15:1 e 1-iodio-dodecane.

Per quanto riguarda le molecole volatili, esse erano appartenenti a diverse classi di composti: acidi, idrocarburi, chetoni, aldeidi, alcoli, furanoni e altro. La farina di grillo ha dimostrato di possedere più molecole volatili rispetto agli idrolizzati. I composti volatili più rappresentativi nella matrice tal quale sono gli acidi seguiti da aldeidi ed alcoli. Importante notare la presenza di furanoni già nella farina di grillo, questa categoria di composti ha la capacità di inibire il *quorum sensing* dei batteri e la loro produzione di biofilm. Anche questi i risultati sono stati analizzati tramite PCA, la quale ha indicato la presenza di profili molto simili tra loro ad eccezione dei campioni inoculati con: *D. hansenii* DB a 24, 48 e 72 ore dall'inoculo che si differenziano per la presenza di acidi (acido acetico ed acido esanoico) e *Y. lipolytica* RO25 a 72 ore dall'inoculo si differenzia per la presenza di alcoli, soprattutto alcool etilico. Il campione inoculato con *D. hansenii* SP6L12 mostra una differenziazione nel tempo, infatti a 24 ore dall'inoculo è caratterizzato da un maggior contenuto di aldeidi (2-butil-2-octenale, eptanale, nonanale, benzaldeide), mentre a 48 e a 72 ore dall'inoculo i campioni si riavvicinano all'origine degli assi, mostrando un riavvicinamento del campione all'origine degli assi.

Le analisi svolte hanno mostrato come sia possibile ottenere modifiche rilevanti alla matrice farina di grillo tramite l'aggiunta di ceppi selezionati di lieviti non convenzionali

quali *Y. lipolytica* e *D. hansenii*. I campioni mostrano differenze a livello sia di composizione in acidi grassi (liberi e neutri) che, in alcuni casi, in molecole volatili. La liberazione di composti aromatici gradevoli, l'aumento degli acidi grassi insaturi e la riduzione del chitinizzato sono un ottimo punto di partenza per l'ottenimento di un ingrediente alimentare a base di farina di grillo da poter utilizzare nelle formulazioni alimentari al posto della farina tal quale. In questo senso la mia sperimentazione costituisce un primo tassello per la formulazione di un prodotto innovativo a base di farina di insetto.

8. Bibliografia

Adebowale, Y.A., Adeyemi, A., Oshodi, A.A. (2005). Variability in the physicochemical and antinutritional attributes of six mucuna species. *Food Chem.* 89: 37-48.

Ahearn DG, Meyers SP, Nichols RA. (1968). Extracellular proteinases of yeasts and yeast-like fungi. *Appl Microbiol* 16: 1370–1374.

Alba-Lois L, Segal C, Rodarte B, et al. (2004). NADP glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr Microbiol* 48: 68–72.

Arfi K, Spinnle HE, Tache R, Bonnarme P. (2002). Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 503–510.

Bankar, A.V., Kumar, A.R., Zinjarde, S.S. (2009). Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84 (5), pp. 847-865.

Barth, G. e Gaillardin, C. (1996) *Yarrowia lipolytica*. In K. Wolf (Ed.), *Nonconventional yeasts in biotechnology: A handbook*. Springer, Heidelberg, pp. 313–388.

Beopoulos A, Desfougeres T, Sabirova J, et al. (2010). The hydrocarbon-degrading oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Timmis KN (ed.). Springer-Verlag: Berlin.

Besancon X, Ratomahenina R, Galzy P. (1995). Isolation and partial characterization of an esterase (EC 3.1.1.1) from a *Debaryomyces hansenii* strain. *Neth Milk Dairy J* 49: 97–110.

Bolumar T, Sanz Y, Aristoy M-C, Toldra F. (2003)a. Purification and characterization of a prolyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. *Appl Environ Microbiol* 69: 227–232.

- Bolumar T, Sanz Y, Aristoy M-C, Toldra F. (2003)b. Purification and properties of an arginyl aminopeptidase from *Debaryomyces hansenii*. Int J Food Microbiol 86: 141–151.
- Breuer U., Harms H. (2006). *Debaryomyces hansenii* — an extremophilic yeast with biotechnological potential. Yeast; 23: 415–437
- Brooks, A.A. (2008). Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels African Journal of Biotechnology, 7 (20), pp. 3752-3755.
- Butinar L, Santos S, Spencer-Martins I, Oren A, GundeCimerman N. (2005). Yeast diversity in hypersaline habitats. FEMS Microbiol Lett 244: 229–234.
- Buzzini P, Martini A. (2001). Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. Med Mycol 39: 479–482.
- Cancino M., Bauchart P., Sandoval G. (2008). “A variant of *Yarrowia lipolytica* lipase with improved activity and enantioselectivity for resolution of 2-bromo-arylacetic acid esters,” Tetrahedron: Asymmetry, vol. 19, no. 13, pp. 1608– 1612.
- Cano-García Liliana, Rivera-Jiménez Silvia, Belloch Carmela, Flores Mónica (2014). Generation of aroma compounds in a fermented sausage meat model system by *Debaryomyces hansenii* strains Food Chemistry 151, 364–373
- Charoenchai C, Fleet GH, Henschke PA, Todd Ben. (1997). Screening of non-Saccharomyces wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes Austr J Grape Wine Res 3: 2–8.
- Choupina, Altino; Gonzalez, Francisco J.; Morín, M.; Burguillo, Francisco J.; Ferminan, E.; Dominguez, Ángel (1999). The lipase system of *Yarrowia lipolytica*. In XIX Internacional Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology. Rimini, Italy.
- Corral, S., Belloch, C., López-Díez, J.J., Flores, M. (2018). Lipolysis and aroma generation as mechanisms involved in masking boar taint in sodium reduced fermented sausages inoculated with *Debaryomyces hansenii* yeast Journal of the Science of Food and Agriculture, 98 (6), pp. 2121-2130.

- Corredor M, Davila A-M, Casaregola S, Gaillardin C. (2003). Chromosomal polymorphism in the yeast species *Debaryomyces hansenii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 215–222.
- Corzo G. e Revah S. (1999) “Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681,” *Bioresource Technology*, vol. 70, no. 2, pp. 173–180.
- Darvishi F, Fathi Z, Ariana M, Moradi H (2017) *Yarrowia lipolytica* as a workhorse for biofuel production. *Biochem Eng J* 127:87–96.
- Darvishi Harzevili F (2014) *Biotechnological applications of the yeast Yarrowia lipolytica*. Springer, Heidelberg.
- Dave D., Ghaly A.E. (2011). Meat Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: A Critical Review. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6.
- Davidow LS, O'Donnell MM, Kaczmarek FS, et al. (1987). Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 169: 4621–4629.
- Deak T, Beuchat LR. (1996). *Handbook of Food Spoilage*. CRC Press: New York.
- Defoirdt, T., Miyamoto, C. M., Wood, T. K., Meighen, E. A., Sorgeloos, P., Verstraete, W. and Bossier, P. (2007). The natural furanone (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone disrupts quorum sensing-regulated gene expression in *Vibrio harveyi* by decreasing the DNA-binding activity of the transcriptional regulator protein luxR *Environmental Microbiology* 9(10): 2486-2495.
- DeFoliart GR. (1992). Insects as human food: gene DeFoliart discusses some nutritional and economic aspects. *Crop Prot* 11(5):395–9.
- Do, T.T.L., Vu, N.T., Phan-Thi, H., Cao-Hoang, L., Ta, T.M.N., Waché, Y., Nguyen, T.H.T (2014). Traditional fermented sausage 'Nem chua' as a source of yeast biocatalysts efficient for the production of the aroma compound γ -decalactone. *International Journal of Food Science and Technology*, 49 (4), pp. 1099-1105.
- Dura MA, Flores M, Toldra F. (2004). Effects of curing agents and the stability of a glutaminase from *Debaryomyces* spp. *Food Chem* 86: 385–389.

Encyclopedia of Food Microbiology. Editor-in-Chief. Richard K. Robinson 1999. Amsterdam, Elsevier.

Farshad Darvishi, Mehdi Arian, Eko Roy Marella, Irina Borodina (2018). Advances in synthetic biology of oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* for producing non-native chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102:5925–5938.

Farshad Darvishi, Iraj Nahvi, Hamid Zarkesh-Esfahani, Fariborz Momenbeik (2009). Effect of Plant Oils upon Lipase and Citric Acid Production in *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Article ID 562943, 7 pages.

Fickers P, Benetti PH, Wache Y, et al. (2005a). Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. *FEMS Yeast Res* 5: 527–543.

Fickers P., Fudalej F., Le Dall M.T., Casaregola S., Gaillardin C., Thonart P., Nicaud J.M., (2005b). Identification and characterisation of LIP7 and LIP8 genes encoding two extracellular triacylglycerol lipases in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Fungal Genetics and Biology*, 42 (3) 264– 274.

Fickers P., J. M. Nicaud, C. Gaillardin, J. Destain, and P. Thonart (2004). “Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*,” *Journal of Applied Microbiology*, vol. 96, no. 4, pp. 742–749.

Finke, M. D. (2002). Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biology*, 21(3), 269e285.

Finsect Oy. Introduction video. Bonafide creatives. <http://www.finsect.fi/>

Fleet GH. (1992). Spoilage Yeasts. *Crit Rev Biotechnol* 12: 1–44.

Flores M, Dura MA, Marco A, Toldra F. (2004). Effect of *Debaryomyces* spp. on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci* 68: 439–446.

Forrest SI, Robinow CF, Lachance MA. (1987). Nuclear behaviour accompanying ascus formation in *Debaryomyces polymorphus*. *Can J Microbiol* 33: 967–970.

Garcia-Gonzalez A, Ochoa JL. (1999). Anti-Inflammatory activity of *Debaryomyces hansenii* Cu, Zn-SOD. *Arch Med Res* 30: 69–73.

Gardini F., Giovanna Suzzi; Angiolella Lombardi, Fernanda Galgano, Maria Antonietta Crudele, Christian Andrighetto, Maria Schirone, Rosanna Tofalo (2001). A survey of yeasts in traditional sausages of southern Italy FEMS Yeast Research 1, 161-167.

Gardini, F., Tofalo, R., Belletti, N., Iucci, L., Suzzi, G., Torriani, S., Guerzoni, M.E., Lanciotti, R. (2006). Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. Food Microbiology, 23 (7), pp. 641-648.

Garg, S.K., Lohani, Umesh, C. (2009). Food Spoilage and Control. Agropedia. Read 16.4.2017. <http://agropedia.iitk.ac.in/content/food-spoilage-and-control>.

Gatter, M., Ottlik, S., Kövesi, Z., Bauer, B., Matthäus, F., Barth, G. (2016) Three alcohol dehydrogenase genes and one acetyl-CoA synthetase gene are responsible for ethanol utilization in *Yarrowia lipolytica*. Fungal Genetics and Biology, 95, pp. 30-38.

Gírio, F.M., Amaro, C., Azinheira, H., Pelica, F., Amaral-Collaço, M.T (2000). Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. Bioresource Technology, 71 (3), pp. 245-251.

González Cristina M., Garzón Raquel, Rosell Cristina M. (2018). Insects as ingredients for bakery goods. A comparison study of *H. illucens*, *A. domestica* and *T. molitor* flours. Innovative Food Science and Emerging Technologies. In press.

Groenewald M, Boekhout T, Neuvéglise C, Gaillardin C, van Dijck PW, Wyss M (2014) *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Crit Rev Microbiol 40(3):187–206.

Gunge N, Fukuda K, Morikawa S, et al. (1993). Osmophilic linear plasmids from the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. Curr Genet 23: 443–449.

Haastrup, M.K., Johansen, P., Malskær, A.H., Castro-Mejía, J.L., Kot, W., Krych, L., Arneborg, N., Jespersen, L. (2018). Cheese brines from Danish dairies reveal a complex microbiota comprising several halotolerant bacteria and yeasts. International Journal of Food Microbiology, 285, pp. 173-187.

Haddad, I., Mozzon, M., Frega, N.G., (2012). Trends in fatty acids positional distribution in human colostrum, transitional, and mature milk. *Eur. Food Res. Technol.* 235, 325–332.

Hanboonsong Y, Jamjanya T, Durst PB. (2013). Six-legged livestock: edible insect farming, collection and marketing in Thailand. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Bangkok, Thailand.

Harvard Medical School. (2015). The truth about fats: the good, the bad, and the in-between. Harvard Health Publications. Read 17.4.2017. <http://www.health.harvard.edu/staying-healthy/the-truth-about-fats-bad-and-good>.

Hutchins, RF., Martin, MM. (1968). The lipids of the common house cricket, *Acheta domesticus* L.I. Lipid classes and fatty acid distribution.

Janssens, J. C., Steenackers, H., Robijns, S., Gellens, E., Levin, J., Zhao, H., Hermans, K., De Coster, D., Verhoeven, T. L., Marchal, K., Vanderleyden, J., De Vos, D. E. e De Keersmaecker, S. C. (2008). Brominated furanones inhibit biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl Environ Microbiol* 74(21): 6639- 48.

Jongema Y. (2016). List of edible insects of the world. Available from: <http://www.wageningenur.nl/en/Expertise-Services/Chair-groups/Plant-Sciences/Laboratory-ofEntomology/Edible-insects/Worldwide-species-list.htm>.

Kamau E., C. Mutungi, J. Kinyuru, S. Imathiu, C. Tanga, H. Affognon, S. Ekesi, D. Nakimbugwe, K.K.M. (2018). Fiaboe Moisture adsorption properties and shelf-life estimation of dried and pulverised edible house cricket *Acheta domesticus* (L.) and black soldier fly larvae *Hermetia illucens* (L.). *Food Research International* 106, 420-427.

Kamzolova S.V, I. G. Morgunov, A. Aurich, et al., (2005). “Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat,” *Food Technology and Biotechnology*, vol. 43, pp. 113–122.

Kang KH, Kaminogawa S, et al. (1975). Effects of yeasts isolated from cheese on the growth of lactic acid bacteria in skim milk. *Jap J Zootech Sci* 46: 73–80.

Kim HW, Setyabrata D, Lee YJ, Jones OG, Kim YHB. (2016). Pre-treated mealworm larvae and silkworm pupae as a novel protein ingredient in emulsion sausages. *Innov Food Sci Emerg* 38(Part A):116–23.

Klein N, Zourari A, Lortal S. (2002). Peptidase activity of four yeast species frequently encountered in dairy products — comparison with several dairy bacteria. *Int Dairy J* 12: 853–861.

Krzysztof, C., Ludwika, T.-H., Magdalena, R., Wojciech, Ł., Waldemar, R., Anita, R. (2018). The bioconversion of waste products from rapeseed processing into keto acids by *Yarrowia lipolytica*. *Industrial Crops and Products*, 119, pp. 102-110.

Kumura H, Takagaki K, Sone T, et al. (2002). Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1370–1373.

Kurtzman CP, Robnett CJ. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *J Clin Microbiol* 35: 1216–1223.

La Riviere JW. (1969). Ecology of yeasts in the kefir grain. *Antonie van Leeuwenhoek* 35(suppl): D15–D16.

Lagace LS, Bisson LF. (1990). Survey of yeast acid proteases for effectiveness of wine haze reduction. *Am J Enol Viticult* 41: 147–155.

Lanciotti R., Gianotti A., Baldi D., Angrisani R., Suzzi G., Mastrocola D., Guerzoni M.E. (2005a). Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, vol 96, pp. 317-322.

Lanciotti R., Vannini L., Lopez C. C., Gobbetti M., Guerzoni M. E. (2005b). Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *International Journal of Dairy Technology*, vol 58, pp. 89-99.

Laubscher PJ, Viljoen BC. (1999). In *The Occurrence, Growth and Survival of Yeasts in Matured Cheddar*, Laubscher PJ, Viljoen BC (eds). University of the Free State: Bloemfontein, South Africa; 77–95

Leclercq-Perlat M-N, Corrieu G, Spinnler H-E. (2004). Comparison of volatile compounds produced in model cheese medium deacidified by *Debaryomyces hansenii* or *Kluyveromyces marxianus*. J Dairy Sci 87: 1545–1550.

Leclercq-Perlat M-N, Oumer A, Buono F, et al. (2000). Behavior of *Brevibacterium linens* and *Debaryomyces hansenii* as ripening flora in controlled production of smear soft cheese from reconstituted milk: protein degradation. J Dairy Sci 83: 1674–1683.

Lenoir J. (1984). The surface flora and its role in the ripening of cheese. Int Dairy Fed Bull 171: 3–20

Liu HH., Ji XJ, Huang H., (2015) Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present.

Llorente P, Marquina D, Santos A, Peinado JM, SpencerMartins I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. Appl Environ Microbiol 63: 1165–1167.

Lodder J. e Kreger-Van Rij N. J. W., (1952). The Yeasts : A Taxonomic Study, 1st ed., North- Holland Publ. Co., Amsterdam, p. 277.

Loman, A.A., Islam, S.M.M., Ju, L.-K. (2018). Production of arabitol from enzymatic hydrolysate of soybean flour by *Debaryomyces hansenii* fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 102 (2), pp. 641-653.

Lopes, M., Gomes, A.S., Silva, C.M., Belo, I. (2018). Microbial lipids and added value metabolites production by *Yarrowia lipolytica* from pork lard. Journal of Biotechnology, 265, pp. 76-85.

Madzak C (2015) *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. Appl Microbiol Biotechnol 99(11):4559–4577.

Madzak Catherine (2018). Engineering *Yarrowia lipolytica* for Use in Biotechnological Applications: A Review of Major Achievements and Recent Innovations. Molecular Biotechnology 60:621–635.

- Mafakher L, Mirbagheri M, Darvishi F, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Emtiazi G (2010). Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater. *New Biotechnol* 27(4):337–340.
- Manefield M, Rasmussen TB, Henzter M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M. (2002). Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology*. Apr;148(Pt 4):1119-27.
- Marquina D, Barroso J, Santos A, Peinado JM. (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiol Res* 156: 387–391.
- Matoba S, Fukayama J, Wing RA, Ogrydziak DM. (1988). Intracellular precursors and secretion of alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *Mol Cell Biol* 8: 4904-4916.
- Mattila, P., Piironen, V., Ollilainen, V. (2001). *Elintarvikekemian- ja analytiikka*. Helsinki: Yliopistopaino.
- Megido RC, Gierts C, Blecker C, Brostaux Y, Haubruge E, Alabi T, Francis F. (2016). Consumer acceptance of insect-based alternative meat products in Western countries. *Food Qual Prefer* 52:237–43.
- Mirbagheri M, Nahvi I, Emtiazi G, Mafakher L, Darvishi F (2012). Taxonomic characterization and potential biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica* isolated from meat and meat products. *Jundishapur J Microbiol* 5(1):346–351.
- Mozzon, M., Frega, N.G., Fronte, B., Tocchini, M., (2002). Effect of dietary fish oil supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, trans acids and conjugated linoleic acid in ewe milk. *Food Technol. Biotechnol.* c40, 213–219.
- Nagy, E.Sz. (2014). Isolation and diversity of food spoilage *Yarrowia* yeast strains from meat. *Acta Alimentaria*, 43, pp. 101-106.
- Nakase T, Suzuki M, Phaff HJ, Kurtzman CP. (1998). *Debaryomyces* Lodder & Kreger-van Rij Nom. Cons. In: Kurtzman CP, Fell JW (eds). *The Yeasts — A Taxonomic Study*. Elsevier: Amsterdam; 157–173.

Nicaud Jean-Marc (2012). *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*; 29: 409–418. Published online 5 October 2012 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Nicaud JM, Fabre E, Beckerich JM, et al. (1989). Cloning, sequencing and amplification of the alkaline protease (XPR2) gene of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Biotechnol* 12: 285–298.

Nout M Jr, Platis CE, Wicklow DT. (1996). Biodiversity of yeasts from Illinois maize. *Can J Microbiol* 43: 362–367.

Olaofe O, Arogundade LA, Adeyeye EI, Falusi OM. (1998). Composition and food properties of the variegated grasshopper, *Zonocerus variegatus*. *Trop Sci* 38:233–7.

Omotoso OT. (2006). Nutritional quality, functional properties and anti-nutrient compositions of the larva of *Cirina forda* (Westwood) (Lepidoptera: Saturniidae). *J Zhejiang Univ Sci B* 7:51–5.

Orozco MR, Hernandez-Saavedra NY, Valle FA, Gonzalez BA, Ochoa JL. (1998). Cell yield and superoxide dismutase activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* under different culture conditions. *J Mar Biotechnol* 6: 255–259.

Osasona AI, Olaofe O. (2010). Nutritional and functional properties of *Cirina forda* larva from Ado-Ekiti, Nigeria. *African J Food Sci* 4:775–7.

Osimani, A., Garofalo, C., Milanović, V. et al. (2017). *Eur Food Res Technol* 243: 1157.

Ota M. (1924). "Über vier neue pathogene Hefearten von der Gattung *Debaryomyces* (Kl"ocker). *Dermatol Wochenschr* 78: 284–289, 312–316.

Pacetti, D., Mozzon, M., Lucci, P., Frega, N.G., (2013). Bioactive fish fatty acids: health effects and their use as functional food ingredients. *Curr. Nutr. Food Sci.* 9, 283–297.

Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I., (2002). *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J Appl Microbiol*, vol 92 pp. 737-744.

Patrignani F., Iucci L., Vallicelli M., Guerzoni M. E., Gardini F., Lanciotti R., (2007). Role of surface-inoculated *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* strains in

dried fermented sausage manufacture. Part 1: Evaluation of their effects on microbial evolution, lipolytic and proteolytic patterns. *Meat Science*, vol 75, pp. 676-686.

Patrignani F., Vannini L., Gardini F., Guerzoni M.E., Lanciotti R., (2011). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* strains in pork fat. *Meat Sci.* Vol 88, pp. 689-693.

Payne C L R, Scarborough P, Rayner M, Nonaka K (2016). Are edible insects more or less 'healthy' than commonly consumed meats? A comparison using two nutrient profiling models developed to combat over- and undernutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 70, 285-291 (2016).

Pereira-Meirelles F. V., Rocha-Leão M. H. M. e Sant'Anna Jr. G. L. (2000). "Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells," *Biotechnology Letters*, vol. 22, no. 1, pp. 71–75.

Petersen KM, Westall S, Jespersen L. (2002). Microbial succession of *Debaryomyces hansenii* strains during the production of Danish surfaced-ripened cheeses. *J Dairy Sci* 85: 478–486.

Pignede G, Wang H, Fudalej F, et al. (2000). Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J Bacteriol* 182: 2802–2810.

Poma Giulia, Cuykx Matthias, Amato Elvio, Calaprice Chiara, Focant Jean Francois, Covaci Adrian. (2017). Evaluation of hazardous chemicals in edible insects and insect-based food intended for human consumption. *Food and chemical toxicology*. Volume 100: 70-79.

Price C. W., Fuson G. B., Phaff H. J., (1978). *Microbiol. Rev.*, 42, 161

Ramirez-Orozco M, Hernandez-Saavedra NY, Ochoa J-L. (2001). *Debaryomyces hansenii* growth in nonsterile seawater ClO₂-peptone-containing medium. *Can J Microbiol* 47: 676–679.

Ramos J., Yessica Melero, Laura Ramos-Moreno, Carmen Michán e Lourdes Cabezas (2017). *Debaryomyces hansenii* Strains from Valle De Los Pedroches Iberian Dry Meat Products: Isolation, Identification, Characterization, and Selection for Starter Cultures *J. Microbiol. Biotechnol.* 27(9), 1576–1585.

Rankine BC. (1964). Hydrogen sulphide production by yeast. *J Sci Food Agric* 15: 872–877.

Ren, D., Sims, J. J. and Wood, T. K. (2001). Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ Microbiol* 3(11): 731-6.

Roostita R, Fleet GH. (1996). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *IntJ Food Microbiol* 31: 205–219.

Saha BC, Bothast RJ. (1996). Glucose tolerant and thermophilic β -glucosidases from yeasts. *Biotechnol Lett* 18: 155–158.

Santos A, Marquina D, Barroso J, Peinado JM. (2002). (1–6)- β -D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Lett Appl Microbiol* 34: 95–99.

Santos Nelson N., Regina C. Santos-Mendonc, Yolanda Sanz, Tomas Bolumar, M.-Concepcion Aristoy, Fidel Toldra (2001) Hydrolysis of pork muscle sarcoplasmic proteins by *Debaryomyces hansenii*. *International Journal of Food Microbiology* 68, 199–206.

Schlegel HG. (1993). In *General Microbiology*, Zaborosch C, Kogut M (eds). Cambridge University Press: Cambridge; 300–308.

Schouteten J, De Steur H, De Pelsmaecker S, Lagast S, Juvinal JG, De Bourdeaudhuij I, Verbeke W, Gellynck X. (2016). Emotional and sensory profiling of insect-, plant- and meat-based burgers under blind, expected and informed conditions. *Food Qual Prefer* 52:27–31.

Seiler H. (1991). Some additional physiological characteristics for the identification of food-borne yeasts. *Neth Milk Dairy J* 45: 253–258.

Sibirny A, Madzak C, Fickers P (2014) Genetic engineering of nonconventional yeasts for the production of valuable compounds.

Solunetti. (2016a). Asyyliglyserolit. Read 15.4.2017.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/asyyliglyserolit/2/>

Solunetti. (2016b). Glykogeeni. Read 15.4.2017.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/glykogeeni/2/>

Song H.T, Jiang Z. B., e Ma L. X. (2006). “Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS2.1216.” *Protein Expression and Purification*, vol.47, no.2, pp.393–397.

Sorensen Birgitte Bjorn (1997). Lipolysis of pork fat meat starter culture *Debaryomyces hansenii* at various environmental conditions. *International journal of food microbiology* 34, 187-193.

Stoops J., Vandeweyer D, Crauwels ., S., Verreth, C., Boeckx H., Van Der Borght M., Claes J., Lievens B., Van Campenhout L. (2017). Minced meat-like products from mealworm larvae (*Tenebrio molitor* and *Alphitobius diaperinus*): microbial dynamics during production and storage. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. Volume 41, Pages 1-9.

Thevenieau F, Gaillardin C, Nicaud J-M. (2009). Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, Satyanarayana T, Kunze G (eds). Springer: Netherlands; 589–613.

Van den Tempel T, Jacobsen M. (2000). The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int Dairy J* 10: 263–270.

Van der Walt JP, Von Arx JA. (1980). The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* 46: 517–521.

Van Huis A, Van Itterbeeck J, Klunder H, Mertens E, Halloran A, Muir G, Vantomme P. (2013). *Edible insects – future prospects for food and feed security*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Van Uden N, Fell JW. (1968). Marine yeasts. *Adv Microbiol Sea* 1: 167–201.

Viljoen BC, Greyling T. (1995). Yeasts associated with Cheddar and Gouda making. *Int J Food Microbiol* 28: 79–88.

Vong Weng Chan, Au Yamg Kai Ling Corrine, Liu Shao-Quan. (2016). Okara (soybean residue) biotransformation by yeast *Yarrowia lipolytica*. International Journal of Food Microbiology, Volume 235, pages 1-9.

Walia K., Kapoor A., Farber J.M. (2018). Qualitative risk assessment of cricket powder to be used to treat undernutrition in infants and children in Cambodia. Elsevier Food control. Volume 92:169-182.

Welthagen JJ, Viljoen BC. (1998). Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. Int J Food Microbiol 41: 185–194.

Wong B, Kiehn TE, Edwards F, et al. (1982). Bone infection caused by *Debaryomyces hansenii* in a normal host: a case report. J Clin Microbiol 16: 545–548.

World Food Logistics Organization. (2008). WFLO Commodity Storage Manual: Rancidity and Antioxidants.

Yamauchi, K., Kang, K.H., Kaminogawa, S. (1976). Proteolysis by *Debaryomyces hansenii* and Lactic Starters in Skimmilk Culture, Nihon Chikusan Gakkaiho, Volume 47, Issue 1, Pages 12-17.

Yanai T, Sato M. 1999. Isolation and properties of β glucosidase produced by *Debaryomyces hansenii* and its application in winemaking. Am J Enol Viticult 50: 231–235.

Yarrow D. (1972). Four new combinations in yeasts. Antonie Van Leeuwenhoek 38: 357–360.

Yi L, Lakemond CMM, Sagis LMC, Eisner-Schadler V, Huis A, Boekel MAJS. (2013). Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. Food Chem 141(4):3341-8.

Yu M., Qin S., and Tan T., (2007) Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*, Process Biochemistry, vol. 42, no. 3, pp. 384–391.

Zopf W. (1889). Oxalsäuregärung (an Stelle von Alkoholgärung) bei einem typischen (endosporen) Saccharomyceten (*S. hansenii* n. spec.). Ber Dtsch Bot Ges 7: 94–97.