

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

Caratterizzazione del microbiota della Colomba durante le fasi del
processo produttivo

Relazione finale in

Biologia Dei Microrganismi

(Biologia Dei Microrganismi ed Ispezione Degli Alimenti c.i.)

Relatore

Prof. Fausto Gardini

Presentata da

Simone Chiozzi

Correlatore

Dott.ssa Chiara Montanari

Dott.ssa Giulia Tabanelli

Sessione II

Anno Accademico 2014-2015

INDICE

Capitolo 1. Introduzione

1.1	Gli impasti acidi	1
1.2	Caratteristiche degli impasti acidi	3
1.3	Microflora degli impasti acidi	7
1.3.1	Batteri lattici	7
1.3.2	Lieviti	9
1.4	Interazioni tra lieviti e batteri lattici	11
1.4.1	Metabolismo dei carboidrati	12
1.4.2	Metabolismo delle fonti azotate	14
1.5	Componenti volatili negli impasti acidi	16
1.6	Fattori che influenzano lo sviluppo degli impasti acidi	20
1.7	Utilizzo della madre nei prodotti da forno	21

Capitolo 2. Obbiettivi **27**

Capitolo 3. Materiali e Metodi **29**

3.1	Produzione della Colomba	29
3.2	Analisi Microbiologiche	29
3.3	Determinazione del pH	30
3.4	Determinazione dell'attività dell'acqua (A_w)	31
3.5	Analisi Acidi Organici	31
3.6	Analisi GC-MS-SPME	31
3.7	Identificazione dei microrganismi isolati	32

Capitolo 4. Risultati **37**

4.1	Analisi del pH e A_w e conteggio della popolazione microbica	39
4.2	Concentrazione degli acidi organici	41

4.3	Profilo aromatico	42
4.4	Biotipi di LAB e lieviti	46
Capitolo 5. Conclusioni		49
Bibliografia		51

CAPITOLO 1: INTRODUZIONE

1.1 Gli impasti acidi

Gli impasti acidi (conosciuti anche con il nome di madri acide) sono una miscela di acqua e farina che viene fermentata a opera di un complesso microbiota il quale include batteri lattici (LAB), che producono acido lattico e acetico, e lieviti, che producono etanolo e CO₂ (Chavan & Chavan, 2011; Gobetti, 1998; Hansen, 2011). A seconda della tecnologia applicata, possono essere considerati tre tipi di impasti acidi, come riportato da Böcher et al. (1995):

- Impasti acidi di tipo I: sono generalmente impasti stabili la cui attività si basa su una popolazione mista di batteri lattici (principalmente rappresentati da LAB omofermentanti obbligati come, ad esempio, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus pontis*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum* e *Lactobacillus fructivorans*) e lieviti (*Candida milleri*, *Candida holmii*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces exiguus*) i quali sono mantenuti metabolicamente attivi grazie ai rinfreschi giornalieri. In un protocollo tradizionale a 3 stadi, sono effettuati tre rinfreschi al giorno in combinazione con i valori di DY (dough yield, ossia resa dell'impasto), tempo e temperatura in modo da mantenere un corretto equilibrio nel rapporto LAB e lieviti. Alla fine dell'ultimo stadio di fermentazione, l'impasto acido è utilizzato come coltura starter naturale contenente molti ceppi microbici (Hammes, 1991).
- Impasti acidi di tipo II: sono generalmente impasti liquidi caratterizzati dalla presenza di lactobacilli pH-resistenti quali, ad esempio, *Lactobacillus panis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus jhonsonii*, *L. sanfranciscensis* e *L. pontis* (Böcher et al., 1995; Wiese et al., 1996). Tali impasti sono ottenuti da un unico step di fermentazione di 15-20 ore in bioreattori a temperatura controllata superiore ai 30°C, dopo il quale vengono stoccati per più giorni a temperature più basse (Deckock & Cappelle, 2005). Quando necessario, una porzione di un impasto già maturo può essere aggiunto ad un impasto per acidificarlo e

arricchirlo con gli aromi ed i sapori caratteristici di un prodotto da forno lievitato. La lievitazione dell'impasto, per essere cotto, richiede l'aggiunta del lievito commerciale poiché il lungo tempo di fermentazione, l'alto DY, e le temperature inibiscono la crescita di lieviti spontanei. L'impasto acido di tipo II rappresenta, inoltre, la base per l'impasto acido di tipo III (*Deckock & Cappelle, 2005*).

- Impasti acido di tipo III: quest'ultimi sono preparazioni essiccate derivanti da impasti acidi liquidi e, grazie ai protocolli applicati durante la loro formazione (spray drying o drum drying), sono dominati da LAB resistenti all'essiccamento come, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum* e *L. brevis* (*Deckoc & Cappelle, 2005; Böcher et al., 1995*). L'impasto acido di tipo III è essenzialmente usato a livelli industriali come agente aromatizzante e le sue caratteristiche e le sue attività aromatiche sono determinate da differenti rapporti tempo/temperatura applicati durante l'essiccamento, oltre che a Reazioni di Maillard e caramellizzazioni che avvengono durante il processo. Come per l'impasto acido di tipo II, anche questo tipo di impasto richiede l'aggiunta del lievito commerciale (*S. cerevisiae*) come agente lievitante (*Corsetti & Settani, 2007*).

Accanto a questo tipo di preparazione se ne sono sviluppati altri tra cui ricordiamo il metodo con biga e il metodo poolish. Il metodo con biga prevede la preparazione di un impasto di acqua, farina e lievito di birra che viene lasciato fermentare per 14/36 ore e successivamente incorporato nell'impasto finale in misura del 40-80% sul peso della farina. Il metodo poolish prevede sempre la preparazione di un impasto con gli stessi ingredienti della biga ma con un rapporto acqua/farina di 1 : 1 per cui si ha una rapida moltiplicazione del lievito incorporato; la sua percentuale nell'impasto finale (20% circa) risulta molto diminuita rispetto al metodo con biga.

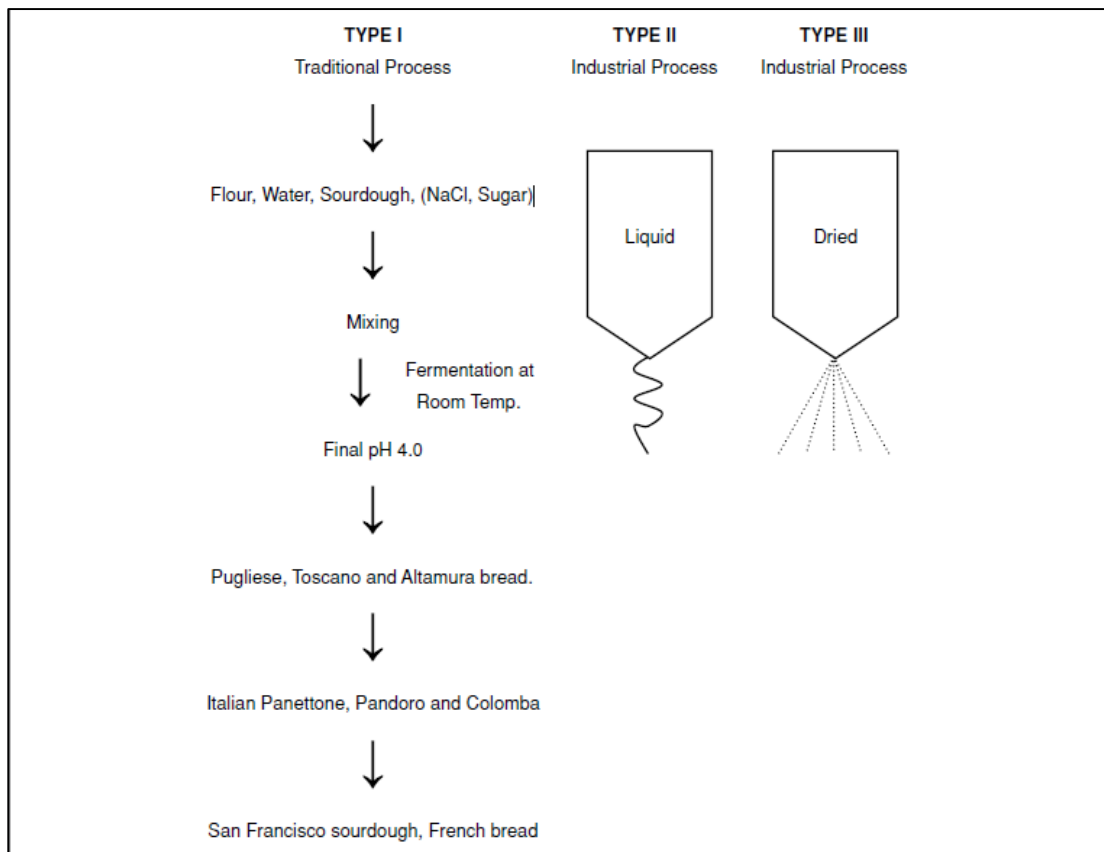


Figura 1. Schema del processo di produzione dei differenti tipi di impasti acidi.

1.2 Caratteristiche degli impasti acidi

Gli impasti acidi possono essere caratterizzati da parametri chimici quali pH, contenuto totale di acidi titolabili, contenuto in acido lattico e acetico, e parametri microbiologici quali il numero e le specie di batteri lattici e lieviti. I valori di pH possono differire in maniera minima a differenza, invece, dei valori degli acidi titolabili che sono dipendenti dalle temperature di fermentazione, il contenuto in acqua e il grado di estrazione della farina. Il contenuto in acido lattico e acetico negli impasti acidi svolge un ruolo importante nello sviluppo del gusto e del sapore dei prodotti alimentari ottenuti mediante l'impiego di madri acide (*Hansen & Hansen, 1996*).

L'impasto acido è utilizzato nella produzione di prodotti da forno quali pane, focacce, prodotti da ricorrenza, ecc... poiché il suo impiego è in grado di influire positivamente su alcune caratteristiche del prodotto stesso. In particolare, un prodotto ottenuto con impasto acido presenta alcune peculiarità:

- prolungata shelf-life: i prodotti sono caratterizzati da una minore velocità di retrogradazione dell'amilopectina, modificazione che sta alla base del fenomeno del rafferimento. Questo sembra dovuto all'idrolisi acida dell'amido: infatti i pani con acidità più elevata raffermano più lentamente.
- profilo aromatico complesso: il maggiore tempo di fermentazione determina una prolungata azione degli enzimi proteolitici che agiscono sulle proteine del glutine producendo composti a basso peso molecolare tra cui peptidi ed aminoacidi, che sono importanti precursori di aroma. Infatti, alcuni di questi aminoacidi (tra cui lisina, prolina e valina), durante la fase di cottura, reagiscono con gli zuccheri (reazione di Maillard) formando composti che danno il caratteristico odore al prodotto cotto. A questi composti vanno aggiunti l'acido lattico, acido acetico e altri prodotti della fermentazione lattica quali esteri (ad es. etilacetato), alcoli, aldeidi e chetoni (ad es. diacetile, acetoino).
- alveolatura più fine ed uniforme: la riduzione del pH determina un aumento di idratazione delle proteine della farina, favorisce un'alveolatura uniforme e aumenta la resistenza all'estensione della maglia glutinica;
- modificazione delle componenti della farina (per esempio, rigonfiamento di amido e pentosani);
- prevenzione dallo sviluppo di *Bacillus subtilis*: l'acidificazione, ed in particolare l'accumulo di acido acetico, previene un'alterazione batterica che affligge soprattutto i prodotti nord-europei: il filante (in inglese "rope"). Questo difetto causa odori sgradevoli (odore di frutta marcescente), macchie di colore giallo marrone che compaiono sulla superficie esterna del prodotto e modificazioni della consistenza del prodotto stesso, poiché in corrispondenza di queste macchie la mollica diventa molle

ed appiccicosa. Gli agenti di questo difetto appartengono al genere *Bacillus* e fra essi quello più diffuso è sicuramente *Bacillus subtilis*.

- miglioramento del valore nutritivo del prodotto finito. La degradazione dei fitati, che nella farina formano dei complessi insolubili con i minerali rendendoli di conseguenza inutilizzabili per la nutrizione umana, determina una maggiore biodisponibilità di tali minerali. Le fitasi endogene della farina sono infatti attive a valori di pH pari o inferiori a 5,0-5,5.
- effetto ritardante sullo sviluppo delle muffe: diversi composti a basso peso molecolare e ad attività antimicrobica sono stati isolati dai LAB, come per esempio acidi organici, diacetile, etanolo, acidi grassi a corta e media catena, composti fenolici e fungicidi (*Dal Bello et al., 2007*). *Ryan et al. (2011)* hanno analizzato l'attività antifungina di un ceppo di *Lactobacillus amylovorus*, identificando alcune molecole come responsabili principali di questa caratteristica (figura 2).

L'impasto acido ottenuto con la fermentazione ad opera di *L. amylovorus* ha permesso di aumentare la shelf-life del pane ottenuto in maniera considerevole. Inoltre è interessante notare come la sinergia tra matrice, ceppi fermentanti (lieviti e LAB) ed ingredienti possa essere responsabile dell'eventuale produzione delle molecole d'interesse. Infatti, in uno studio condotto da *Vernocchi et al. (2008)*, a seguito dell'azione combinata tra impasto acido (o produzione di mezzi condizionati nei quali è avvenuto lo sviluppo di lieviti-lattici), saccarosio in concentrazioni da stress osmotico e amido, si è verificata la sovrapproduzione di molecole antimicrobiche quali lattoni, acido acetico, acido decanoico e acido 3-metilbutanoico.

Tra gli acidi organici, quelli acetico e propionico, prodotti dai LAB etero fermentanti, sono più efficaci dell'acido lattico (*Schuner & Magnusson, 2005*). L'acido esanoico prodotto da *L. sanfranciscensis* CB1, assieme ad una miscela di acidi tra cui acetico,

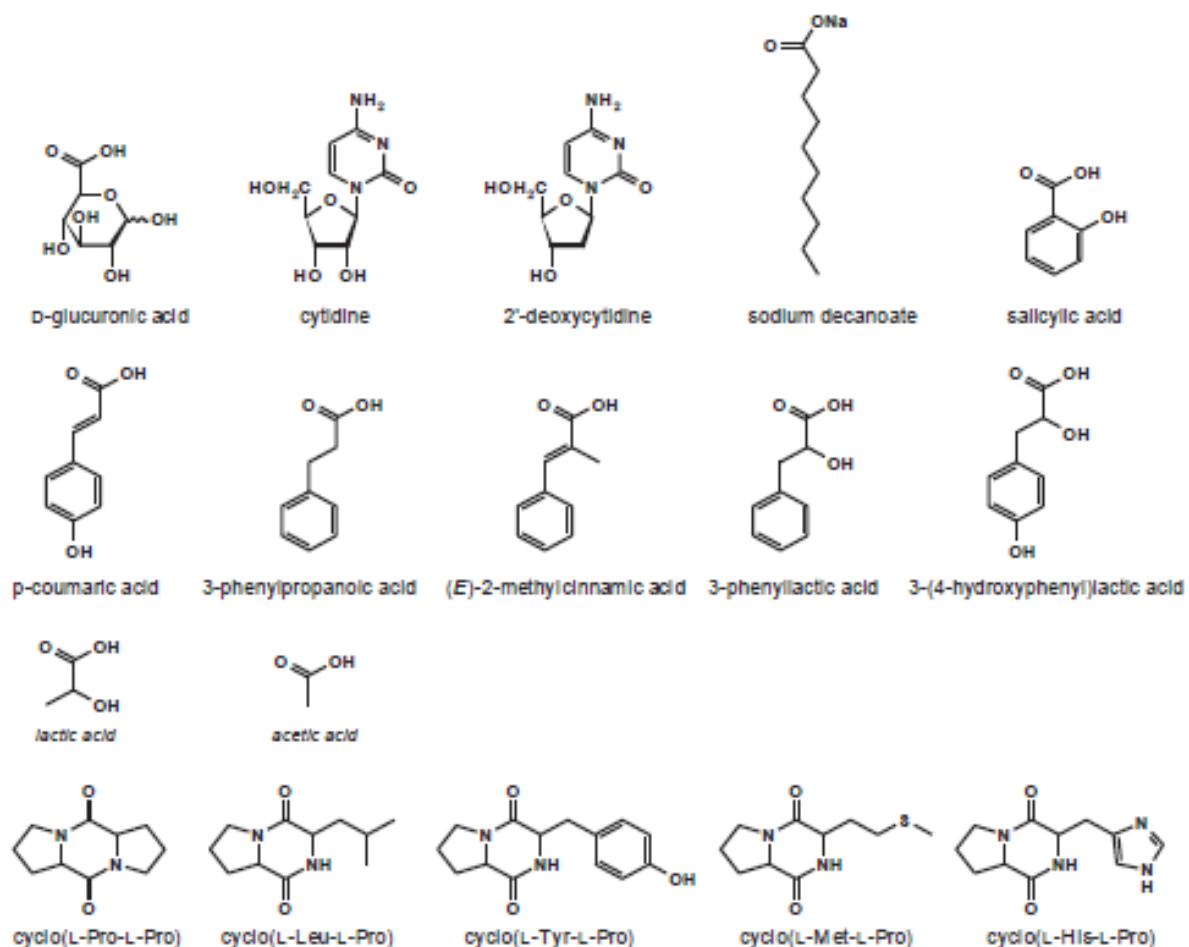


Figura 2. Composti antifungini isolati da surnatanti di *L. amylovorus* DSM 19280 coltivato in brodo MRS5 (Ryan et al., 2011).

formico, propionico, butirrico e pentanoico, gioca un ruolo chiave nell'inibizione di muffe quali *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Monilia* (Corsetti et al., 1996).

Inoltre, *L. plantarum* ha dimostrato un'ampia attività antimicrobica e antifungina soprattutto per la produzione di 4-idrossifenillattato e acido fenillattato (Dal Bello et al., 2007; Lavermicocca et al., 2000; Ryan et al., 2009).

Un effetto sinergico è stato riscontrato negli impasti acidi fermentati con ceppi antifungini di *L. plantarum* in combinazione con calcio propionato per la produzione di pane bianco (Ryan et al., 2008). Nelle madri acide, *L. reuteri* ha dimostrato di produrre in concentrazioni attive reuterina, un antibiotico a basso peso molecolare attivo verso LAB Gram positivi, lieviti e muffe (Ganzle, 2004).

	<i>L. plantarum</i> FST 1.7	<i>L. sanfranciscensis</i>
Bacteria		
<i>Bacillus subtilis</i> FST 2.2	++	+
<i>Citrobacter freundii</i> FST 2.7	++++	+++
<i>Enterococcus faecalis</i> FST 2.8	+	+
<i>Escherichia coli</i> FST 2.3	+++	+++
<i>Listeria innocua</i> FST 2.5	++++	++++
<i>Micrococcus luteus</i> FST 2.10	++++	+++
<i>Proteus vulgaris</i> FST 2.12	+++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> FST 2.4	+++	++
<i>S. aureus</i> TMW 2.127	++++	+++
Moulds		
<i>Aspergillus niger</i> FST 4.21	++	-
<i>Fusarium graminearum</i> FST 4.0122	++	-
<i>F. graminearum</i> TMW 4.0208	+++	+
<i>F. culmorum</i> TMW 4.0754	+++	-
<i>Fusarium oxysporum</i> FST 4.03	++	-
<i>Penicillium roqueforti</i> TMW 4.1599	-	-

Figura 3. Inibizioni in vitro di *L. plantarum* e *L. sanfranciscensis* nei confronti di batteri e muffe.

1.3 Microflora degli impasti acidi

La microflora degli impasti acidi include batteri lattici e lieviti, i quali trovano le condizioni ottimali (temperatura, Aw, pH) per crescere e fermentare l'impasto. I LAB sono principalmente responsabili dell'acidificazione degli impasti, mentre i lieviti sono importanti per la produzione di componenti aromatiche e per il bilanciamento del sapore del prodotto finale in combinazione con gli acidi. La concentrazione dei LAB nelle madri è di circa 10^8 - 10^9 ufc/gr mentre i lieviti sono generalmente di 10^6 - 10^7 ufc/gr (Spicher & Stephan, 1999). Il rapporto tra LAB e lieviti negli impasti acidi è indicativamente 100:1.

1.3.1 Batteri Lattici

I batteri lattici (LAB) sono un gruppo di batteri Gram positivi, catalasi negativi, non mobili e non sporigeni che producono acido lattico come maggiore metabolita durante la fermentazione dei carboidrati. Hanno un metabolismo fermentativo, sono

aerotolleranti o microaerofili, acidofili, alotolleranti e hanno esigenze nutrizionali complesse per ciò che riguarda carboidrati, amminoacidi, peptidi, acidi grassi, vitamine e acidi nucleici (*Hammes & Vogel, 1995*). I LAB sono stati classificati secondo specie, aspetto delle colonie e morfologia cellulare, fermentazione degli zuccheri, configurazione del lattato prodotto e in base alle concentrazioni di NaCl e acidi a cui possono crescere. Generalmente i LAB isolati dagli impasti acidi sono specie appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus*, anche se il genere *Lactobacillus* è solitamente prevalente.

In relazione al tipo di fermentazione dei carboidrati (*Kandler & Weiss, 1986*), i LAB vengono suddivisi in 3 gruppi:

- LAB strettamente omofermentanti: gli esosi sono completamente fermentanti in acido lattico secondo la via di Embden-Meyerhof (EMP);
- LAB etero fermentanti facoltativi: gli esosi sono quasi completamente convertiti in acido lattico dalla via di EMP mentre i pentosi sono fermentati in acido lattico e acido acetico;
- LAB etero fermentanti obbligati: gli esosi sono fermentati in acido lattico, acido acetico e CO₂ mentre i pentosi sono fermentati in acido acetico e lattico.

Obligately Homofermentative	Facultatively Heterofermentative	Obligately Heterofermentative
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. alimentarius</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. amylovorus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. buchneri</i>
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. fermentum</i>
<i>L. delbrueckii</i> spp. <i>delbrueckii</i>	<i>L. paralimentarius</i>	<i>L. fructivorans</i>
<i>L. farciminis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. frumenti</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. panis</i>
<i>L. leichmanni</i>		<i>L. pontis</i>
<i>L. mindensis</i>		<i>L. reuteri</i>
		<i>L. sanfranciscensis</i> ^d
		<i>L. viridescens</i>

Figura 4. Lattobacilli isolati da un impasto acido.

In presenza di ossigeno o altri ossidanti, si innalza l'ammontare di acetato che può essere prodotto, a discapito del lattato e dell'etanolo. Vari componenti come citrato, malato, tartrato e nitrato possono essere metabolizzati e usati come fonte di energia o come elettroni-accettori (*Hammes & Vogel, 1995*).

Negli impasti acidi sono i LAB etero fermentanti che giocano il ruolo maggiore in confronto agli altri sistemi di prodotti fermentati. *L. sanfranciscensis* è di gran lunga il batterio lattico predominante negli impasti; troviamo inoltre anche *L. brevis* e *L. plantarum* (*Vogel et al., 1994*). Inoltre sono stati isolati ceppi omofermentanti appartenenti ai generi *Pediococcus* e *Weissella* e ceppi appartenenti al genere *Leuconostoc*.

Le variazioni nella composizione della microflora dipendono da diversi fattori quali tipo di farina, grado di estrazione, Aw, temperature e tempi di fermentazione e modalità di rinfresco dell'impasto acido. La maggior parte degli impasti fermentano attorno ai 30°C ma specie di *L. delbrueckii* sono state isolate in impasti con temperature di fermentazione superiori ai 50°C (*Spicher & Lonner, 1985*).

1.3.2 Lieviti

I lieviti sono considerati funghi unicellulari ubiquitari e quindi microorganismi eucarioti; possono crescere in ampi intervalli di pH ed elevate concentrazioni di etanolo. Inoltre, possono sviluppare a concentrazioni zuccherine anche del 55-60%. In campo alimentare possono svolgere un ruolo positivo, come nel caso della fermentazione alcolica del vino, degli impasti da panificazione e dei prodotti da forno a lievitazione naturale, dove i principali lieviti impiegati appartengono al genere *Saccharomyces*, dei quali il più comune è *S. cerevisiae*. Per la crescita necessitano di ossigeno, di fonti organiche di carbonio, di azoto minerale od organico, di diversi sali minerali, di una o più vitamine (tiamina, biotina, acido pantotenico) e di altri fattori di crescita.

Nella classificazione del 1984 di Kreger Van Rij i lieviti sono suddivisi, in funzione della loro modalità di riproduzione sessuale, in *ascomiceti*, *basidiomiceti* e *deuteromiceti*.

a) *Ascomiceti*: si riproducono sia per via agamica (o asessuale) che per via gamica (o sessuale). Gli ascomiceti sono compresi nell'ordine *Endomycetales* che comprende 4 famiglie. Di queste la terza è suddivisa in 4 sottofamiglie, tutte di interesse industriale ad eccezione dell'ultima. Il lievito più importante che appartiene all'ordine degli Ascomiceti è *S. cerevisiae*, utilizzato in panificazione, nella produzione di vino, nella fabbricazione della birra e per la produzione di alcool a livello industriale

b) *Basidiomiceti*: si riproducono formando spore sessuali esterne su una struttura chiamata basidio; i basidiomiceti comprendono l'ordine *Ustilaginales* che è suddiviso in due generi: *Leucosporidium* e *Rhodosporidium*. Non sono presenti lieviti d'interesse industriale.

c) *Deuteromiceti*: sono detti anche funghi imperfetti poiché tale gruppo comprende lieviti che si riproducono solo per via vegetativa, cioè per gemmazione. La classe dei deuteromiceti comprende alcune specie di importanza industriale tra cui *Candida utilis* (utilizzato per la produzione di lievito industriale), che è in grado di metabolizzare i monosaccaridi pentosi (come xilosio e arabinosio), e *Candida milleri*, frequentemente isolata dagli impasti acidi.

Parecchie specie di lieviti sono state isolate da impasti acidi e/o da prodotti da forno commerciali o artigianali.

I lieviti più frequentemente isolati dagli impasti sono *Saccharomyces cerevisiae* assieme ad altre specie quali: *S. exiguus*, *Candida milleri* (*C. holmii*), *C. krusei*. Occasionalmente sono state isolate specie come *Pichia saitoi*, *P. norvegensis* e *Hansenula anomala* e altre specie di *Saccaromyces spp* (Hansen, 2004).

Yeasts Isolated from Sourdoughs and Their Synonyms

Perfect Fungi	Imperfect Fungi	Synonyms
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
<i>S. exiguus</i>	<i>Candida holmii</i>	<i>Torulopsis holmii</i> <i>Torula holmii</i> <i>S. rosei</i>
	<i>Candida milleri</i>	<i>Torulopsis holmii</i>
<i>S. delbrueckii</i>		<i>Torulasporea delbrueckii</i> <i>S. inusitatus</i>
<i>S. uvarum</i>		
<i>Issatchenkia orientalis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>S. krusei</i> <i>Endomyces krusei</i>
<i>Pichia anomala</i>	<i>C. peliculosa</i>	<i>Hansenula anomala</i>
<i>P. membrifaciens</i>	<i>C. valida</i>	
<i>P. norvegensis</i>		
<i>P. polymorpha</i>		
<i>P. satoi</i>		
<i>Endomycopsis fibuligera</i>		<i>S. fibuliger</i>

Figura 5. Lieviti isolati in un impasto acido.

I lieviti presenti negli impasti acidi sono generalmente acido tolleranti.

Siccome la stabilità di alcuni impasti acidi dipende dalla specifica cooperazione tra alcune specie di lieviti e LAB (Gobetti, 1998), la presenza di *S. cerevisiae* può essere imputata alla sua aggiunta nell'ambito dell'industria da forno.

1.4 Interazioni tra lieviti e batteri lattici

Gli impasti acidi sono molto spesso utilizzati nella tecnologia dei prodotti da forno perché offrono innumerevoli vantaggi rispetto all'utilizzo del solo lievito commerciale. Tali vantaggi sono soprattutto correlati alle attività metaboliche dei batteri lattici degli impasti acidi: fermentazione lattica, proteolisi, prevenzione di contaminanti microbici e soprattutto sintesi di composti aromatici. Per quanto riguarda la produzione di aromi, è molto importante l'utilizzo di batteri lattici assieme ai lieviti. Per esempio la crescita dei LAB può essere stimolata da ceppi di lievito attraverso la produzione di

amminoacidi, peptidi o vitamine. Ad esempio questo fenomeno è stato descritto nell' "impasto acido Sanfrancesco" (Spicher et al., 1981), in cui il lievito *T. holmii* (*C. milleri*) non era in grado di assimilare maltosio, il quale, invece veniva idrolizzato da *L. sanfrancisco* producendo glucosio, che poteva di conseguenza essere utilizzato dal lievito che crescendo, a sua volta, liberava amminoacidi che erano essenziali per lo sviluppo del batterio lattico (Gobetti, 1998). Tuttavia è stato mostrato come spesso i LAB, moltiplicandosi, producano acido lattico e acetico più lentamente in miscela con i lieviti piuttosto che da soli. Questo diverso comportamento può essere spiegato considerando le interazioni trofiche tra LAB e i ceppi di lieviti, in particolare per quanto riguarda il metabolismo dei carboidrati e composti azotati.

1.4.1 Metabolismo dei carboidrati

Il contenuto dei carboidrati solubili nelle farine risulta essere molto basso. Nelle farine di frumento la concentrazione totale di maltosio, glucosio e fruttosio si aggira attorno a valori di 1.5-2% e dipende dall'equilibrio fra la quota di amido idrolizzato da parte degli enzimi amilolitici delle farine e quelli di natura microbica e dello sviluppo microbico. Comunque molti studi riportano che, rispetto a colture pure, la moltiplicazione dei LAB, nonché la produzione di acido acetico e lattico, sono rallentate nei mezzi contenenti anche lieviti. Questo è dovuto ad un rapido consumo di maltosio da parte di *S. cerevisiae* quando associato a *Lactobacillus sanfrancisco* in terreni contenenti questa fonte di carbonio. Negli impasti fermentati dai lieviti e LAB la concentrazione di maltosio rimane inizialmente ai valori di 2-5 g/Kg (Martinez et al., 1993). Il maltosio si accumula nelle prime fasi perché non è metabolizzato dai lieviti finché sono presenti nel mezzo glucosio e fruttosio, questo perché essi hanno un effetto di repressione metabolica su maltosio-permeasi. Tuttavia negli impasti acidi è frequente ritrovare lieviti maltosio negativi per repressione del gene responsabile della fermentazione del maltosio. La debole competizione per i carboidrati solubili presenti nell'impasto sembra fondamentale per l'associazione di *S. exigus* e *L. sanfranciscensis*

che si verifica nella produzione di panettone (*Gobetti et al., 1994*), nel pane “San Francisco” (*Sugihara et al., 1970*) e negli impasti acidi prodotti in diverse nazioni (*Spicher et al., 1982; Wlolarczyk, 1985*).

I lieviti di un impasto acido e i LAB hanno diverse cinetiche per quanto riguarda l'assorbimento dei carboidrati. La maggior parte dei lieviti assorbe gli esosi e il maltosio attraverso l'alta affinità del sistema di trasporto mentre il disaccaride assorbito dai LAB è strettamente dipendente dalla concentrazione esterna e, di conseguenza, il sistema è meno efficace. L'utilizzazione dei carboidrati solubili da parte dei LAB e, di conseguenza, la loro produzione di acidi è largamente influenzata dal lievito associato. Spesso lo squilibrio tra consumo dei lieviti e idrolisi dell'amido da parte degli enzimi della farina determina una rapida diminuzione dei carboidrati solubili durante la fermentazione con conseguente minor acidificazione da parte dei LAB. La mancanza di competizione per la principale fonte di carbonio è essenziale per la stabilità dell'associazione LAB-lieviti, come accade per esempio nel pane francese, dove *S. exigus* usa glucosio e fruttosio non competendo quindi con *L. sanfranciscensis* per il maltosio: *L. sanfranciscensis* idrolizza il maltosio e accumula nel mezzo glucosio, che può essere utilizzato dai lieviti maltosio negativi come *S. exigus* o può prevenire competitori per il maltosio attraverso la repressione da glucosio, dando così vantaggio a *L. sanfranciscensis*. I rapporti trofici che occorrono tra i LAB prevalentemente presenti in un impasto acido (*L. sanfranciscensis* e *L. plantarum*) e il lievito (*S. cerevisiae*) sono stati studiati in sistemi modello. La crescita batterica e la produzione di acido lattico e acetico decrescono per il veloce consumo di maltosio e specialmente di glucosio da parte di *S. cerevisiae* quando associato con *L. sanfranciscensis* in mezzo sintetico contenente queste fonti di carbonio. Quando *L. plantarum* è associato con *S. cerevisiae* in presenza di saccarosio come fonte di carbonio, aumenta la resa cellulare e la produzione di acido lattico per idrolisi del saccarosio in glucosio e fruttosio (maggiormente utilizzabili) ad opera del lievito.

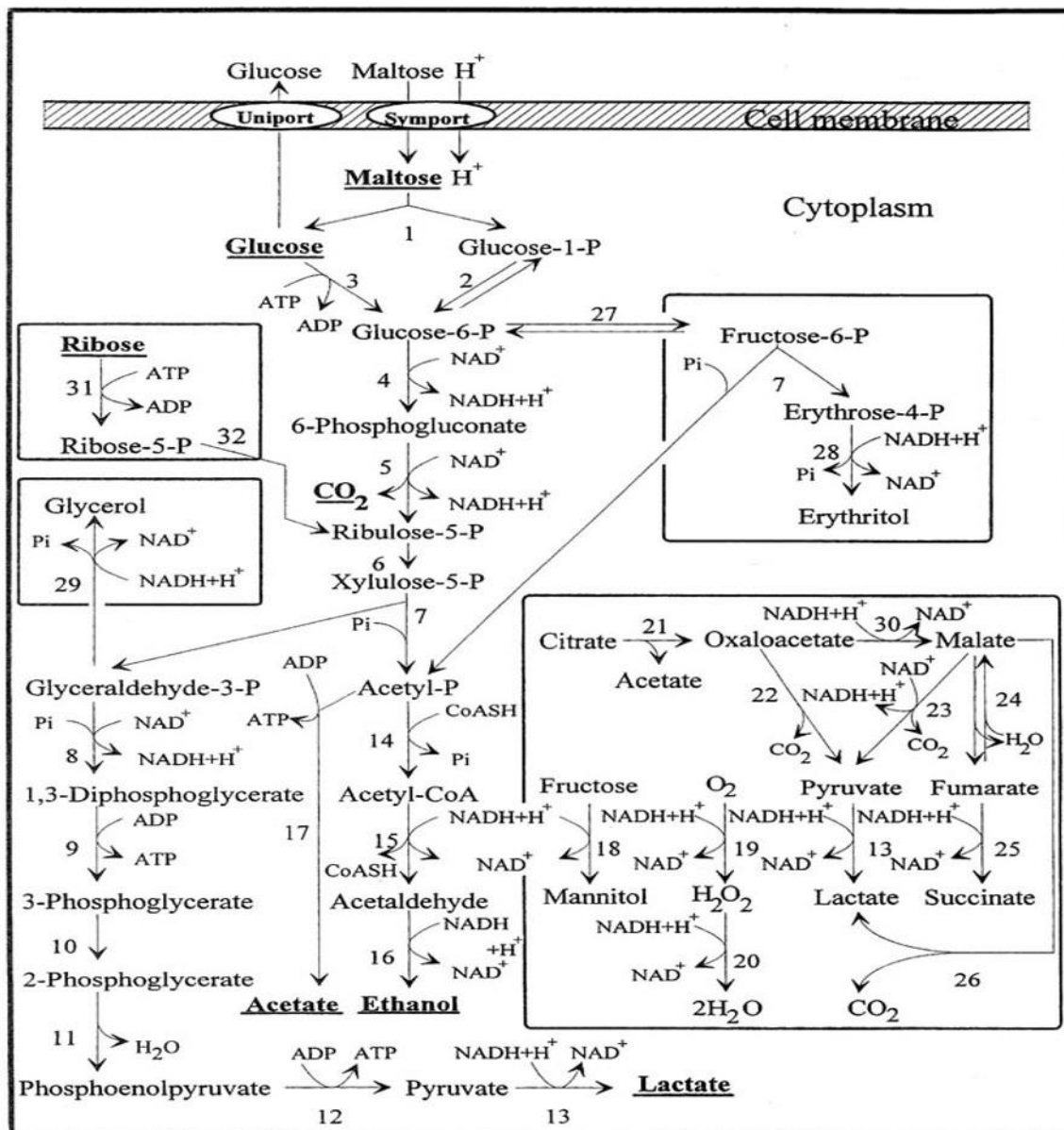


Figura 6. Metabolismo dei carboidrati dei batteri lattici.

1.4.2 Metabolismo delle fonti azotate

I peptidi e gli aminoacidi giocano un ruolo essenziale come importanti precursori di aromi e interferiscono sulle proprietà fisiche degli impasti acidi. Gli aminoacidi derivano per lo più dagli enzimi proteolitici presenti naturalmente nella farina e dagli stessi enzimi prodotti dalla microflora spontanea, soprattutto da ceppi di LAB. Gli enzimi proteolitici sono molto importanti durante la fermentazione degli impasti acidi

poiché stimolano le interazioni tra batteri lattici e lieviti grazie all'aumentata disponibilità di amminoacidi che favoriscono la crescita dei lieviti (*Gobetti et al., 1995*). Gli amminoacidi, inoltre, derivano per scissione litica della massa cellulare dei microorganismi presenti nell'impasto: *S. cerevisiae* soprattutto produce acido γ -aminobutirrico, prolina, valina, isoleucina, glicina, alanina e peptidi negli impasti; mentre i LAB producono essenzialmente glicina e alanina. In un sistema modello con un adeguato contenuto di fonti di carbonio e vitamine, la stimolazione della crescita di *L. sanfranciscensis* e *L. plantarum* da parte di *S. cerevisiae* e *S. exigus* è stata correlata alla mancanza di competizione per le fonti di azoto e alla sintesi, da parte dei lieviti, di amminoacidi o piccoli peptidi durante la crescita o per l'autolisi delle cellule. La liberazione degli amminoacidi dai lieviti permette la crescita di *L. sanfranciscensis* in un substrato tendenzialmente povero in amminoacidi essenziali (*Lyons & Rose, 1977*). I LAB, dunque, dipendono da sistemi proteolitici che permettono la degradazione di proteine. Questi sistemi proteolitici consistono in una serin-proteasi allocata extracellularmente che ha sistemi di trasporto specifici per di/tri – peptidi e oligopeptidi ed una moltitudine di peptidasi intracellulari. Generalmente gli enzimi proteolitici sono raggruppati in proteinasi e peptidasi. Le prime catalizzano la degradazione delle proteine in piccole frazioni peptidiche, mentre le peptidasi idrolizzano specifici legami peptidici, determinando la liberazione di amminoacidi. Quest'ultimi, assieme ai peptidi, sono responsabili del sapore dei cibi fermentati e, in particolare, sono importanti precursori di composti volatili; inoltre gli amminoacidi servono come substrato per la conversione microbica o vengono convertiti in aromi durante la cottura.

1.5 Componenti volatili negli impasti acidi

Il gusto, l'aroma e il sapore sono indubbiamente i più importanti attributi determinanti la qualità dei prodotti da forno in generale. La fermentazione dell'impasto acido ha un ruolo ben preciso nell'incrementare il sapore e la struttura dei prodotti derivanti (*Brummer & Lorenz, 2003*). Ad esempio, il pane derivante da un impasto acido ha un alto contenuto di componenti volatili con un profilo sensoriale migliore rispetto ad un pane acidificato chimicamente tramite acido lattico e acetico (*Hansen et al., 1989; Hansen & Hansen, 1996*). La presenza di alcuni dei componenti presenti nei prodotti finiti sono stati comparati alle concentrazioni nei rispettivi impasti acidi; ad esempio il contenuto di metilpropanolo, 2 e 3 metilbutanolo, etilacetato ed etil lattato nei prodotti da forno è stato relazionato all'ammontare degli stessi negli impasti acidi (*Hansen & Lund, 1987; Lund et al., 1987*).

La fermentazione degli impasti acidi determina la formazione di composti volatili e non. Per quel che riguarda i componenti non volatili, essi comprendono gli acidi organici prodotti da batteri omofermentanti (*Gobetti et al., 1995*) i quali acidificano, abbassano il pH e contribuiscono all'aroma dell'impasto (*Galal et al., 1987; Barber et al., 1985*). La seconda categoria sono i componenti volatili i quali includono alcoli, aldeidi, chetoni, esteri e solfuri.

Tutti questi componenti sono prodotti da azioni biologiche e biochimiche durante la fermentazione (*Spicher, 1983*). Con l'associazione di LAB e lieviti, si nota che il pane raggiunge una più alta qualità aromatica che potrebbe essere dovuta ad un alto contenuto di 2-metil-1-butanololo, 3-metil-1-butanololo, acido 2-metilpropanoico, acido 3-metilbutanoico e alcol 2-feniletilico (*Gobetti, 1998*).

Aroma	Mollica	Crosta	Precursore
2-acetil-1-pirrolina	+	++	Ornitina, prolina, citrullina, diidrossiacetofosfato, gliceraldeide-3-fosfato
2-acetil-1.4.5.6-tetraidropiridina	+	+++	Prolina, fruttosio
3-metilbutanolo	+++	-	Leucina
2-feniletanolo	+++	-	Fenilalanina
Metionale	++	+++	Metionina
Fenilacetaldeide	+	++	Fenilalanina
3-metilbutanale	+	+++	Leucina
4-idrossi-2.5-dimetil-3(2H) furanone	++	+++	Gliceraldeide-3-fosfato, diidrossiacetofosfato, fruttosio-1.6-difosfato, fruttosio-6-fosfato
Metilpropanale	+	+++	Valina
2.3-butadione	++	++	Piruvato, acetilCoA, monosaccaridi

Figura 7. Principali aromi del pane e loro origine.

In generale tutti gli impasti acidi prodotti utilizzando, ad esempio, un consorzio microbico costituito da un LAB e un *S. cerevisiae* come starter, hanno più alte concentrazioni di prodotti di fermentazione dei lieviti: la produzione degli alcoli è incrementata di 1.8 volte rispetto al solo *S. cerevisiae* come starter, mentre i principali composti volatili dei LAB (etil acetato, acido acetico, acido lattico e carbonili) subiscono un decremento (*Damiani et al., 1996*). Altri esperimenti riportano che la combinazione di *L. brevis* e *S. cerevisiae* non ha praticamente effetto sulla produzione di acido lattico rispetto alla quantità prodotta con il singolo starter, in quanto provoca

solo un leggero decremento della produzione di etanolo, mentre si ha un incremento per quanto riguarda la produzione di acido acetico dai LAB e di glicerolo dai lieviti (Meignen *et al.*, 2001). In generale diversi studi hanno dimostrato un'attivazione del metabolismo dei lieviti quando associati con LAB omofermentati o eterofermentanti probabilmente dovuto alla combinazione di acidificazione batterica e attività proteolitica dei LAB che sviluppano molti amminoacidi, precursori di isoalcoli. Solo *L. plantarum* DC400 ha un effetto riduttore sugli aromi prodotti dai lieviti (*S. cerevisiae* e *S. exigus*), ma l'impasto acido comunque acquisisce un aroma bilanciato grazie all'insieme di composti volatili prodotti dai lactobacilli e dal lievito (Damiani *et al.*, 1996). Naturalmente la produzione aromatica in un impasto acido è condizionata da numerosi parametri: tempo, temperatura di fermentazione, dough yield (DY), contenuto in ceneri della farina, l'eventuale addizione di fruttosio e acido citrico che attiva i lactobacilli per la sintesi di acido acetico ed altri composti volatili.

Ad esempio mentre dopo tre ore di fermentazione l'impasto acido è caratterizzato da isoalcoli, un tempo di fermentazione prolungato fino a 9 ore rafforza il contributo dei lattobacilli determinando la produzione di una quantità di composti volatili totale di circa 3 volte superiore rispetto ad una fermentazione di 5 ore (Gobetti *et al.*, 1995). Meignen *et al.* (2001) hanno dimostrato una maggiore produzione di aromi in un impasto così detto combinato cioè formato da un processo singolo in cui lieviti e LAB crescono in impasti separati per 15 ore, e da un processo misto della durata di 10 ore in cui si uniscono i due impasti. Molti composti aromatici sono presenti in un impasto acido: gli alcoli sono generalmente i più abbondanti, seguiti da aldeidi, esteri, chetoni, acidi ed alcuni terpeni (Seitz *et al.*, 1998). I più abbondanti alcoli rilevati sono etanolo, 2- e 3-metil-1-butanolo, 1-propanolo, 1-pentanolo e 1-esanolo, mentre è carente la produzione di 2-metil-1-propanolo, abbondante in altri tipi di impasti. Fra le aldeidi importante è la produzione di 2-metilpropanale, 2- e 3-metilbutanale, pentanale, esanale, eptanale, octanale, nonale, 2-esenale, 2-eptenale, 2-octenale, 2,4-eptadienale e 2,4-esadienale assieme a 2,4-nonadienale. Per quanto riguarda invece esteri, acidi e chetoni i più abbondanti sono etilacetato, etil lattato, acido acetico, acido propanoico,

2-butanone, 2,3-butadione e 2,3-pentadione, oltre che 2-pentilfurano (*Annan et al., 2003*).

La generazione di un numero sufficiente di componenti volatili durante la fermentazione necessita di più step in un processo che varia dalle 12 alle 24 ore, mentre la fermentazione dovuta al solo lievito commerciale finisce in sole poche ore senza appunto produrre lo stesso numero di componenti volatili. La generazione di aromi negli impasti acidi è chiaramente influenzata dall'attività dei LAB e dai lieviti presenti. Diversi fattori influenzano la loro azione quali temperatura e il contenuto in acqua, con conseguente influenza sul numero di componenti volatili prodotti. Generalmente, i LAB sono responsabili dell'acidificazione. La chiave della degradazione di amminoacidi, durante la fermentazione dell'impasto, è data dal processo metabolico di Ehrlich che porta alla formazione di alcoli dalle rispettive aldeidi (*Schieberle, 1996*). Gli alcoli sono prodotti in alte concentrazioni quando la fermentazione è portata avanti con *L. orientalis* in combinazione con *L. brevis* o *L. plantarum*; il diacetile è prodotto in quantità significanti da *L. plantarum* e *Pediococcus pentosaceus*.

La produzione di aldeidi è incrementata dallo sviluppo di *L. plantarum* e lieviti (*Edema & Sanni, 2008*). Il quoziente di fermentazione, ossia il rapporto molare tra acido lattico e acido acetico, è spesso utilizzato come misura in studi attribuiti al bilanciamento di questi acidi in quanto un minor contenuto in acido acetico, rispetto quello lattico, determina una diminuzione del flavour (*Spicher & Stephan, 1993*).

Il rapporto tra acido lattico e acido acetico è un fattore importante che influenza l'aroma del prodotto finale (*Corsetti & Settani, 2007*) ed è condizionato dalla fermentazione dei microorganismi, dalle temperature di fermentazione e dal tipo di farina. Questo parametro è assai importante in quanto indice della capacità di produrre sostanze aromatiche nell'impasto; negli impasti acidi i valori ottimali di quoziente di fermentazione si attestano fra 1,4 e 4.

1.6 Fattori che influenzano la qualità e lo sviluppo degli impasti acidi

Molte proprietà inerenti le caratteristiche degli impasti acidi dipendono dalle attività metaboliche dei batteri lattici che vi ritroviamo: fermentazione lattica, proteolisi e sintesi di composti volatili, produzione di sostanze antimuffa e antiviscosità rientrano tra le attività importanti durante la fermentazione (*Hammes & Ganzle 1998; Gobetti et al., 1999*). Inoltre, fattori endogeni nella produzione dei cereali e parametri di processo influenzano marcatamente la microflora dell'impasto acido e la qualità futura dei prodotti da essa derivati. Tra i parametri, i principali sono:

- Dough Yield (DY) o resa dell'impasto: gli impasti acidi possono variare nella loro consistenza. Il valore della resa dell'impasto (dato dalla percentuale della somma tra l'ammontare di farina più ammontare di acqua, diviso per la quantità di farina) può significativamente influenzare il profilo organolettico dell'impasto acido. Inoltre la resa può essere a sua volta influenzata dalla percentuale di acidificazione (*Spicher & Stephan, 1999*).
- la temperatura è il fattore principale in quanto influenza sia la resa sia l'acidificazione che la composizione della popolazione microbica dell'impasto. Se la madre viene rimboccata da un impasto derivante da una precedente fermentazione, la temperatura gioca un ruolo chiave perché parte della microflora può essere persa se l'operazione di rinfresco non avviene in modo controllato (*Spicher & Stephan, 1999*). L'ottimo di temperatura per la crescita dei lattobacilli è di 30-40° C a seconda del ceppo, mentre sarà di 25-27°C per i lieviti (*Brummer & Lorenz, 1991*).
- un terzo parametro che influenza la qualità della madre sono le colture starter utilizzate per la fermentazione. Due principali categorie possono essere distinte: i batteri lattici eterofermentanti e quelli omofermentanti. Commercialmente disponibili troviamo starter composti da una miscela di differenti LAB che sono in grado di assicurare una buona acidificazione e aromatizzazione dell'impasto acido.

- altri due fattori che influenzano la qualità sono gli acidi titolabili e il pH dell'impasto. Nella fase iniziale sia acidità che pH rimangono costanti mentre, nella fase intermedia la composizione in acidi titolabili aumenta grazie alla presenza dei lieviti. Durante la fase di fermentazione a lungo termine, i lieviti si riducono e i valori di pH e acidi titolabili dipenderanno dalle concentrazioni dei LAB all'interno del sistema. I lieviti presenti nell'impasto acido sono leggermente influenzati dalla presenza di acido lattico mentre sono maggiormente influenzati dalla presenza di acido acetico (*Schulz, 1972*).
- ultimo fattore che influenza la qualità di una madre acida, ma non meno importante, è il tipo di substrato derivato dal grado di estrazione delle farine utilizzate poi per formare la madre.

1.7 Utilizzo della madre nei prodotti da forno

Gli impasti acidi sono utilizzati come ingredienti importanti nella produzione di pane bianco, cracker e prodotti dolciari (*Bruemmer & Lorenz, 1991*). La tradizione di produrre pane con l'aggiunta di impasti acidi è largamente diffusa nelle aree mediterranee quali Grecia, Spagna, Egitto e Marocco. L'assunzione di cereali nella dieta tradizionale greca proviene principalmente dal consumo di prodotti a base di impasti acidi rispetto che pasta (*Simopoulos, 2001*). In Italia, gli impasti acidi sono usati in più del 30% dei prodotti da forno, inclusi pane e molti prodotti tradizionali dolci lievitati (*Ottogalli et al., 1996*). Il consumo di prodotti tradizionali dolci lievitati avviene generalmente in occasioni tipiche religiose: per esempio, il Panettone e la Colomba sono due dolci lievitati prodotti rispettivamente per Natale e Pasqua. Nonostante la loro origine geografica (regione Lombardia), questi prodotti hanno, ai giorni nostri, una diffusione nazionale ed internazionale. Entrambi i prodotti sono ottenuti secondo specifiche procedure le quali sono caratterizzate da operazioni simili. In particolare, la loro preparazione inizia da un impasto acido definito "madre", che viene continuamente propagato e rinfrescato. La Colomba pasquale è un tipico prodotto

dolciario italiano da forno a pasta morbida, ottenuto per fermentazione naturale da pasta acida, di forma irregolare ovale simile alla colomba, una struttura soffice ad alveolatura allungata, con glassatura superiore e una decorazione composta da granella di zucchero e almeno il 2% di mandorle, riferito al prodotto finito e rilevato al momento della decorazione rinfrescata (D.M. 22.07.05). Questo tipo di prodotto da forno è tuttora oggetto di studi scientifici: ad esempio nello studio effettuato Vernocchi *et al.* (2004) sono state isolate le specie di lieviti presenti in un impasto acido per la produzione della Colomba pasquale. Inizialmente, i lieviti isolati sono stati caratterizzati in base alla loro morfologia, formazione delle spore e alla capacità di utilizzare e fermentare i carboidrati. Inoltre, sono state isolate e caratterizzate anche le specie di batteri lattici presenti nell'impasto in base a diversi test fisiologici quali, e sono state effettuate analisi chimico-fisiche (pH, Aw, zuccheri e acidi organici) e conteggi microbici. I lieviti caratterizzati sono stati poi identificati geneticamente attraverso il metodo RAPD-PCR. Tale metodo è un tipo di PCR in cui i segmenti di DNA amplificati sono scelti casualmente, utilizzando un primer generico (M13). Per eseguire una RAPD, si costruiscono un certo numero di primer brevi (8–12 nucleotidi) a composizione arbitraria e si procede alla reazione di amplificazione usando come stampo un lungo tratto di DNA genomico. Nel caso in cui i primer riescano ad associarsi al DNA, l'amplificazione produrrà una serie di frammenti che, interpretati, permetteranno di approssimare un profilo semi-individuale dell'organismo in analisi. Nessuna conoscenza della sequenza di DNA del genoma di interesse è richiesta, poiché i primer legheranno in un qualsiasi punto della sequenza, sebbene non si avrà la certezza di quale sia il sito di legame. I risultati del lavoro hanno dimostrato che, in generale, i LAB sono in numero superiore rispetto ai lieviti e, di quest'ultimi, i maggiormente riscontrati in tutto il microbiota dell'impasto usato sono *Candida milleri* e *S. cerevisiae*.

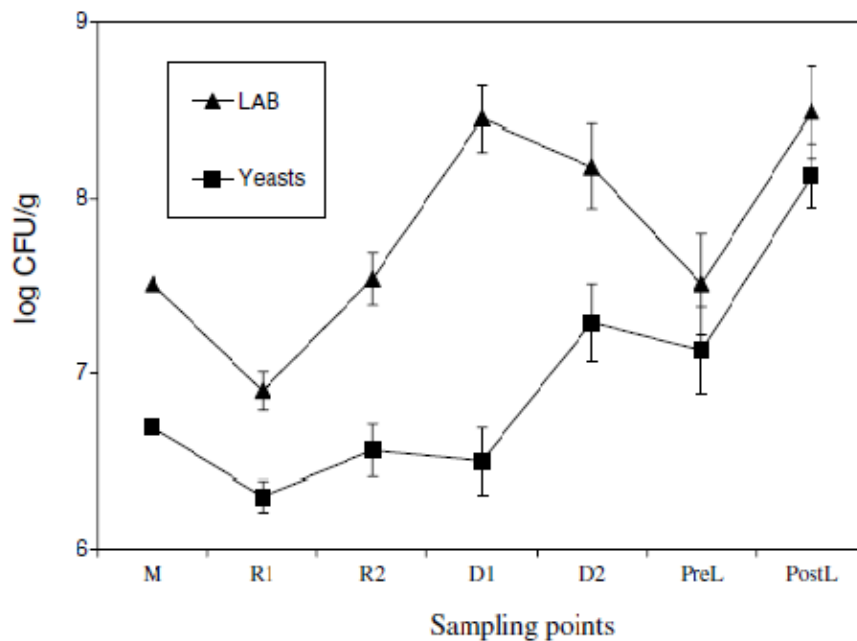


Figura 8. Evoluzione della popolazione di lieviti e LAB durante la produzione della Colomba.

Infatti, lieviti della specie *Candida milleri* sono stati spesso associati agli impasti acidi (Ottogalli *et al.*, 1996; Vogel *et al.*, 1999) poiché, anche se questo microrganismo non è in grado di fermentare il maltosio, cresce grazie al glucosio rilasciato dai LAB eterofermentanti e fornisce ai LAB una fonte di elettrone-accettore (fruttosio), il quale incrementa la resa cellulare e la produzione di acido acetico. Questa stretta cooperazione evidenziata tra batteri lattici e lieviti gioca un ruolo importante, sia tecnologico che organolettico, sul prodotto finale.

Un altro lavoro su questo tipo di prodotti da ricorrenza, ed in particolare sul Pandoro, è stato svolto da Montanari *et al.* (2014). In questo caso lo scopo dello studio era quello di valutare l'effetto dell'utilizzo di due diversi tipi di impasti acidi, propagati a due differenti temperature (13° e 19°C), sui metaboliti prodotti, che a loro volta influenzano le caratteristiche organolettiche del prodotto finale. La valutazione è stata svolta a seguito di una caratterizzazione del microbiota degli impasti, sui quali sono stati valutati: numero della popolazione microbica di LAB e lieviti, pH, Aw, carboidrati, acidi organici e metaboliti volatili.



Figura 9. Maturazione dell'impasto madre a temperatura controllata.

I risultati hanno dimostrato come, a fine fermentazione, l'impasto acido propagato a 19°C raggiungeva pH più bassi rispetto quello propagato a 13°C. Questo probabilmente è dovuto all'altra concentrazione di LAB, con la conseguente maggiore concentrazione di acido lattico e una maggiore assimilazione degli zuccheri da parte dei batteri. Al contrario, la temperatura degli impasti durante la maturazione non ha modificato la concentrazione dei lieviti. Il lavoro ha inoltre dimostrato che le temperature di propagazione, influenzando la popolazione microbica degli impasti, hanno effetti significativi sui metaboliti volatili. Quest'ultimi sono stati analizzati mediante SPME-GC-MS (analisi gas-cromatografica) e i risultati, riportati in figura 10, sono stati successivamente elaborati mediante PCA (principal component analysis), da cui è apparso evidente come i due differenti processi produttivi siano in grado di influenzare fortemente il profilo aromatico sia degli impasti a fine fermentazione sia del prodotto finale cotto (figura 11).

Compounds	SD1 ^a		SD2		SD3		Leavened		Baked		Dried	
	19 °C	13 °C	19 °C	13 °C	19 °C	13 °C	19 °C	13 °C	19 °C	13 °C	19 °C	13 °C
2,3-butanedione	0.13 ± 0.02	0.23 ± 0.05	-	-	0.07 ± 0.06	0.19 ± 0.10	0.44 ± 0.23	0.91 ± 0.18	0.63 ± 0.18	0.77 ± 0.12	1.46 ± 0.23	1.07 ± 0.09
2-heptanone	0.15 ± 0.05	0.67 ± 0.21	0.22 ± 0.05	-	-	-	1.22 ± 0.08	1.53 ± 0.09	1.57 ± 0.31	1.82 ± 0.36	3.74 ± 0.52	4.00 ± 0.54
2-butanone, 3-hydroxy	- ^b	-	-	-	-	-	12.57 ± 1.58	13.00 ± 1.25	13.73 ± 0.89	13.27 ± 1.25	12.84 ± 0.87	16.79 ± 0.65
2-propanone, 1-hydroxy	-	-	-	-	-	-	1.76 ± 0.56	1.07 ± 0.21	1.94 ± 0.25	1.27 ± 0.26	1.30 ± 0.24	1.91 ± 0.24
2-nonanone	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02	-	0.51 ± 0.23	0.03 ± 0.04	-	0.66 ± 0.18	0.85 ± 0.11	1.41 ± 0.35	1.42 ± 0.11	1.66 ± 0.08	1.64 ± 0.14
Ketones	0.36 ± 0.05	1.04 ± 0.23	0.22 ± 0.05	0.51 ± 0.23	0.10 ± 0.09	0.19 ± 0.10	16.63 ± 1.97	17.36 ± 1.75	19.28 ± 0.94	18.56 ± 1.48	21.01 ± 1.05	25.40 ± 0.99
Acetaldehyde	-	-	-	-	-	-	6.90 ± 0.88	4.72 ± 0.59	-	-	-	-
Hexanal	1.45 ± 0.21	2.66 ± 0.11	2.41 ± 0.24	2.11 ± 0.45	1.39 ± 0.11	-	-	-	0.38 ± 0.11	0.18 ± 0.11	0.11 ± 0.08	-
Heptanal	0.21 ± 0.02	0.38 ± 0.08	0.82 ± 0.11	1.44 ± 0.12	0.53 ± 0.23	0.04 ± 0.05	-	-	-	-	1.23 ± 0.12	1.39 ± 0.16
Octanal	0.36 ± 0.09	0.20 ± 0.01	0.98 ± 0.11	0.67 ± 0.21	0.57 ± 0.14	0.16 ± 0.10	-	-	0.07 ± 0.08	-	0.27 ± 0.16	0.20 ± 0.05
Nonanal	1.01 ± 0.01	1.85 ± 0.02	1.26 ± 0.26	2.10 ± 0.56	1.17 ± 0.31	1.45 ± 0.56	0.61 ± 0.13	0.92 ± 0.11	0.53 ± 0.03	0.59 ± 0.22	0.79 ± 0.32	0.41 ± 0.14
Furfural	-	0.68 ± 0.06	-	-	-	-	-	-	5.41 ± 0.87	7.38 ± 0.89	11.29 ± 1.01	10.30 ± 1.01
2-dodecenal	0.08 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.15 ± 0.09	0.38 ± 0.15	0.11 ± 0.08	-	-	-	0.13 ± 0.08	-	0.17 ± 0.05	-
Benzaldehyde	0.22 ± 0.04	0.16 ± 0.02	0.35 ± 0.08	0.49 ± 0.13	0.17 ± 0.09	0.11 ± 0.09	0.32 ± 0.11	0.50 ± 0.08	0.93 ± 0.15	0.90 ± 0.48	1.84 ± 0.38	1.13 ± 0.02
Aldehydes	3.33 ± 0.25	6.11 ± 0.23	5.97 ± 0.38	7.20 ± 0.98	3.94 ± 0.66	1.77 ± 0.64	7.84 ± 0.91	6.14 ± 0.62	7.45 ± 0.99	9.04 ± 1.01	15.70 ± 1.24	13.44 ± 1.12
Ethyl alcohol	37.30 ± 4.11	40.21 ± 2.73	39.61 ± 3.15	41.01 ± 1.26	42.23 ± 2.22	44.48 ± 3.02	43.90 ± 2.56	49.46 ± 2.98	53.68 ± 1.08	60.20 ± 4.67	35.01 ± 2.22	39.45 ± 1.15
2-methyl-1-propanol	0.46 ± 0.10	0.68 ± 0.12	0.89 ± 0.23	0.31 ± 0.20	0.58 ± 0.20	0.34 ± 0.13	3.62 ± 0.56	4.59 ± 0.21	0.31 ± 0.12	0.69 ± 0.09	2.14 ± 0.22	2.20 ± 0.014
1-butanol 3-methyl-	8.76 ± 0.54	7.26 ± 0.98	10.66 ± 1.12	5.33 ± 0.65	6.40 ± 0.97	4.39 ± 0.89	11.56 ± 0.68	10.87 ± 0.97	3.21 ± 0.87	2.95 ± 0.65	8.92 ± 0.61	8.20 ± 0.69
1-hexanol	5.64 ± 0.24	6.66 ± 1.12	5.99 ± 0.88	5.42 ± 0.23	2.08 ± 0.11	5.35 ± 0.68	1.29 ± 0.11	1.33 ± 0.15	0.63 ± 0.08	0.77 ± 0.08	0.17 ± 0.10	0.07 ± 0.09
1-octen-3-ol	0.72 ± 0.11	1.82 ± 0.23	1.18 ± 0.24	0.90 ± 0.11	0.44 ± 0.02	0.63 ± 0.15	0.08 ± 0.09	0.21 ± 0.05	0.10 ± 0.08	0.18 ± 0.11	0.12 ± 0.03	0.20 ± 0.15
2-furanmethanol	-	-	-	-	-	-	-	-	1.02 ± 0.23	1.13 ± 0.23	1.40 ± 0.26	1.35 ± 0.04
Phenylethyl alcohol	1.32 ± 0.26	0.56 ± 0.14	0.98 ± 0.17	1.21 ± 0.26	2.26 ± 0.38	1.40 ± 0.21	4.62 ± 0.56	3.73 ± 0.68	4.79 ± 0.54	2.36 ± 0.54	3.25 ± 0.33	2.32 ± 0.92
Alcohols	54.20 ± 4.78	57.19 ± 3.00	59.31 ± 4.66	54.17 ± 1.87	53.98 ± 2.89	56.58 ± 3.70	66.25 ± 3.08	70.19 ± 3.56	63.74 ± 1.97	68.28 ± 4.95	51.00 ± 2.94	53.80 ± 1.65
Ethyl acetate	20.77 ± 1.65	16.90 ± 2.36	17.20 ± 1.56	21.04 ± 2.01	25.60 ± 1.69	27.46 ± 2.68	3.49 ± 0.90	3.01 ± 0.54	-	-	0.28 ± 0.11	0.37 ± 0.09
1-butanol 3-methyl acetate	2.81 ± 0.20	0.64 ± 0.23	0.70 ± 0.10	0.45 ± 0.11	1.77 ± 0.56	0.94 ± 0.56	0.16 ± 0.11	0.13 ± 0.04	0.07 ± 0.07	0.10 ± 0.05	0.15 ± 0.02	0.21 ± 0.10
Methyl acetate	1.08 ± 0.11	3.87 ± 0.45	-	1.03 ± 0.13	-	-	-	-	-	-	0.11 ± 0.10	-
Ethyl butanoate	0.82 ± 0.05	1.42 ± 0.20	-	-	-	-	-	-	-	-	0.26 ± 0.04	0.32 ± 0.04
Ethyl octanoate	0.34 ± 0.01	0.15 ± 0.06	0.14 ± 0.09	-	0.33 ± 0.11	0.27 ± 0.15	0.67 ± 0.16	0.86 ± 0.25	1.00 ± 0.15	0.76 ± 0.11	0.85 ± 0.21	0.80 ± 0.18
Esters	25.82 ± 1.71	22.98 ± 2.89	18.04 ± 1.65	22.52 ± 2.06	27.70 ± 2.98	28.66 ± 2.73	4.31 ± 0.91	4.00 ± 0.68	1.06 ± 0.20	0.85 ± 0.12	1.66 ± 0.26	1.71 ± 0.23
Acetic acid	10.24 ± 0.40	7.56 ± 1.56	6.85 ± 0.92	8.89 ± 0.98	9.98 ± 1.11	7.34 ± 0.99	2.21 ± 0.26	0.65 ± 0.21	4.04 ± 0.58	1.22 ± 0.05	3.70 ± 0.11	1.51 ± 0.04
Hexanoic acid	0.74 ± 0.06	0.85 ± 0.15	0.86 ± 0.15	0.96 ± 0.12	0.96 ± 0.20	0.88 ± 0.15	0.55 ± 0.18	0.51 ± 0.23	0.75 ± 0.26	0.38 ± 0.12	0.64 ± 0.35	0.32 ± 0.15
Nonanoic acid	0.71 ± 0.02	0.75 ± 0.06	1.61 ± 0.23	0.93 ± 0.18	0.58 ± 0.23	1.00 ± 0.23	0.27 ± 0.08	-	0.29 ± 0.11	-	0.21 ± 0.03	-
n-decanoic acid	0.61 ± 0.03	0.24 ± 0.03	1.12 ± 0.14	0.75 ± 0.29	0.46 ± 0.18	0.74 ± 0.15	0.32 ± 0.19	-	0.40 ± 0.08	-	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.12
Tetradecanoic acid	0.70 ± 0.25	0.90 ± 0.04	3.13 ± 0.75	1.40 ± 0.31	0.54 ± 0.08	1.25 ± 0.35	0.83 ± 0.23	0.89 ± 0.12	0.73 ± 0.24	-	0.58 ± 0.12	-
Acids	13.00 ± 0.57	10.30 ± 1.59	13.57 ± 1.62	12.93 ± 1.15	12.99 ± 1.45	11.96 ± 1.08	4.40 ± 0.65	2.05 ± 0.31	6.21 ± 0.68	1.60 ± 0.68	6.80 ± 0.35	2.31 ± 0.54
Total area (A.U.)^c	83,218	55,761	80,739	61,664	98,571	71,503	95,243	56,293	100,451	54,236	112,126	57,935

^a SD1: Sourdough before maturation; SD2: Refreshed sourdough; SD3: Mature sourdough; Dough: intermediate dough (10 h 30' of fermentation); Leavened: Pandoro before baking; Baked: Pandoro immediately after baking; Dried: Pandoro after vacuum drying.

^b Not determined.

^c Total area expressed as Arbitrary Units (×10,000).

Figura10. Metaboliti volatili riscontrati nelle diverse fasi del processo produttivo del Pandoro.

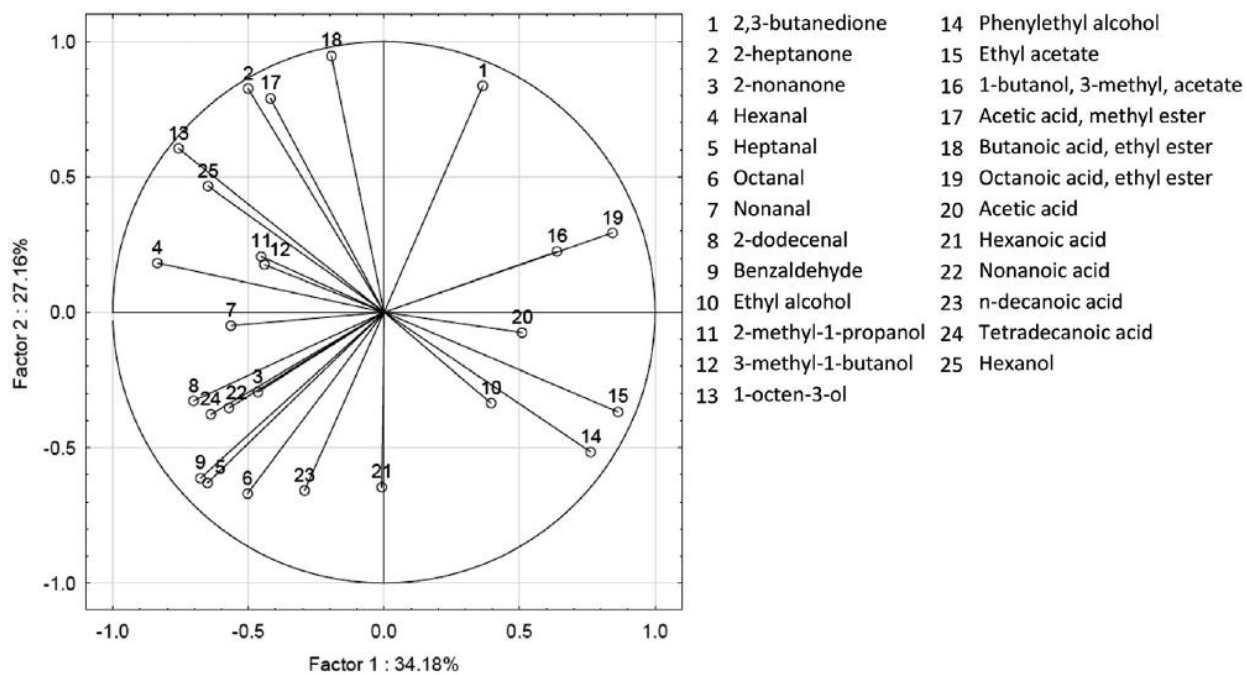


Figura 11. Analisi PCA dei componenti volatili riscontrati nelle diverse fasi del processo produttivo del Pandoro.

CAPITOLO 2: OBIETTIVI

Il consumo di prodotti da forno lievitati in Italia, è particolarmente rilevante in occasione di alcune feste religiose quali Pasqua e Natale. Prodotti come il Panettone, Pandoro e Colomba, indipendentemente dalla loro origine geografica, hanno ormai acquisito una diffusione nazionale ed internazionale. Tutti questi prodotti sono ottenuti mediante procedure specifiche, che sono tuttavia caratterizzate da diversi passaggi simili. In ogni caso, infatti, la loro preparazione parte necessariamente dall'utilizzo di un lievito madre continuamente rinfrescato. Spesso questo impasto acido è comune per tutti i prodotti e viene mantenuto e propagato dalle industrie produttrici utilizzando le stesse condizioni, anche se le produzioni avvengono in diversi periodi dell'anno. Il lievito madre (o impasto acido) è una miscela di acqua e farina fermentata da un microbiota complesso che include LAB (prevalentemente ceppi eterofermentanti), che producono acido lattico, e lieviti fermentativi che producono CO₂ ed etanolo (*Chavan & Chavan, 2011; Gobetti, 1998; Hansen, 2011*). Si tratta di un prodotto contenente microorganismi metabolicamente attivi che può essere miscelato in varie proporzioni ad altri ingredienti per ottenere l'impasto finale (*De Vuys & Neysens, 2005*) con conseguenze sulle caratteristiche organolettiche e reologiche del prodotto da forno (*Arendt et al., 2007; Decock & Cappelle, 2005*). L'impasto acido è tradizionalmente usato nella produzione di prodotti da forno fin dall'antichità. Tuttavia, nell'ultimo secolo in molti casi è stato sostituito dall'utilizzo del lievito commerciale (*Saccharomyces cerevisiae*). Ciò nonostante, l'uso della madre acida rimane l'unica possibilità per ottenere una vasta gamma di prodotti, come il pane di segale, pane francese, crackers e prodotti tradizionali (*Chavan & Chavan, 2011; De Vuyst & Neysen, 2005; Vernocchi et al., 2004*). Per assicurare un'attività adeguata e standardizzata, una madre acida matura è caratterizzata da un rapporto costante tra i costituenti della popolazione microbica, ossia LAB e lieviti. Uno dei principali vantaggi dovuti all'uso dell'impasto acido per la produzione di prodotti da forno è l'incremento del profilo aromatico nel prodotto finale (*Rehman et al., 2006*). L'aroma

dei prodotti derivanti da un impasto acido è il risultato di reazioni enzimatiche, fermentazione e reazioni termiche durante la cottura (*Ravyts & De Vuyst, 2011*). Alcuni dei più importanti componenti dovuti all'uso della madre acida (diacetile, altri carbonili, etilacetato e isoalcoli) sono attribuiti principalmente al metabolismo di LAB e lieviti. Infatti, entrambi questi gruppi microbici possono contribuire alla presenza di un alto valore di 2- e 3-metil-1-butanololo, acido 2-metilpropanolo, acido 3-metilbutanololo e 2-feniletanololo (*Gobetti, 1998; Rehman et al., 2006*). Il significativo incremento nella produzione di molecole volatili in presenza di un microbiota costituito da LAB e lieviti è ben documentato (*Chavan & Chavan, 2011*). *Ravyts & De Vuyst (2011)* hanno dimostrato che il contributo fondamentale del microbiota dell'impasto acido sull'aroma del pane può essere modulato in relazione alla composizione del microbiota stesso. La presenza di molecole volatili nell'impasto acido dipende principalmente dalle attività microbiche, che sono a loro volta influenzate da diversi fattori di processo, tra cui i più importanti sono temperatura e contenuto in acqua (*Hansen, 2011; Hansen & Schieberle, 2005*). L'effetto della temperatura sulla composizione e i rapporti all'interno della popolazione microbica e su alcune caratteristiche organolettiche degli impasti acidi è stato studiato in diversi lavori, come ad esempio quello di *Montanari et al. (2014)*, nel quale è stata effettuata una caratterizzazione del microbiota degli impasti, sui quali sono stati valutati: numero della popolazione microbica di LAB e lieviti, pH, Aw, carboidrati, acidi organici riscontrati e metaboliti volatili.

In questo lavoro mi sono occupato di valutare approfonditamente l'evoluzione della composizione microbica della Colomba nelle diverse fasi del processo produttivo, cercando al contempo di individuare le relazioni fra il microbiota e alcune caratteristiche chimico-fisiche del prodotto.

CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI

3.1. Produzione della colomba

La Colomba è stata prodotta in un'azienda collocata in Emilia Romagna, secondo il processo produttivo aziendale, che comprende diverse fasi tra rinfresco e produzione vera e propria della Colomba stessa. A diversi punti del processo produttivo sono stati prelevati dei campioni, su cui sono state effettuate diverse analisi, al fine di valutare l'evoluzione della popolazione microbica nelle diverse fasi produttive, per metterla poi in relazione con le diverse caratteristiche chimico-fisiche (pH, Aw, acidi organici), e con il profilo in metaboliti volatili.

3.2. Analisi microbiologiche

Per valutare la microflora presente negli impasti ai diversi punti di campionamento, sono stati prelevati circa 10 g di campione e posti in un sacchetto sterile dove sono stati addizionati con soluzione fisiologica sterile (0.9 % di cloruro di sodio) per ottenere una diluizione 1:10. Il tutto è stato omogeneizzato per 2 minuti in Stomacher (modello Lab Blender Seward, London, UK). Si ha così la prima diluizione, da cui si eseguono i prelievi con Gilson e puntali sterili per ottenere le diluizioni decimali successive.

I terreni utilizzati per la determinazione dei microrganismi presenti negli impasti sono stati YPD per i lieviti (il terreno è stato addizionato di cloramfenicolo per inibire lo sviluppo dei batteri) e mMRS per i batteri lattici (il terreno è stato addizionato di cicloesimide per inibire lo sviluppo dei lieviti), preparati secondo le ricette riportate rispettivamente in tabella 1 e 2. Nel caso dei lieviti è stato effettuato un campionamento per spatolamento superficiale e le piastre sono state incubate a 28°C per 72 ore. Per i batteri lattici (LAB) è stato effettuato un campionamento per immersione in doppio strato e le piastre sono state incubate a 32°C per 48 ore.

Tabella 1. Composizione YPD (Yeast Peptone Dextrose).

Peptone	10g/l
Estratto lievito	5g/l
Glucosio	20g/l
Agar	20g/l
Cloramfenicolo (dopo autoclave)	0,2g/l

Tabella 2. Composizione terreno mMRS.

Peptone	10g/l
Lab-Lemco	2g/l
Estratto lievito	7g/l
Glucosio	7g/l
Fruttosio	7g/l
Maltosio	7g/l
Acetato di sodio	5g/l
K ₂ HPO ₄	2,5g/l
MgSO ₄	0,2g/l
MnSO ₄	0,05g/l
FeSO ₄	0,01g/l
Cisteina	1g/l
Tween 80	1ml/l
Agar	20g/l
Cicloesimide (dopo autoclave)	0,5g/l

Aggiustare il pH a 5.6 con acido lattico.

3.3. Determinazione del pH

Per la determinazione del pH 10 g di campione sono stati addizionati con 10 ml di acqua distillata e posti in stomacher (modello Lab Blender Seward, London, UK) per

2 minuti. Ogni campione è stato analizzato in triplo utilizzando il pHmetro Basic 20 (Crison Instruments, Barcellona, Spain).

3.4. Determinazione dell'attività dell'acqua (a_w)

L'attività dell'acqua è stata misurata con un misuratore Aqualab CX3-TE (Labo-Scientifica, Parma, Italy). Ogni campione è stato analizzato tre volte.

3.5. Analisi acidi organici

La concentrazione degli acidi organici è stata determinata mediante HPLC (PU-2089 Intelligent HPLC quaternary pump, UV-VIS multiwavelength detector UV 2070 Plus (Jasco Corp., Tokyo, Japan) con iniettore manuale Rheodyne con ciclo da 20 ml (Rheodyne, Rohnert Park, California, USA). 10 g di campione sono stati addizionati con 40 ml di una soluzione 0.1 N di acido solforico e la miscela è stata omogenizzata per 10 minuti in un Omni Mixer Homogenizer (Omni International, Warrenton, VA, USA). Successivamente, la miscela è stata filtrata con filtri a membrana da 0.22 μ m. La separazione è stata effettuata a 65°C utilizzando una colonna Aminex HPX-87H (Bio-rad Laboratories, Milano, Italy) 300 mm X 7.8 mm, utilizzando come fase mobile una soluzione 0.005M di H₂SO₄ a flusso 0.6 ml/min. Il detector UV è settato ad una lunghezza d'onda 210nm. La durata della corsa è di 35 min.

I picchi cromatografici sono stati identificati comparando i tempi di ritenzione con quelli degli standard e la quantificazione è stata effettuata utilizzando il metodo dello standard esterno.

3.6. Analisi GC-MS-SPME per la determinazione delle molecole volatili

I composti volatili sono stati monitorati utilizzando la tecnica gas-cromatografia abbinata a spettrometro di massa (GC-MS) accoppiata a micro-estrazione in fase solida (SPME). 3 g di campione sono stati posti in vials da 10 ml, sigillati con tappo PTFE e conservati a -18°C fino al momento dell'analisi. Ad ogni campione sono stati aggiunti 10 μ l di una soluzione di 4-metil-2-pentanololo (10000ppm), utilizzato come standard interno.

Al momento dell'analisi, il campione scongelato è stato incubato a 45°C per 10 minuti (condizionamento). Immediatamente dopo la fase di condizionamento le molecole volatili sono state adsorbite mediante l'impiego di una fibra di silice fusa ricoperta da una fase polimerica mista di Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS StableFlex, 50/30 µm, Supelco, Bellefonte, PA, USA). La fibra è stata lasciata esposta allo spazio di testa per 40 minuti sempre a 45°C. I composti volatili adsorbiti sulla superficie della fibra sono stati successivamente desorbiti in colonna per una durata di 10 minuti. Per la separazione, l'identificazione e la quantificazione dei vari metaboliti è stato usato un gascromatografo Agilent Technologies 7890A abbinato ad uno spettrometro di massa 5975C dello stesso produttore. La frammentazione ionica è avvenuta tramite impatto elettronico a 70eV. La colonna capillare impiegata è stata una Chrompack CP-Wax 52 CB (Chrompack, Middelburg, Olanda) avente le seguenti specifiche: lunghezza 50 m, diametro interno 0.32 mm. La programmata di temperature applicata è stata la seguente: 50°C per il primo minuto, un incremento di 4.5°C/minuto sino a 65°C, un aumento di 10°C/min fino a 230°C, permanenza per 25 minuti a tale temperatura. Iniettore e interfaccia sono stati mantenuti a 250°C. Il gas di trasporto utilizzato è stato elio, con un flusso di 1.0 ml/min. Le molecole sono state identificate confrontandone gli spettri di massa con quelli di composti puri contenuti nella libreria NIST 2005.

3.7. Identificazione dei microrganismi isolati

Da ogni campione sono state isolate 48 colonie di LAB e 48 di lieviti, da cui è stato estratto il DNA genomico per la successiva caratterizzazione.

ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DAI BATTERI

Il DNA genomico delle colonie batteriche isolate su piastra è stato estratto mediante InstaGene™ Matrix. Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

- 1) Prelevare la biomassa microbica da piastre fresche e risospenderla in 1mL di acqua bi-distillata sterile.
- 2) Vortexare accuratamente e centrifugare per 5 minuti a 14000 rpm. Rimuovere il surnatante.
- 3) Aggiungere al pellet ottenuto 50 µl di InstaGene™ matrix, vortexare e incubare a 56°C per 30 minuti (agitare la soluzione InstaGene™ matrix per mantenere la matrice in sospensione).
- 4) Vortexare ad elevata velocità per 10 secondi. Porre per 8 minuti le eppendorf alla temperatura di 100 °C.
- 5) Vortexare ad elevata velocità per 10 secondi.
- 6) Conservare i campioni a -20°C.
- 7) Al momento dell'uso: scongelare i campioni, vortexare accuratamente e centrifugare per 5 minuti a 12000 rpm.

ESTRAZIONE DEL DNA GENOMICO DAI LIEVITI

L'estrazione del DNA genomico da lievito prevede l'utilizzo di un protocollo costituito dai seguenti passaggi:

- 1) Prelevare la biomassa microbica a partire da piastre fresche e risospenderla in 1 mL di acqua bi-distillata sterile.
- 2) Centrifugare per 1 minuto a 16.000 rpm e scaricare il surnatante.
- 3) Risospendere le cellule in 100 µL di soluzione di LiOAc 200mM con SDS 1%.
- 4) Incubare a 70°C per 5 minuti.
- 5) Aggiungere 300 µL di etanolo 96% e risospendere bene le cellule.
- 6) Centrifugare per 3 minuti a 16000 rpm.
- 7) Scaricare il surnatante.
- 8) Lavare il pellet con 500 µL di etanolo al 75%. Assicurarsi di eliminare completamente il residuo di etanolo.
- 9) Risospendere il pellet ottenuto in 50 µl di buffer TE pH8.
- 10) Spin down per 15 sec a 16.000 rpm

CARATTERIZZAZIONE DEI BIOTIPI MEDIANTE RAPD-PCR

La RAPD-PCR (Randomly Amplified Polymorphic DNA-PCR) permette l'amplificazione di frammenti di DNA genomico mediante l'utilizzo di un singolo primer costituito da 8-12 nucleotidi, fornendo un fingerprint caratterizzante il ceppo in modo specifico.

Per la tipizzazione dei ceppi di LAB e lieviti isolati sono stati utilizzati i primer M13-RAPD (5' -GAGGGTGGCGGTTCT- 3'), in una mix di PCR composta da: 10X Dream Taq Green Buffer (con MgCl₂ 2mM) 1.5 µL, dNTP mixture (10mM) 0.15 µL, 10X Dream Taq (2mM) 0.15 µL, primer M13 (2 µM) 3.75 µL, ddH₂O sterile 6.45 µL e DNA genomico 3 µL.

Il volume finale di ciascuna reazione è di 15 µL, processati tramite il seguente termociclo:

	TEMPERATURA	TEMPO	CICLO
DENATURAZIONE	94°C	2 minuti	1
ANNEALING	94°C	1 minuto	
	34°C	1 minuto	45
	72°C	2 minuti	
ESTENSIONE	72°C	7 minuti	1

Terminata l'amplificazione del DNA è stata eseguita la corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, in tampone TAE (ottenuto diluendo una soluzione stock di TAE 50X: 242 g di Tris base, 57.1 ml di acido acetico glaciale, 100 ml di 0.5 M EDTA pH 8.0, ddH₂O a volume fino a 1 litro).

La corsa elettroforetica avviene a voltaggio costante (160 V, supplier Power PAC) per 5 ore. Il marcatore di peso molecolare utilizzato è GeneRuler DNA Ladder Mix (100-10000 bp). Successivamente il gel è stato colorato per 30 minuti in una soluzione di bromuro di etidio (0.5 mg/ml), decolorato per 30 minuti in ddH₂O, quindi osservato al Gel Doc™ XR+ BIORAD.

I profili sono stati clusterizzati mediante il software GeneDirectory e un campione

per ogni biotipo è stato caratterizzato tassonomicamente tramite sequenziamento.

ATTRIBUZIONE TASSONOMICA DEGLI ISOLATI

Per i batteri lattici è stata effettuata una PCR preparativa amplificando la porzione del gene codificante la subunità 16SrRNA mediante la coppia di primer:

- Forward 16S 500f (5' – TGGAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3')
- Reverse 16S 500r (5' – TACCGCGGCTGCTGGCAC – 3').

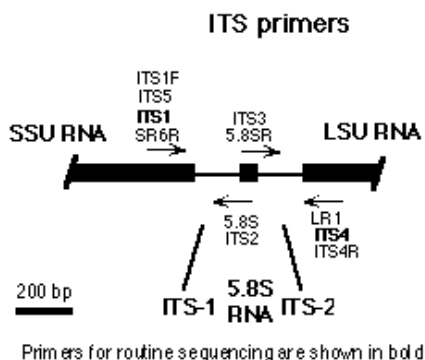
La mix di PCR era costituita da: 25 µL 2X PCR Master Mix, 5 µL primer F (2 µM), 5 µL primer R (2 µM), 13 µL ddH₂O sterile, 1 µL DNA stampo.

Il volume finale di ciascuna reazione è 50 µL, processati tramite il seguente termociclo:

	TEMPERATURA	TEMPO	N° CICLI
DENATURAZIONE	94°C	3 minuti	1
	94°C	30 secondi	
ANNEALING	58°C	30 secondi	35
	72°C	30 secondi	
ESTENSIONE	72°C	7 minuti	1

Terminata l'amplificazione del DNA è stata eseguita la corsa elettroforetica su gel di agarosio all'1%, in tampone TAE. La corsa elettroforetica avviene a voltaggio costante (85 V) per 45 minuti. Successivamente il gel è stato colorato per 30 minuti in una soluzione di bromuro di etidio (0.5 mg/mL), decolorato per 30 minuti in ddH₂O e quindi osservato al Gel Doc™ XR+ BIORAD®.

Per i lieviti l'attribuzione tassonomica dei ceppi rappresentativi di ciascun cluster è stata eseguita mediante sequenziamento della porzione codificante gli Internal Transcribed Spacer 1 e 2 (ITS1 e l'ITS2) e dell'rRNA 5,8S.



Le sequenze da amplificare sono state processate mediante PCR utilizzando i primer:

- forward ITS1 (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG - 3')

- reverse ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC - 3').

La mix di PCR era costituita da: 75 µL 2X PCR Master Mix, 15 µL primer ITS1 (2 µM), 15 µL primer ITS2 (2 µM), 25 µL ddH₂O sterile, 20 µL DNA stampo.

Il volume finale di 150 µL viene processato tramite il seguente termociclo:

	TEMPERATURA	TEMPO	CICLO
DENATURAZIONE	95°C	5 minuti	1
	95°C	1 minuti	
ANNEALING	60°C	1 minuti	30
	72°C	1 minuti	
ESTENSIONE	72°C	7 minuti	1

Il campione amplificato è stato separato su gel di agarosio all'1,5 % in buffer TAE.

Le bande sono state visualizzate con il Gel DocTM XR+ BIORAD®.

Il DNA ottenuto è stato purificato e l'attribuzione tassonomica è stata compiuta allineando le sequenze ottenute tramite algoritmo BLAST coi 16SrRNA disponibili in banca dati.

CAPITOLO 4: RISULTATI

La produzione della colomba è un processo complesso che richiede diversi passaggi e diverse ore prima di giungere alla cottura. In prima approssimazione si può dividere in due parti. Da un lato il processo di propagazione dell'impasto madre e dall'altra parte la fase di lievitazione vera e propria. Queste due fasi hanno però un punto in comune come si evince dalla figura 1. In particolare, la madre matura viene rinfrescata con acqua e farina e lasciata fermentare per 4 ore a circa 26°C (I° rinfresco); in seguito viene fatto un secondo rinfresco, aggiungendo nuovamente acqua e farina e lasciando fermentare per altre 4 ore a 26°C. Immediatamente dopo il II° rinfresco, una parte della madre viene prelevata e mantenuta a 13°C per 15 ore per la successiva propagazione mentre la restante parte continua a fermentare a 26°C per le successive 4 ore. L'impasto ottenuto dal secondo rinfresco entra nel processo produttivo vero e proprio (temperatura 20-24°C), nel quale vengono aggiunti gli altri ingredienti. Nel primo impastamento vengono aggiunti farina, acqua e latte in polvere dopodiché, dopo due ore di riposo, nel secondo impastamento vengono addizionati farina, acqua, burro, uova intere, saccarosio e lievito commerciale. L'impasto viene lasciato riposare 45 minuti a temperatura ambiente, per poi aggiungere gli ultimi ingredienti (farina, acqua, burro, aromi, sale, uova intere, mono- e di-gliceridi, saccarosio, canditi di agrumi). Il prodotto così ottenuto (III° impasto) viene porzionato negli appositi contenitori, i pirottini, e lasciato lievitare a temperatura ambiente per 7 ore e 45 minuti. Subito dopo tale processo, avverrà la fase di glassatura. Infine, la colomba viene cotta e poi raffreddata sottovuoto, in modo da accelerare il processo di raffreddamento.

Per quel che riguarda le proporzioni impasto madre/altri ingredienti, ipotizzando di partire ad esempio da 1 kg di madre, nel I° rinfresco l'impasto, addizionato di acqua e farina, raggiunge un peso di 3,84 kg, per poi subire un incremento proporzionale con il II° rinfresco (peso finale 14,75 kg). Una volta entrato nel processo produttivo, l'aggiunta degli altri ingredienti porta il peso a 38,34 kg nel I° impasto, 124,05 kg nel II° per poi raggiungere il peso finale di 428,37 kg dopo il terzo impastamento.

La percentuale di madre acida matura utilizzata all'inizio della produzione è circa 4.2 g/100 g di impasto prima della cottura. L'intero processo produttivo, dal primo rinfresco alla cottura della colomba, dura circa 19 ore.

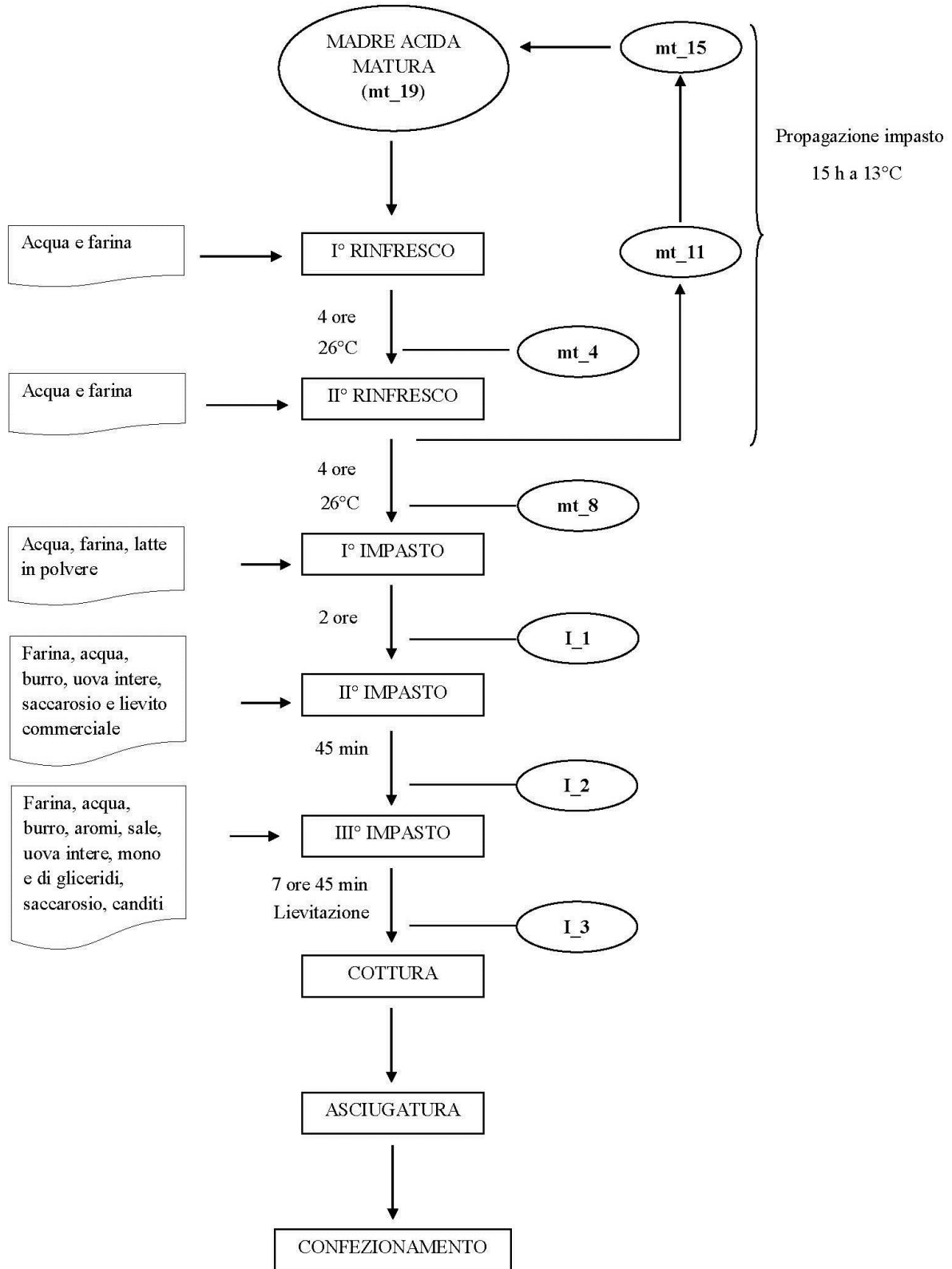


Figura 1. Processo produttivo della colomba.

Lo studio delle caratteristiche microbiologiche della Colomba durante la sua produzione hanno interessato 8 diversi punti di campionamento, che sono stati scelti lungo tutto il processo produttivo, dal rinfresco della madre alla fine della lievitazione della Colomba. In particolare i campioni sono stati così definiti:

- mt_4: madre acida dopo il primo rinfresco e fermentazione (4 ore a 26°C),
- mt_8: madre acida dopo il secondo rinfresco e fermentazione (ulteriori 4 ore a 26°C)
- mt_11: madre acida prelevata dopo 11 ore dal primo rinfresco durante la propagazione a 13°C;
- mt_15: madre acida prelevata dopo 15 ore dal primo rinfresco durante la propagazione a 13°C
- mt_19: madre acida prelevata dopo 19 ore dal primo rinfresco, maturata a 13°C e pronta per subire il primo rinfresco;
- I_1: impasto dopo la prima fase di impastamento e lievitazione (2 ore)
- I_2: impasto dopo la seconda fase di impastamento e riposo (45 min)
- I_3: impasto dopo impastamento finale e lievitazione (7 ore e 45 min)

Tutti i punti di campionamento sono indicati nello schema produttivo in figura 1.

4.1 Analisi del pH e Aw e conteggio della popolazione microbica

In tabella 1 sono riportati i dati di pH, Aw, conteggi di lieviti e LAB dei vari punti di campionamento. Come si può osservare dalla tabella, e ancor meglio dall'evoluzione riportata in figura 2, il valore del pH della madre è piuttosto basso (3,55) e costante. Tale valore di si innalza leggermente (anche per effetto della diluizione) nel primo e nel secondo rinfresco (raggiungendo valori di 3,75 e 3,64, rispettivamente), mentre cresce in maniera più drastica nei vari impasti, risultante infatti 5,37 nel prodotto lievitato immediatamente prima della cottura.

	Produzione della Colomba					Maturazione Madre Acida		
	m_t4	m_t8	I1	I2	I3	m_t11	m_t15	m_t19
pH	3,75 (±0.01)	3,64 (±0.04)	3,89 (±0.02)	4,41 (±0.03)	5,37 (±0.01)	3,55 (±0.01)	3,57 (±0.01)	3,55 (±0.01)
Aw media	0,990 (±0.001)	0,986 (±0.001)	0,990 (±0.001)	0,982 (±0.002)	0,896 (±0.001)	0,986 (±0.001)	0,985 (±0.002)	0,985 (±0.001)
Lieviti (log ufc/g)	7,04 (±0.03)	7,00 (±0.09)	7,10 (±0.05)	7,70 (±0.11)	7,80 (±0.06)	6,87 (±0.09)	7,17 (±0.12)	7,03 (±0.07)
LAB (log ufc/g)	8,20 (±0.09)	8,51 (±0.13)	6,73 (±0.16)	4,45 (±0.06)	4,31 (±0.09)	8,04 (±0.11)	8,76 (±0.10)	8,59 (±0.03)

Tabella 1. Risultato delle analisi del pH, Aw e conteggi microbici dei campioni prelevati alle diverse fasi del processo produttivo.

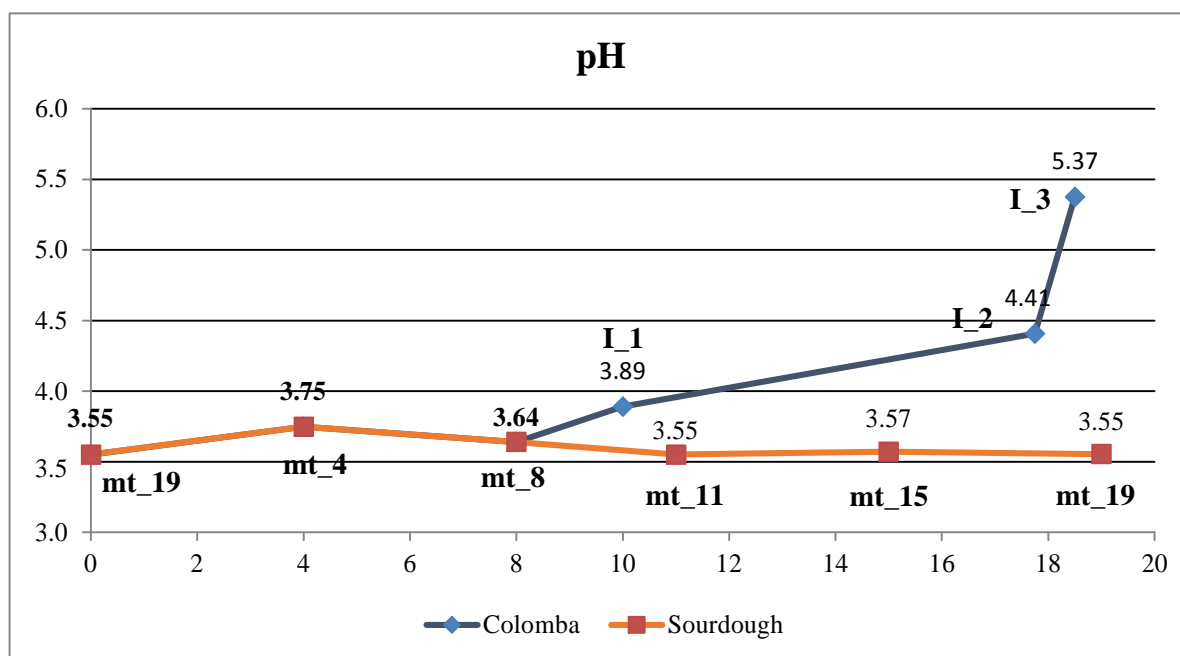


Figura 2. Andamento del pH dell'impasto all'interno del processo produttivo

L'Aw rimane sempre superiore a 0.980 in tutta la fase di propagazione della madre mentre diminuisce, anche considerevolmente, durante la lievitazione fino a raggiungere un valore di 0.900 prima della cottura. Questa variazione può essere imputata da un lato sicuramente all'aggiunta di alcuni ingredienti che hanno un ruolo sull'acqua, come il saccarosio, uova e derivati, dall'altro tuttavia non è da dimenticare che anche l'etanolo prodotto dai lieviti contribuisce all'abbassamento del valore di Aw.

Per quanto concerne i conteggi relativi a lieviti e LAB si può osservare come la carica dei lieviti sia nell'ordine di 7 log cfu/gr nella madre mentre aumenti di quasi un ciclo logaritmico nel momento in cui viene aggiunto *S. cerevisiae* sotto forma di lievito commerciale durante il secondo impastamento. Maggiori, invece, sono le cariche cellulari osservate nella madre per i LAB, presenti al termine della maturazione in concentrazioni di 8.6 circa log cfu/gr. I LAB diminuiscono drasticamente già a partir dal prelievo I_1 per raggiungere concentrazioni di poco superiori a 4 log cfu/gr in I_2 e I_3. Questa diminuzione indubbiamente è il risultato della scarsa competitività dei microrganismi appartenenti a questo gruppo microbico verso *S. cerevisiae* quando questo viene inoculato ad elevate concentrazioni.

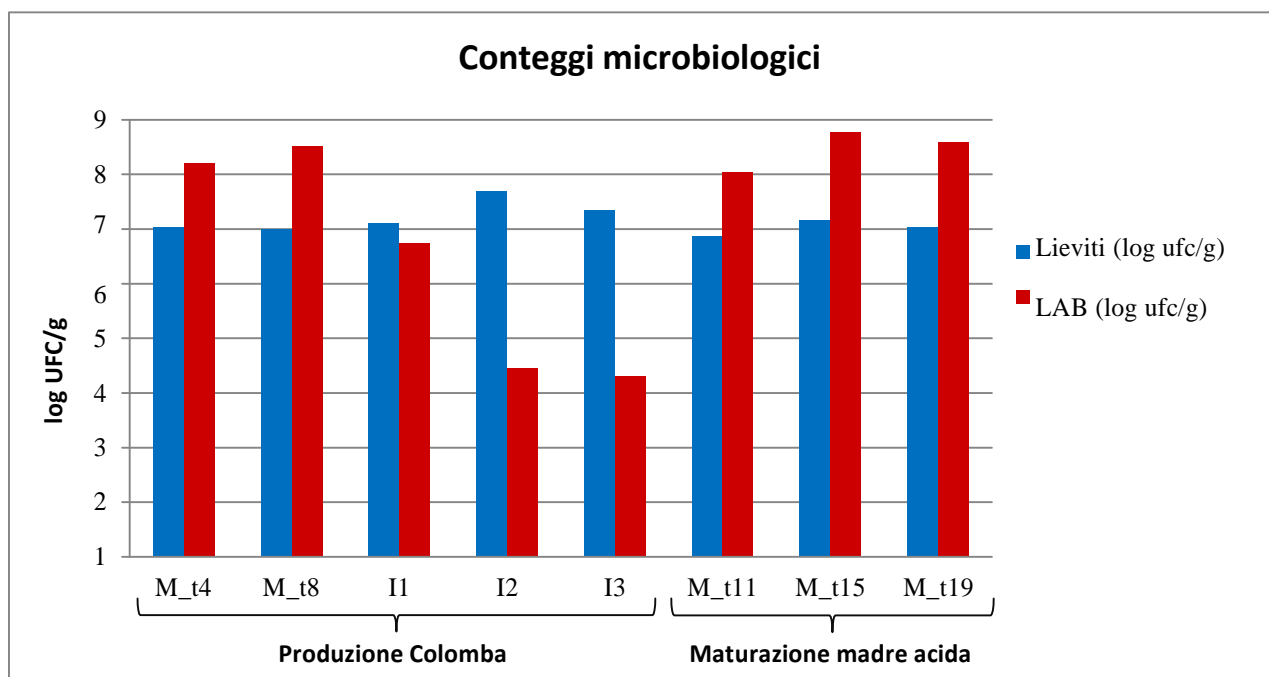


Figura 3. Grafico relativo ai conteggi dei lieviti e LAB presenti nei campioni prelevanti.

4.2 Concentrazione degli acidi organici

Per quanto riguarda la concentrazione di acidi organici rilevati nei campioni (tabella 2), escludendo l'acido ossalico e l'acido succinico presenti in quantità ridotte, i principali acidi organici presenti sono, come atteso, l'acido lattico e l'acido acetico,

entrambi prodotti prevalentemente dal metabolismo dei LAB. Il quoziente di fermentazione, ossia il rapporto tra le quantità di acido lattico e acetico, risulta essere piuttosto costante attorno ai valori di 12; notiamo un abbassamento solo nei campioni I_2, dove risulta essere 7.28, e nell'impasto a fine lievitazione I_3, dove ha un valore di 2.99. Per quanto riguarda l'acido lattico, nella madre aumenta in tutte le fasi di maturazione raggiungendo dei valori di quasi 13 g/kg. Nel prelievo mt_4 diminuisce a circa 9 g/kg per un effetto di diluizione e tende a salire raggiungendo circa 12 g/kg nel campione mt_8. Da questa fase in poi vediamo una costante diminuzione del contenuto in acido lattico facilmente spiegabile con un effetto di diluizione da un lato, e con il crollo del numero dei LAB presenti dall'altro. Analoghe considerazioni si possono fare per l'acido acetico, che raggiunge una concentrazione superiore a 0.60 g/kg nella madre matura (mt_19) e nell'mt_8, diminuendo invece nella lievitazione vera e propria, sia pure in proporzioni minori rispetto a quanto osservato per l'acido lattico. Quest'ultima osservazione è spiegabile con il fatto che il lievito *S. cerevisiae* può produrre acido acetico, sia pure in quantità decisamente minore ai LAB.

	Produzione della Colomba					Maturazione Madre Acida		
	m_t4	m_t8	I1	I2	I3	m_t11	m_t15	m_t19
Acido lattico DL	8,77 (±0.12)	11,78 (±0.14)	8,05 (±0.07)	3,36 (±0.02)	1,11 (±0.01)	8,81 (±0.03)	10,79 (±0.19)	12,83 (±0.02)
Acido acetico	0,46 (±0.01)	0,61 (±0.01)	0,57 (±0.02)	0,31 (±0.01)	0,25 (±0.01)	0,47 (±0.02)	0,53 (±0.03)	0,65 (±0.03)
Acido ossalico	0,08 (±0.01)	0,09 (±0.01)	0,08 (±0.01)	0,05 (±0.01)	0,03 (±0.01)	0,08 (±0.01)	0,09 (±0.01)	0,10 (±0.00)
Acido succinico	0,09 (±0.01)	0,10 (±0.02)	0,36 (±0.02)	0,24 (±0.01)	0,37 (±0.01)	0,10 (±0.01)	0,10 (±0.01)	0,12 (±0.02)
QF	12,80	12,90	9,41	7,28	2,99	12,44	13,47	13,18

Tabella2. Concentrazione degli acidi organici (espressi come g/kg) e quoziente di fermentazione (QF) nei campioni prelevati nelle diverse fasi del processo produttivo.

4.3 Profilo aromatico

In tabella 3 è riportata la composizione delle sostanze aromatiche nelle varie fasi produttive della colomba. I dati sono espressi come rapporto fra le aree dei diversi picchi e l'area dello standard intero (4-metil-2-pentanololo).

	Produzione della Colomba					Maturazione Madre Acida		
	M_t4	M_t8	I1	I_2	I_3	M_t11	M_t15	M_t19
4-Metil-2-pentanone	3,18	3,14	2,97	2,85	0,79	2,47	3,21	2,68
4-Metil-3-penten-2-one	0,62	0,74	0,73	0,84	0,00	0,77	0,70	0,58
2-eptanone	0,00	0,00	0,00	1,55	0,15	0,00	0,00	0,00
2-octanone	0,18	0,03	0,23	0,18	2,24	0,04	0,06	0,06
3-idrossi, 2-butanone	0,00	0,00	0,00	1,18	22,93	0,00	0,00	0,00
Chetoni	3,98	3,90	3,93	6,60	26,87	3,28	3,97	3,33
acetaldeide	0,00	0,00	0,00	0,00	11,63	0,00	0,00	0,00
3-metil, butanale	0,00	0,00	0,00	1,60	1,63	0,00	0,00	0,00
esanale	12,59	8,67	5,36	1,80	0,00	8,28	8,63	10,50
octanale	0,27	1,35	0,52	0,00	0,00	1,30	0,64	0,41
nonale	0,97	2,25	1,66	0,71	1,25	2,16	1,37	1,39
decanale	0,00	0,86	0,00	0,00	19,86	1,27	1,18	0,00
benzaldeide	0,00	0,00	0,00	1,31	0,45	0,00	0,00	0,00
benzacetaldide	0,00	0,00	0,00	1,50	0,45	0,00	0,00	0,00
Aldeidi	13,83	13,13	7,55	6,93	35,28	13,01	11,83	12,30
alcol etilico	90,63	111,65	118,93	125,19	134,21	107,23	103,53	130,52
1-propanolo	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	0,00	0,00	0,00
2-metil-1-propanolo	0,00	1,93	1,47	3,68	3,11	1,86	1,77	1,93
3-metil-1-butanolo	12,89	19,28	16,56	15,00	7,46	15,68	18,31	28,88
1-pentanolo	0,83	0,78	0,88	0,42	0,00	0,84	0,87	0,99
1-esanolo	7,61	6,64	14,67	5,64	1,02	6,55	6,90	0,00
1-octen3-olo	1,44	1,19	2,27	1,25	0,00	1,77	1,58	1,74
alcol benzilico	0,00	0,00	0,00	0,00	1,07	0,00	0,00	0,00
alcol feniletico	3,18	4,48	3,17	9,36	5,88	2,24	2,89	3,11
Alcoli	116,56	145,96	157,95	160,53	156,22	136,17	135,84	167,16
etilacetato	76,80	92,51	93,12	47,00	8,25	75,38	76,60	93,37
4-metil, 2-pentilacetato	2,81	2,37	3,51	1,59	0,00	2,63	2,22	2,38
1-butanol, 3-metilacetato	5,37	8,42	6,14	3,95	0,00	4,51	5,94	7,47
acido esanoico, estere etilico	1,44	1,73	1,91	3,50	0,00	1,50	1,52	1,88
acido acetico, estere esilico	0,47	0,50	0,84	0,00	0,00	0,51	0,41	0,66
acido propionico, 2-idrossi, estere etilico	5,69	8,45	0,00	0,00	0,00	8,21	8,47	20,11
acido octanoico, etil estere	0,00	0,00	0,26	0,84	1,03	0,00	0,00	0,00
Lattato isoamilico	0,00	0,69	0,00	0,00	0,00	0,00	1,09	1,51
Esteri	92,58	114,67	105,79	56,86	9,27	92,74	96,25	127,38
acido acetico	23,36	27,76	36,46	11,17	4,37	27,93	26,86	29,55
Acidi	23,36	27,76	36,46	11,17	4,37	27,93	26,86	29,55

Tabella 3. Profilo aromatico dei campioni prelevati durante il processo produttivo della Colomba.

Si possono evidenziare due fasi con composizioni molto diverse a seconda che nell'impasto prevalga il lievito madre o il *S. cerevisiae* aggiunto da I_2 in poi. Va precisato che dalla tabella sono stati esclusi in I_3 tutti quei picchi (prevalentemente terpeni e terpenoidi) che derivano dalla aggiunta dei canditi. Nei campioni dove prevale l'attività del lievito madre i composti più rappresentativi sono alcol etilico, acetato di etile, acido acetico, 3-metil-1-butanololo (alcol isoamilico) ed esanale, seguiti in misura minore da esteri quali 3-metil-1-butanololo acetato (acetato di isoamile), acido 2-idrossi propanoico etil estere (etil-lattato) e 4-metil, 2-pentil acetato (metil-isoamil-acetato). Ovviamente la concentrazione di queste sostanze risulta particolarmente elevata nella madre matura e in mt_8. Molti di questi composti sono attribuiti prevalentemente all'attività dei LAB, come l'acido acetico, l'acido lattico e i relativi esteri. E' infatti nota l'attività esterasica sia dei batteri lattici che dei lieviti. Le origini dell'esanale sono più difficilmente ascrivibili ad un gruppo particolare e potrebbero anche derivare dall'attività lipossigenasica delle farine (assieme alle altre aldeidi che si formano). Altre sostanze sono invece prodotte con ogni probabilità dalle attività dei componenti dei lieviti nell'impasto acido, come alcol isoamilico e metil-propanolo (e relativi esteri) e anche l'alcol feniletilico. L' 1-esanololo, risultato della riduzione dell'esanale, può essere dovuto all'azione dell'alcol deidrogenasi dei lieviti e dei LAB eterofermentanti. Nel momento in cui viene aggiunto *S. cerevisiae* (campioni I_2 e I_3) il quadro aromatico cambia drasticamente, soprattutto al termine della fermentazione (I_3), come si può osservare nelle figure 4 e 5, dove sono riportate le concentrazioni delle diverse classi di molecole, in modo cumulativo (figura 4) o separate per singola classe (figura 5). In generale l'aggiunta di *S. cerevisiae* comporta un aumento cospicuo della presenza di aldeidi e chetoni; la concentrazione degli alcoli aumenta soprattutto in seguito all'incremento di alcol etilico, mentre si osserva una notevole riduzione della concentrazione di acidi (rappresentati esclusivamente dall'acido acetico) e soprattutto di esteri quali acetato di etile e lattato di etile (figura 6). Inoltre, assumo ruoli rilevanti composti assenti nelle fasi precedenti, tra cui acetoino, decanale, acetaldeide, isobutanololo. La presenza di acetoino può essere sicuramente imputata all'aggiunta di

burro nelle fasi I_2 e I_3, anche se l'elevata quantità osservata in I_3 può essere messa in correlazione all'attività del lievito commerciale che è in grado di produrre tale molecola; così come è ascrivibile prevalentemente all'attività di *S. cerevisiae* l'elevata concentrazione di acetaldeide e alcol feniletilico. Le origini dell'elevata presenza di decanale sono invece difficilmente attribuibili: infatti, tale molecola può essere sia frutto dell'attività del *S. cerevisiae*, come anche dal risultato di attività enzimatiche che interessano la parte lipidica introdotta con il burro ma anche con le uova.

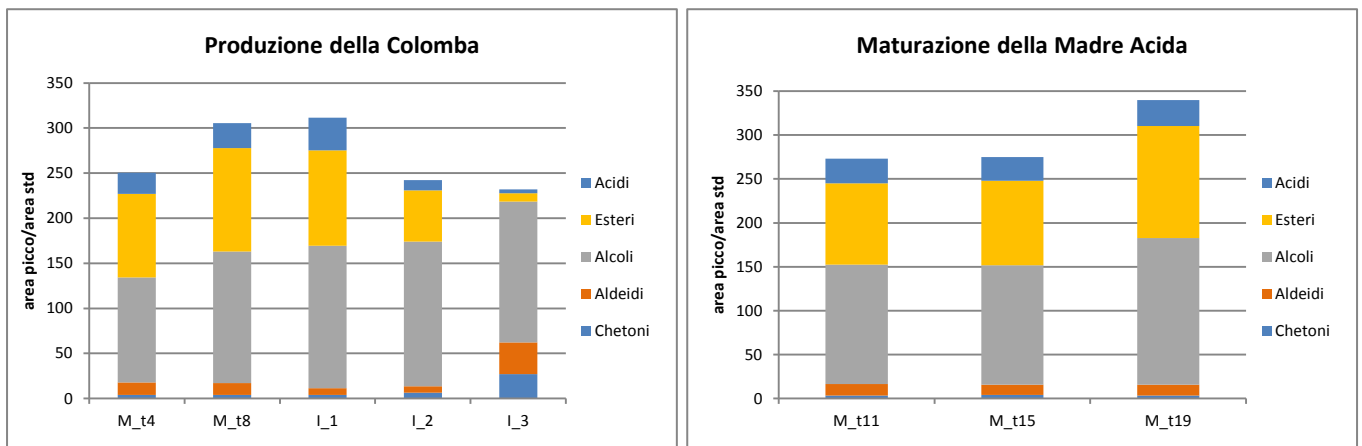


Figura 4. Concentrazione delle diverse classi di molecole (espressa come rapporto fra area del picco e area dello standard interno) rilevate nei campioni prelevati durante il processo produttivo della Colomba

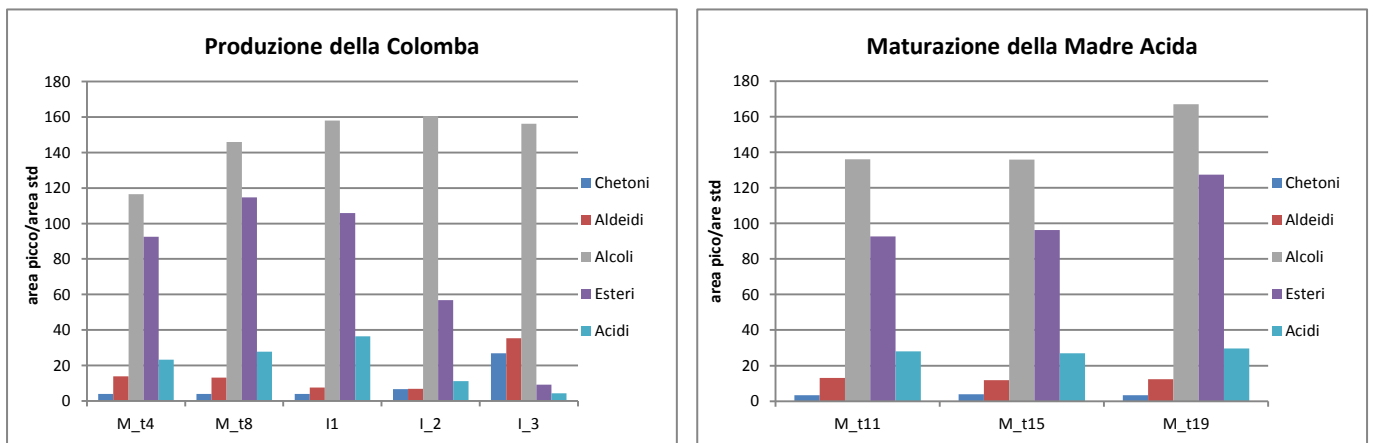


Figura 5. Concentrazione delle diverse classi di molecole (espressa come rapporto fra area del picco e area dello standard interno) rilevate nei campioni prelevati durante il processo produttivo della Colomba

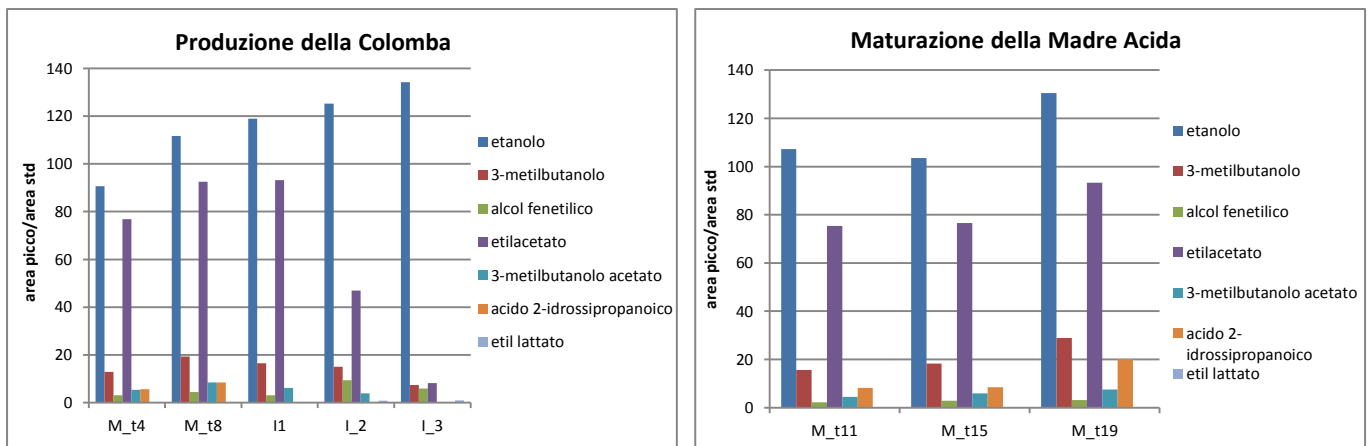


Figura 6. Evoluzione di alcune molecole di interesse (esprese come rapporto fra area del picco e area dello standard interno) rilevate nei campioni prelevati durante il processo produttivo della Colombara

4.4 Biotipi di LAB e lieviti

In una fase successiva del lavoro, in collaborazione con il laboratorio di Chimica delle Fermentazioni e Biotecnologie Microbiche del Dipartimento di “Scienza della vita” dell’Università degli studi di Modena - Reggio Emilia, sono state iniziate le indagini per approfondire la caratterizzazione dei microorganismi responsabili delle caratteristiche del lievito madre e del processo di lievitazione. Dalle piastre utilizzate per effettuare i conteggi nei vari punti di campionamento durante la produzione sono stati isolati circa 250 ceppi. Gli isolati sono stati sottoposti a RAPD-PCR la quale ha messo in evidenza una popolazione nella madre piuttosto omogenea.

Per quel che riguarda i LAB, infatti, anche se spesso i lavori ecologici riguardanti gli impasti acidi riportano un’ampia biodiversità all’interno della stessa madre, in questo caso i risultati relativi agli isolati hanno indicato la presenza di una sola specie come responsabile dell’attività dei LAB, in particolare *L. sanfranciscensis* peraltro presente, secondo i dati della RAPD-PCR, in due soli biotipi. La biodiversità nei LAB (figura 7) risulta molto più ampia nei campioni al termine della lievitazione, dove il numero di batteri lattici era molto ridotto (circa 4 log ufc/gr): infatti, nell’impasto denominato I_3, corrispondente al prodotto a fine lievitazione, non sono stati riscontrati i LAB presenti nella madre, ma al contrario è stata messa in evidenza la presenza di una popolazione

eterogenea costituita da *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus durans*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc citreum*, *Pediococcus pentosaceus*, *Streptococcus macedonicus*, *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus durans*. L'origine di tali microrganismi è presumibilmente da imputare ai vari ingredienti che sono stati aggiunti nelle varie fasi dell'impasto prima della lievitazione finale.

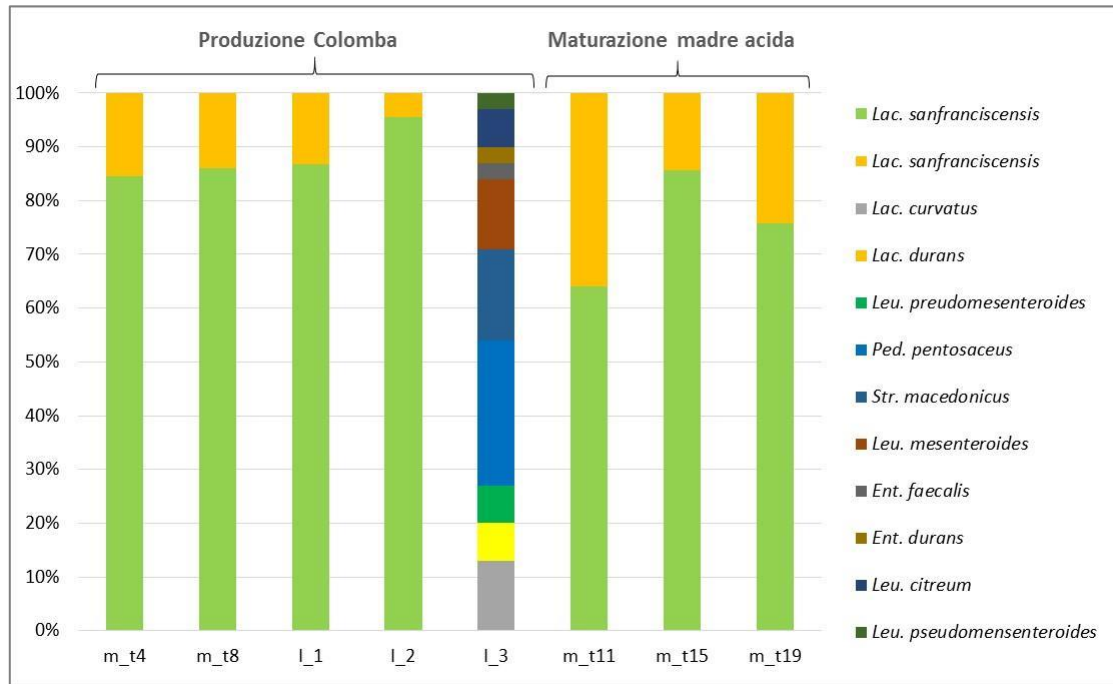


Figura 7. Frequenza relativa dei biotipi di LAB isolati nei diversi campioni durante la produzione della Colomba.

Per quel che riguarda i lieviti, anche in questo caso i risultati ottenuti hanno mostrato una popolazione piuttosto omogenea, poiché la specie dominante nella madre acida è risultata essere *Torulaspora delbrueckii*. Infatti, come si può osservare in figura 8, solo nel campione m_t8 è stata riscontrata, seppure con una frequenza relativa molto bassa (7%), la specie *Candida humilis*. Il lievito *T. delbrueckii* tende poi a scomparire durante il processo produttivo, per effetto dell'aggiunta degli altri ingredienti (e soprattutto del lievito commerciale), e la specie dominante risulta essere *Saccharomyces cerevisiae*.

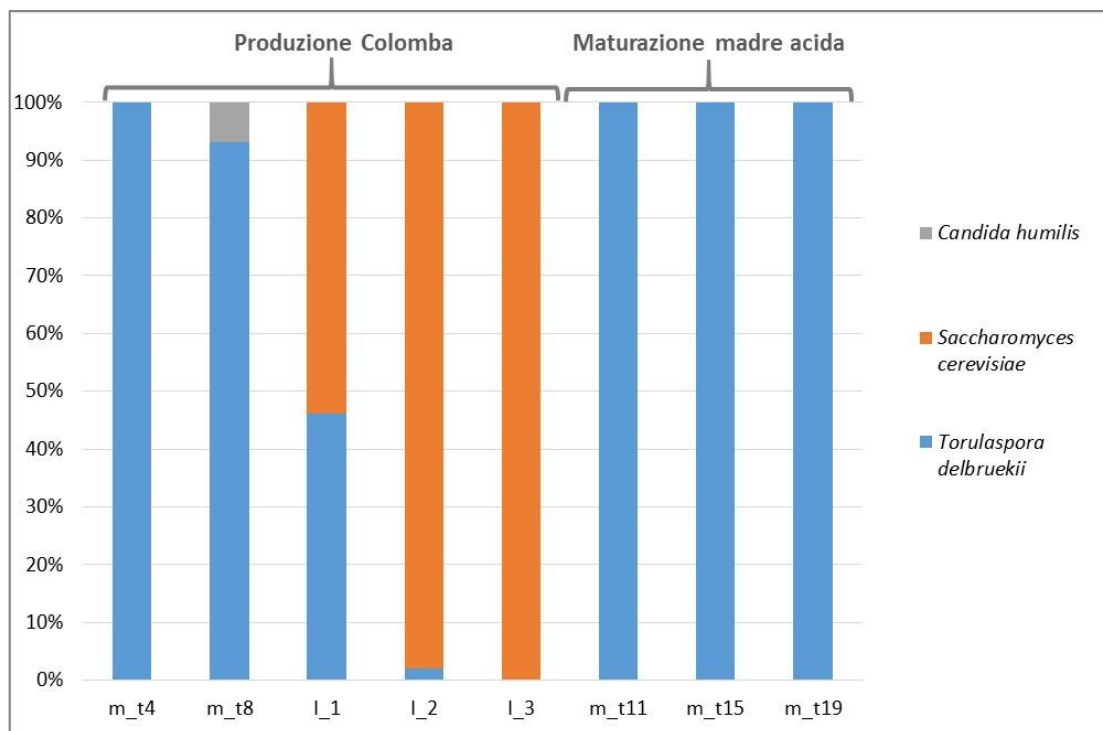


Figura 8. Frequenza relativa dei biotipi di lieviti isolati nei diversi campioni durante la produzione della Colomba.

CAPITOLO 5: CONCLUSIONI

Il lavoro di caratterizzazione del microbiota del prodotto da ricorrenza Colomba, effettuato nelle diverse fasi del processo produttivo, ha mostrato come l'impasto madre, continuamente propagato all'interno dell'azienda, sia caratterizzato da una bassa biodiversità, in termini sia di LAB che di lieviti. Infatti, i microorganismi dominanti risultano essere due biotipi della specie *L. sanfranciscensis* e, per quel che riguarda i lieviti, un solo biotipo della specie *T. delbrueckii*, con la comparsa di *C. humilis* solo in un campione, e comunque con una frequenza relativa molto bassa. La dominanza del lievito *T. delbrueckii* è abbastanza inusuale per questo tipo di prodotto, anche se la specie è già stata riscontrata in impasti acidi di grano, mais e riso (Almeida & Pais, 1996; Ottogalli et al., 1996). Infatti, un lavoro precedente condotto da Vernocchi et al. (2004) su una madre utilizzata per lo stesso tipo di prodotto da forno aveva riportato come specie prevalenti *S. cerevisiae* (derivante anche dall'aggiunta di lievito industriale nelle fasi secondarie del processo produttivo) e *C. milleri*. Quest'ultima, inoltre, era presente nella madre acida con un'ampia biodiversità (almeno 6 diversi biotipi). Risultati simili sono stati ottenuti su due impasti acidi utilizzati per la produzione di Panettone e dei biscotti del Lagaccio, un dolce tipico genovese (Venturi et al., 2012). Un lavoro effettuato su 20 impasti acidi utilizzati per la produzione del pane nella regione Abruzzo (Valmorri et al., 2010) ha mostrato come la specie *T. delbrueckii* rappresentasse solo l'1% degli isolati, mentre il resto della popolazione era rappresentato da *S. cerevisiae* (85%), *C. milleri* (11%) e *C. krusei* (2.5%).

Risultati simili a quelli ottenuti nel presente studio sono stati riportati da Paramithiotis et al. (2010), che hanno analizzato il microbiota di 5 impasti acidi spontanei (ossia senza aggiunta di starter commerciali) di due diverse regioni della Grecia. Anche nel loro caso, infatti, il lievito predominante era *T. delbrueckii*, con una sporadica presenza di *S. cerevisiae*. È interessante inoltre osservare come alcuni ceppi isolati da Paramithiotis et al. (2010) mostrassero buone caratteristiche di resistenza al

congelamento e allo stress osmotico, aprendo interessanti prospettive per la loro applicazione a livello industriale.

Per quel che riguarda l'evoluzione del microbiota durante il processo produttivo, l'aggiunta del lievito commerciale altera significativamente i rapporti tra LAB/ lieviti. Infatti, mentre nella madre il carico cellulare dei LAB è di almeno un ciclo logaritmico superiore ai lieviti, durante le fasi di impastamento i primi si riducono drasticamente, mentre i lieviti rimangono a concentrazioni di 7-8 log UFC/g. Questa variazione si riflette sulle caratteristiche chimico-fisiche degli impasti, soprattutto in termini di maggiori valori di pH e ridotto contenuto di acido lattico. Ovviamente, l'aggiunta di *S. cerevisiae* e la successiva lievitazione incidono significativamente anche sul profilo aromatico del prodotto, in termini di riduzione di acidi (acido acetico) e di esteri ed aumento di molecole quali etanolo, alcol fenilico, acetaldeide ed acetoino, derivanti dall'attività del lievito commerciale.

BIBLIOGRAFIA

- **Almeida M.J., Pais C.S.** (1996). Characterization of the yeast population from traditional corn and rye bread doughs. *Letters in Applied Microbiology*, 23, 154-158.
- **Annan N.T., Poll L., Sefa-Dedeh S., Plahar W.A., Jakobsen M.** (2003). Volatile compounds produced by *Lactobacillus fermentum*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida krusei* in single starter culture fermentations of Ghanaian maize dough. *Journal of applied Microbiology*, 94, 462-474.
- **Barber S., Benedito de Barber C., Martinez-Anaya M.A., Martinez J., Alberola J.** (1985). Cambios en los acidos organicos volatiles C2-C5 durante la fermentacion de masas panarias preparados con masas madre comerciales y con cultivos puros de microorganismos. *Agroquim Technol Aliment*, 25, 223-232.
- **Böcker, G., Stolz, P., Hammes, W.P.** (1995). Neue Erkenntnisse zum Ökosystem Sauerteig und zur Physiologie der sauerteigtypischen Stämme *Lactobacillus sanfrancisco* und *Lactobacillus pontis*. *Getreide Mehl. Brot.*, 49, 370-374.
- **Brummer J.M., Loren K.** (1991). European development in wheat sourdoughs. *Cereal Food World*, 36, 310-312.
- **Brummer J.R., Lorenz K.** (2003). Preferment and sourdough in German breads; *Handbook of dough fermentations*. New York: Marcel Dekker Inc. p 247-267.

- **Calderon M., Loiseau G., Guyot J.P.** (2003). Fermentation by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 of different combination of carbohydrates occurring naturally in cereals: consequences on growth energetics and alpha-amylase production. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 161-169.
- **Chavan R.S, Chavan S.R.** (2011). Sourdough Technology – A traditional way for wholesome food. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 10, 170-183.
- **Corsetti A., Gobetti M., Smacchi E.** (1996). Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfranciscensis* C57. *Food Microbiology*, 13, 447-456.
- **Corsetti A., Settani L.** (2007). Lactobacilli in sourdough fermentation. *Food Research International*, 40, 539-558.
- **Dal Bello F., Clarke L.A., Ryan L.A.M., Ulmer H., Schober T.J., Strom K., Sjrgren J., van Sinderen D., Schnurer J., Arendt E.K.** (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *Journal of Cereal Science*, 45, 309-318.
- **Damiani P., Gobetti M., Cossignani L., Corsetti A., Simonetti M.S., Rossi J.** (1996). The sourdough microflora. Characterization of hetero and homofermentative lactic acid bacteria, yeast and their interactions on the basis of the volatile compounds produced. *Lebensm Wiss u – Technol*, 26, 63-70.

- **Decock P., Cappelle C.** (2005). Bread technology and sourdough technology. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 113-120.
- **De Vuyst L., Neysens P.** (2005). The sourdough microflora, biodiversity and metabolic interactions. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 43-56.
- **De Vuyst L., Vracken G., Ravyts F., Rimaux T., Weckx S.** (2009). Biodiversity, ecological determinants, and metabolic exploitation of sourdough microbiota. *Journal of Food Microbiology*, 26, 666-675.
- **Edema M.O., Sanni A.I.** (2008). Functional properties of selected starter cultures for sour maize bread. *Food Microbiology*, 25, 616-625.
- **Galal A.M., Jhonson J.A., Varriano-Martson E.** (1978). Lactic acid and volatile organic acid of San Francisco sourdough French bread. *Cereal Chemistry*, 55, 461-468.
- **Ganzle M.G.** (2004). Reutericyclin: biological activity, mode of action and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64, 326-332.
- **Gobbetti M., Corsetti A., Rossi J.** (1994). The sourdough microflora. Interaction between lactic acid bacteria and yeast: metabolism of carbohydrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41, 456-460.
- **Gobbetti M., Corsetti A., De Vincenzi S.** (1995). The sourdough microflora. Characterization of heterofermentative lactic acid bacteria based on acidification kinetics and impedance tests. *Italian Journal of Food Science*, 2, 103-112.

- **Gobbetti M.** (1998). The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeast. *Trends in Food Science*, 9, 267-274.
- **Gobbetti M., De Angelis M., Arnault P., Tossut P., Corsetti A., Lavermicocca P.** (1999). Added pentosans in bread making: fermentations of derived pentoses by sourdough lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 16, 409-418.
- **Gobbetti M., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R.** (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 57-69.
- **Hammes W.P.** (1991). Fermentation of non-dairy food. *Food Biotechnology*, 5, 293-303.
- **Hammes W.P., Vogel R.F.** (1995). The genus of *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzappel W, editors. *The genera of lactic acid bacteria*. London: Blackie Academic and Professional p. 19-54.
- **Hammes W.P., Stolz P., Ganzle M.** (1996). Metabolism of lactobacilli in tradition sourdough. *Advances in Food Sciences*, 18, 176-184.
- **Hammes W.P., Ganze M.G.** (1998). Sourdough breads and related products. *Microbiology of fermentation food. Volume 1*. London: Blackie Academic and Professional p 199-216.
- **Hansen A., Lund B.** (1987). Volatile compounds in rye sourdough; In: Martens M., Dalen GA, Russwurm H., editors. *Flavour science technology*. New York: Wiley p 43-49.

- **Hansen A., Lund B., Lewis M.J.** (1989). Flavour of sourdough rye bread crumb; *Lebensm Wiss Technol*, 22, 141-144.
- **Hansen A., Hansen B.** (1996). Flavour of sourdough wheat bread crumb; *Z Lebensm Unters Forsch*, 202, 244-249
- **Hansen A.S.** (2004). Sourdough Bread. *Handbook of Food and Beverage Fermentation Technology*.
- **Hansen A. & Schieberle P.** (2005). Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 16, 85-94.
- **Hansen A.S.** (2011). Sourdough bread. In Y.H. Hui & E. Ozgul Evranuz (Eds.); *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*. Boca Raton; CRC press. P 495-515.
- **Kandler O., Weiss N.** (1986). Genus *Lactobacillus*; Borgery's manual of systematic bacteriology. *The William and Wilkins Company, Baltimore* p 1209-1234
- **Lavermicocca P.F., Valerio A., Evidente S., Lazzaroni A., Corsetti A., Gobetti M.** (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from sourdough the *Lactobacillus plantarum*; *Applied Environment Microbiology*, 66, 4084-4090.
- **Lund B., Hansen A., Lewis M.J.** (1987). The influence of yeast and sourdough fermentation on volatile compounds in rye bread crumb; In: Munck L., editor.

Cereal Science and Technology. *Cereal science and technology Copenhagen: proceedings from 23. Nordic Cereal Congress, The Danish Cereal Society* p 185-195.

- **Lund B., A. Hansen & M.J. Lewis** (1989) Flavour of Sourdough Rye Bread Crumb; *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 22, 141-144.
- **Lund B., A. Hansen & M.J. Lewis** (1989) The influence of dough yield on acidification and production of volatiles in sourdough. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 22, 150-153.
- **Martinez-Anaya M.A., Pitarch B., Benedito de Barber C.** (1993). Biochemical Characteristics and breadmaking performance of freeze-dried wheat sour dough starter; *Lebensm Unters Forsch.*
- **Meignen B., Onno B., Gelinas P., Infantes M., Guilos S., Cahagnier B.** (2001). Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast; *Food Microbiology*, 18, 239-245.
- **Meroth C.B., Walter J., Hertel C., Brandt M.J., Hammes W.P.** (2003). Identification and monitoring the population dynamics in sourdough fermentation processes by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis; *Applied Environment Microbiology*.
- **Montanari C., Bargossi E., Lanciotti R., Chinnici F., Gardini F., Tabanelli G.** (2014). Effects of two different sourdough on the characteristics of Pandoro, a typical sweet leavened baked good; *journal of LWT; Food science and technology*.

- **Ottogalli G., Galli A. & Foschino R.** (1996). Italian bakery products obtained with sour dough: characterization of the typical microflora; *Advances in Food Science*, 18, 131-144.
- **Ottogalli G., Galli A., Foschino R.** (1996). Italian bakery products obtained with sourdough: characterization of the typical microflora; *Advances in Food Science*, 18, 131-144
- **Paramithiotis S., Tsiasiotou S., Drosinos E.H.** (2010). Comparative study of spontaneously fermented sourdoughs originating from two regions of Greece: Peloponnesus and Thessaly. *European Food Research International* 231, 883-890.
- **Ryan L.A.M., Dal Bello F., Arendt E.K.** (2008). The use of sourdough fermented by antifungal LAB to reduce the amount of calcium propionate in bread; *International Journal of Food Microbiology*, 125, 274-278.
- **Ryan L.A.M., Bello F.D., Czerny M., Koehler P., Arendt E.K.** (2009). Quantification of phenyllactic acid in wheat sourdough using high resolution gas chromatography-mass spectrometry; *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1060-1064.
- **Ryan L.A.M., Zannini E., Dal Bell F., Pawlowska A., Koehler P., Arendt E.K.** (2011) *Lactobacillus amylovorus* DSM 19280 as a novel food-grade antifungal agent for bakery products; *International Journal of Food Microbiology*.

- **Sanni A.I., Onilude A.A & Fatungase M.O.** (1998). Production of sour maize bread using starter cultures; *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 14, 101-106.
- **Schieberle P.** (1996). Intense aroma compounds – useful tools to monitor the influence of processing and storage on bread aroma; *Advances Food Science*, 18, 237-244.
- **Schnurer J., Magnusson J.** (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives; *Trends Food Science Technology*, 16, 70-78.
- **Schulz A.** (1972). Der Einfluss organischer Säuren auf die Vergaarung; *Getr Mehl Brot*, 26, 129-133.
- **Seitz L.M., Chung O.K.** (1998). Volatiles in selected commercial breads; Rengarajan R; *Cereal Chemists*.
- **Serrazanetti, Maria Elisabetta Guerzoni, Aldo Corsetti, Rudi Vogel** (2009). Metabolic impact and potential exploitation of the stress reactions in lactobacilli; *Food Microbiology*.
- **Spicher G., Rabe E., Sommer R. & Stephan H.** (1981). The microflora of sourdough XIV. Behaviour of homofementative sourdough bacteria and yeast in mixed culture; *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 173, 291-296.
- **Spicher G.** (1983). Baker Goods; *Germany: Verlag Chemie* p 1-80.

- **Spicher G., Lonner C.** (1985). The microflora of sourdough; *Zeitschrift fur Lebensmittel Untersuchung Und Forschung*, 181, 9-13.
- **Spicher G. & Stephan H.** (1993). Handbuch Sauerteig ; *BEHR'S Verlag*.
- **Spicher G., Spethan H.** (1999). Handbuch sauer Teig biologie, biochemie, technologie; 5th edition Hamburg Behr's Verlag.
- **Sugihara T.F.** (1970). Microbiology of breadmaking; *Microbiology of fermented foods*.
- **Thiele C., Ganzle M.G., Vogel R.F.** (2002). Contribution of sourdough lactobacilli, yeast, and cereal enzymes to the generation of amino acids in dough relevant for bread flavor; *Cereal Chemistry*, 79, 45-51
- **Valmorri S., Tofalo R., Settani L., Corsetti A., Suzzi G.** (2010). Yeast microbiota associated with spontaneous sourdough fermentations in the production of traditional wheat sourdough breads of the Abruzzo region (Italy). *Antonie van Leeuwenhoek* 97, 119-129.
- **Venturi M., Guerrini S., Vincenzini M.** (2012). Stable and non-competitive association of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida milleri* and *Lactobacillus sanfranciscensis* during manufacture of two traditional sourdough baked goods. *Food Microbiology* 31, 107-115.
- **Vernocchi P., Valmorri S., Gatto V., Torriani S., Gianotti A., Suzzi G., Guerzoni M.E., Gardini F.** (2004). A survey on yeast microbiota associated with Italian traditional sweet-leavened baked good fermentation; *Food Reserch International*, 37, 469-476

- **Vernocchi P., Ndagijimana M., Serrazanetti D.I., Gianotti A., Vallicelli M. and Guerzoni M.E.** (2008). Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli; *Food Chemistry*.
- **Vogel R.F., Bocker G., Stolz P., Ehrman M., Fanta D., Ludwing W., Pot B., Kerster K., Schleifer K.H., Hammes W.P.** (1994). Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis*; *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 223-229.
- **Vogel R.F., Knorr R., Muller M.R.A., Steudel U., Ganzle M.G., Ehrmann M.A.** (1999). Non diary lactic acid fermentations. The cereal word; *Antonie van Leeuwehoek*, 76, 403-411.
- **Wiese B.G., Strhmar W., Rainey F.A., Diekmann H.** (1996). *Lactobacillus panis* sp. Nov. from sourdough with a long fermentation period; *International Journal of System Bacteriology*, 46, 449-453.
- **Wlodarczyk M.** (1985). Associated cultures of lactic acid bacteria and yeast in the industrial production of bread; *Acta Aliment Polonica*.