

Qualità e sicurezza dei prodotti tipici: il ruolo della Microbiologia Agraria

Francesca Clementi*, Lucia Aquilanti, Cristiana Garofalo

Dipartimento di Scienze Alimentari, Agro-Ingegneristiche, Fisiche, Economico-Agrarie e del Territorio (SAIFET), Sezione di Microbiologia Alimentare, Ambientale ed Industriale, Università Politecnica delle Marche Via Brecce Bianche, 60131 Ancona

Società Italiana di Microbiologia Agraria, Alimentare e Ambientale

Riassunto

I prodotti tipici e tradizionali costituiscono un patrimonio di indiscusso valore e una rilevante opportunità di sviluppo per larga parte del territorio del nostro paese. La loro tutela e valorizzazione non può prescindere da una approfondita conoscenza, basata su dati oggettivi, sia dei punti di forza sia dei punti di debolezza che queste produzioni presentano.

Molti degli alimenti a denominazione protetta (DOP, IGP, STG) e di quelli compresi nell'*Elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali*, pubblicato con Decreto del MIPAF, sono alimenti fermentati e la maggior parte di essi ha grande rilevanza nella dieta quotidiana, come pane e altri lievitati da forno, formaggi e lattici fermentati, prodotti carnei fermentati di diverso tipo. In queste produzioni tradizionali i processi di fermentazione e di maturazione si basano sull'intervento di caratteristiche popolazioni microbiche, spesso molto eterogenee e complesse, definite "autoctone", in quanto specificamente associate a materie prime e ambienti di produzione. Il ruolo di queste comunità microbiche è fondamentale nel determinare le proprietà sensoriali e nutrizionali dei prodotti, pertanto, la loro conoscenza si rivela cruciale ai fini della valorizzazione delle produzioni tradizionali e tipiche.

D'altro canto, occorre che queste produzioni garantiscano lo stesso livello di sicurezza d'uso presente nei prodotti correnti, ottenuti con processi maggiormente standardizzati. A tal fine occorre, da una parte, una maggiore conoscenza dei meccanismi che conducono al verificarsi di possibili condizioni di rischio e, dall'altra, la messa a punto di strumenti di controllo adeguati, se pure quanto più possibile rispettosi della natura tradizionale di queste produzioni e del loro legame con il territorio.

I microbiologi agrari hanno fornito un contributo fondamentale in entrambe queste direzioni, con ricerche riguardanti le popolazioni microbiche delle produzioni alimentari tradizionali e tipiche, con particolare attenzione ai microrganismi autoctoni che vi svolgono un ruolo pro-tecnologico, e a microrganismi patogeni o produttori di metaboliti tossici che possono pregiudicarne la qualità igienica.

Una sintesi di queste ricerche viene qui riportata sulla base dei contributi inviati dai microbiologi della Società di Microbiologia Agraria, Alimentare e Ambientale (SIMTREA), in occasione del Convegno della Associazione Italiana delle Società Scientifiche Agrarie (AISSA).

Parole chiave: alimenti fermentati; alimenti tipici e tradizionali; analisi molecolari; microrganismi negli alimenti; sicurezza igienica.

Summary

QUALITY AND SAFETY OF TRADITIONAL FOODS: THE ROLE OF MICROBIOLOGY

The typical and traditional foods represent an heritage of undisputed value and a significant development opportunity for large part of the territory of our country.

Their protection and enhancement can not prescind from thorough knowledge, based on objective data, concerning both the strengths and weaknesses of this type of productions.

Most of the traditional and origin-protected foods are fermented foods and most of them have great value in the daily diet, as bread and other leavened baked goods, cheeses, fermented milks and different kinds of fermented meat products.

* Autore corrispondente: tel.: +39 071 2204855; fax: +39 071 2204988. Indirizzo e-mail: f.clementi@univpm.it

The fermentation processes of these traditional productions are based on the activities of characteristic microbial communities, often very heterogeneous and complex, defined “autochthonous” since they are specifically associated to raw materials and production environments. The role of these microbial communities is essential in determining the nutritional and sensory properties of the traditional and typical foods, therefore, their knowledge is crucial for giving value to these products.

On the other hand, it is necessary that the typical and traditional productions guarantee the same level of safety present in current products obtained through more standardized processes. To this aim, both a deep knowledge of the mechanisms leading to the occurrence of possible risks and the development of appropriate control tools (respectful of the traditional nature of these productions) are needed.

Food Microbiologists have given an essential contribution in both these directions carrying out researches dealing with the microbial populations of the typical and traditional productions, focused on either autochthonous microorganisms that play a pro-technology role, or pathogen micro-organisms and toxic metabolite producers.

This brief review summarizes the contributions collected from the Microbiologists of the SIMTREA presented at the Congress of the AISSA.

Key-words: fermented foods; typical and traditional foods; molecular tools; food micro-organisms; food safety.

Introduzione

I prodotti tipici e tradizionali costituiscono un patrimonio di indiscusso valore e una rilevante opportunità di sviluppo per larga parte del territorio del nostro paese. Molteplici sono gli aspetti che determinano il valore di queste produzioni e il loro generale apprezzamento, tuttavia la loro adeguata valorizzazione non può prescindere da una loro approfondita conoscenza. In particolare, è necessario avere una adeguata consapevolezza, basata su dati oggettivi, dei punti di forza che differenziano questi prodotti da alimenti simili ottenuti secondo criteri di mera produzione industriale. D’altro canto, risulta altrettanto importante la conoscenza dei punti di debolezza che questo tipo di produzioni presenta, su cui è necessario intervenire, se pure nel massimo rispetto del loro legame con tradizione e territorio. In anni recenti, i microbiologi agrari hanno fornito un contributo fondamentale in entrambe queste direzioni, con ricerche riguardanti le popolazioni microbiche delle produzioni alimentari tradizionali e tipiche, con particolare attenzione ai microrganismi autoctoni che vi svolgono un ruolo pro-tecnologico e a microrganismi patogeni o produttori di metaboliti tossici che possono pregiudicarne la qualità igienica.

In linea con quanto premesso, lo studio di entrambi questi aspetti è di rilevante importanza ai fini di una adeguata valorizzazione dei prodotti della nostra tradizione alimentare, come testimonia la notevole mole di lavori pubblicati in anni recenti su tali temi. Di seguito ne è

riportata una sintesi, sulla base dei contributi inviati dai microbiologi della Società di Microbiologia Agraria, Alimentare e Ambientale (SIMTREA), in occasione del Convegno della Associazione Italiana delle Società Scientifiche Agrarie (AISSA).

Qualità delle produzioni alimentari tradizionali e tipiche

Premessa

Molti degli alimenti a denominazione protetta (DOP, IGP, STG) e di quelli compresi nell’*Elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali* pubblicato con Decreto del MIPAF sono alimenti fermentati e la maggior parte di essi ha grande rilevanza nella dieta quotidiana, come il pane e altri lievitati da forno, formaggi e latticini fermentati, prodotti carnei fermentati di diverso tipo (Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, 2000).

Nelle produzioni industriali correnti, i processi di fermentazione e maturazione di questi alimenti si basano sull’impiego di colture *starter* commerciali, costituite da associazioni microbiche standardizzate, che hanno il ruolo di avviare e condurre a termine le desiderate trasformazioni. Nelle produzioni tradizionali, invece, i processi di fermentazione e di maturazione si basano sull’intervento di caratteristiche popolazioni microbiche, spesso molto eterogenee e complesse, definite “autoctone”, in quanto specificamente associate a materie prime e ambienti di produzione, come conseguenza di un

naturale adattamento alle peculiari condizioni che li caratterizzano. La composizione di tali popolazioni autoctone e le dinamiche che si instaurano al loro interno sono di fondamentale importanza ai fini delle proprietà sensoriali e nutrizionali dei prodotti.

La conoscenza delle popolazioni microbiche autoctone degli alimenti fermentati è dunque cruciale ai fini della loro caratterizzazione. Essa può essere essenzialmente perseguita utilizzando due differenti strategie.

Un possibile approccio per lo studio del microbiota di alimenti fermentati prevede di isolare il numero più elevato possibile di microrganismi da materie prime, semilavorati e prodotti finiti, utilizzando le tradizionali tecniche microbiologiche, in particolare mediante impiego di adeguati terreni selettivi. Una volta ottenuti in coltura pura e conservati in collezione, i singoli isolati provenienti dalla popolazione in studio, vengono analizzati in base al loro genotipo, nonché caratterizzati in base al loro fenotipo (con analisi chimiche, biochimiche, microbiologiche).

Le tecniche di analisi del genotipo oggi a disposizione, citate di seguito, sono molteplici e caratterizzate da un crescente livello di affinamento e affidabilità. La maggior parte di esse sono basate sulla reazione a catena della polimerasi (PCR), seguita da analisi degli ampliconi ottenuti, che possono essere diversamente trattati; ad esempio, possono essere sottoposti a restrizione da parte di endonucleasi, come nelle tecniche ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) e RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). In tutti i casi si giunge ad un risultato finale dello stesso tipo, che consiste nel tradurre l'informazione contenuta nel DNA bersaglio in una serie di bande che vengono visualizzate su un gel e fotografate. Si ottiene cioè il cosiddetto *fingerprinting* molecolare (l'impronta digitale genetica) del campione, in questo caso costituito dalla popolazione microbica in studio. Il profilo ottenuto è analizzato con l'ausilio di metodi di clusterizzazione, ad esempio NJ (*Neighbor-Joining*), UPGMA (*Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages*) o WPGMA (*Weighted Pair Group Method*) (Saitou e Nei, 1987; Waterman, 1995), con lo scopo di giungere alla identificazione della coltura o alla sua tipizzazione (a livello intraspecifico).

Le analisi fenotipiche degli isolati sono in-

vece soprattutto finalizzate allo studio delle loro proprietà metaboliche di potenziale interesse nelle produzioni alimentari da cui essi provengono. Anche gli strumenti analitici a disposizione per questi studi si sono progressivamente diversificati e potenziati, così tanto da consentire il nascere di discipline specifiche che studiano i profili metabolici (metabolomica) o caratterizzano le proteine globalmente espresse rispetto a struttura, funzione, attività, quantità e interazioni molecolari (proteomica).

La grande potenzialità delle tecniche impiegate in questo tipo di indagini consente di accumulare una grande mole di informazioni su ogni singolo isolato e quindi anche sulla popolazione microbica nel suo insieme. Questo tipo di approccio, inoltre, presenta anche l'importante vantaggio di portare alla raccolta di un gran numero di colture potenzialmente utilizzabili nella produzione di alimenti tradizionali, come *starter* di origine autoctona, essendone note, fra l'altro, le caratteristiche rilevanti ai fini della produzione alimentare da cui provengono.

Come sempre accade, anche questa medaglia ha il suo rovescio; l'approccio descritto presenta un limite assai rilevante, in quanto non consente di ottenere una "fotografia" esauriente della reale composizione della popolazione microbica, per la impossibilità di riprodurre, con i substrati selettivi disponibili per la coltivazione dei microrganismi, le condizioni esistenti nella matrice alimentare. Qualsiasi approccio di indagine coltura-dipendente è infatti incapace di fornire informazioni sulla cosiddetta frazione VNC (vitale non coltivabile) della popolazione microbica che spesso ne rappresenta una parte rilevante (costituita da cellule stressate e/o microrganismi "fastidiosi" di difficile coltivazione). Per tale motivo, in anni recenti, un crescente interesse è stato rivolto a tecniche molecolari di indagine coltura-indipendenti, in grado di fornire il profilo (*fingerprinting*) rappresentativo della diversità genetica di una popolazione microbica nel suo ambiente naturale (in questo caso, la matrice alimentare). Fra le tecniche sviluppate con tale finalità, quella oggi di uso più comune è probabilmente la PCR-DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*). Con questa tecnica, si procede alla estrazione del DNA microbico direttamente dalla matrice e ad amplificazione via PCR di un opportuno target, generalmente rappresentato dalle regioni variabi-

li del gene per il 16S rRNA (per i batteri), o del gene per il 26S o di quello per il 18S rRNA (per gli eucarioti); gli ampliconi vengono quindi fatti correre in un gel di poliacrilamide in gradiente denaturante di urea e formamide, che consente di separare ampliconi differenti sulla base sia della lunghezza sia della sequenza nucleotidica. L'attribuzione di specie alle singole bande visualizzate sul gel di poliacrilamide in seguito alla migrazione elettroforetica può essere effettuata attraverso il confronto con un *ladder* appositamente preparato con specie note, e/o sequenziamento del DNA eluito dalle bande excise dal gel. I profili ottenuti sono inoltre utilizzati per la costruzione di *cluster* (*cluster analysis*), utilizzando software appositamente sviluppati (ad esempio: NTSYS o SAS).

È evidente che anche la tecnica PCR-DGGE, come ogni altra, presenta alcuni limiti. Gli inconvenienti più comuni sono legati alla fase di estrazione e purificazione del DNA, in quanto le matrici alimentari sono differenti fra loro e spesso molto complesse, inoltre i diversi microrganismi possono rivelarsi diversamente sensibili all'azione degli enzimi litici utilizzati in questa fase; anche la reazione di PCR non è esente da problemi che possono risultare legati sia alla matrice (ad esempio, la presenza di inibitori della PCR), sia al DNA microbico eterogeneo, che in alcuni casi può legare in maniera preferenziale i *primer*.

Una dettagliata descrizione della tecnica PCR-DGGE come strumento di *fingerprinting* molecolare di popolazioni microbiche negli alimenti è riportata nella *review* di Ercolini, 2004; ai fini della presente trattazione è sufficiente sottolineare che tale tecnica, come ogni altra tecnica di indagine molecolare coltura-indipendente, è in grado di fornire informazioni complementari a quelle ottenute con tecniche dipendenti.

Da tutto quanto premesso, consegue che una conoscenza il più possibile approfondita della popolazione microbica di un alimento possa essere ottenuta grazie ad una opportuna integrazione delle informazioni ottenute con le differenti tecniche di indagine, come evidenzia la sintesi dei lavori di seguito riportata, con riferimento a diversi tipi di alimenti fermentati.

I formaggi

Nei formaggi la popolazione microbica autoctona responsabile delle trasformazioni che han-

no luogo nel corso di caseificazione e maturazione è rappresentata, essenzialmente, se pure non esclusivamente, da batteri lattici. La maggior parte delle ricerche sulla microbiologia dei formaggi riguarda quindi questi microrganismi.

Il nostro gruppo di ricerca ha condotto uno studio sugli isolati da formaggio Canestrato Pugliese DOP utilizzando un approccio polifasico che prevede l'impiego di tecniche genotipiche e fenotipiche per la loro identificazione e caratterizzazione. In un primo lavoro (Aquilanti et al., 2006), 207 isolati sono stati identificati a livello di specie utilizzando 30 saggi fenotipici e tre tecniche molecolari: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), sequenziamento di una porzione del gene per il 16S rRNA ed amplificazione del gene *recA* mediante PCR multipla. I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare che con le sole analisi basate sul fenotipo era possibile soltanto riconoscere il genere *Enterococcus*, mentre l'uso delle tecniche molecolari risultava indispensabile ai fini di una affidabile identificazione a livello di specie (tab. 1). Globalmente, l'approccio polifasico utilizzato ha portato alla identificazione di 207 isolati ascritti a 10 differenti specie (168 isolati sono risultati ascritti al genere *Enterococcus*, 25 a *Lactobacillus*, 13 a *Lactococcus* e 1 a *Leuconostoc*).

Successivamente, 33 isolati sono stati tipizzati utilizzando un duplice approccio basato sullo studio del loro genotipo, mediante RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e clusterizzazione dei profili con il metodo UPGMA (fig. 1), e del loro fenotipo (attività acidificante, proteolitica (tab. 2), e tendenza all'autolisi (Aquilanti et al., 2007a). I risultati della tipizzazione genotipica e fenotipica sono stati valutati comparativamente (tab. 3); nelle condizioni sperimentali realizzate, lo studio delle caratteristiche fenotipiche ha permesso di rilevare un più elevato grado di biodiversità, rispetto a quella evidenziata dalle analisi molecolari. Nessuno degli isolati in studio ha mostrato di possedere i valori più elevati per tutti i test condotti, mentre è stato possibile ottenere una *performance* ottimale utilizzando una appropriata associazione di ceppi opportunamente scelti sulla base delle singole attività.

In altri lavori, un simile approccio polifasico è stato applicato allo studio della popolazione di batteri lattici di formaggio Pecorino (Aqui-

Tabella 1. Identificazione fenotipica e molecolare degli 88 isolati ottenuti dal formaggio Canestrato Pugliese (modificata da: Aquilanti et al., 2006).

Table 1. Phenotypic and molecular identification of the 88 cultures isolated from Canestrato Pugliese cheese (modified from: Aquilanti et al., 2006).

Identificazione fenotipica	Isolato	Identificazione molecolare
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	28, 30	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	5	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
	4, 50, 51, 52	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
	23	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	27	<i>Lactobacillus casei</i>
	47	<i>Leuconostoc argentinum</i>
	49	<i>Lactobacillus brevis</i>
	9, 106, 142, 182, 183, 242, 243, 245, 249, 298	<i>Enterococcus faecium</i>
	7, 16, 26, 54, 204, 265, 21	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	72, 73, 86	<i>Lactobacillus brevis</i>
	59, 74	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	57, 67, 2	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus</i> spp.	14, 45, 58, 61, 68, 83	<i>Lactobacillus brevis</i>
	11	<i>Lactobacillus pentosus</i>
	17, 20, 29, 33, 35	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	128, 161, 165, 196, 301, 306, 307	<i>Enterococcus faecium</i>
	43, 15, 69, 70, 71, 84, 6, 55	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	10	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	265	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	91, 204	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus pentosus</i>	55	<i>Lactobacillus plantarum</i>
	77, 78	<i>Lactobacillus brevis</i>
	24	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	81	<i>Lactobacillus brevis</i>
	8	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<i>Leuconostoc</i> spp.	1, 3, 7, 13, 16	<i>Lactococcus garviae</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	105	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	19, 207, 202, 206, 23, 246, 12, 64	<i>Enterococcus faecium</i>
	22	<i>Enterococcus faecalis</i>

lanti et al., 2007b) e di Mozzarella (Ciarrocchi et al., 2006), prodotti nella regione Marche. In entrambi i casi, l'approccio utilizzato ha consentito di dimostrare il potenziale interesse degli isolati raccolti come starter autoctoni per la produzione dei formaggi in studio.

Numerose ricerche di questo tipo, basate sullo studio degli isolati, sono state condotte nelle diverse sedi italiane dai Microbiologi Agrari.

La popolazione microbica del formaggio DOP Montasio è stata investigata attraverso lo studio di ben 899 isolati, sottoposti ad identificazione, con analisi genotipiche e biochimiche e a caratterizzazione in base alle attività acidificante e proteolitica. La comunità microbica è risultata dominata da *Streptococcus thermophilus* e da enterococchi (più acidificanti i primi, più proteolitici i secondi) (Marino et al., 2003).

Alcuni studi di Gatti et al. (2003; 2004), si sono focalizzati sulla diversità intraspecifica di

colture di *Lactobacillus helveticus* isolate da siero fermenti per Parmigiano Reggiano, Grana Padano e Provolone. Gli isolati sono stati sottoposti ad analisi genotipiche, quali RAPD e RFLP e fenotipiche, come la SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis*) delle proteine di parete. I risultati ottenuti hanno dimostrato la presenza di differenti biotipi nei diversi ecosistemi, confermando l'ipotesi dell'esistenza di un peculiare microbiota nelle diverse produzioni casearie tipiche. La comunità microbica dei siero-fermenti per il Grana Padano è stata ulteriormente investigata, da parte dello stesso gruppo di ricerca, anche in funzione dei trattamenti tecnologici (Gatti et al., 2006; Santarelli et al., 2008; Rossetti et al., 2008). In questi studi è stato utilizzato un approccio analitico innovativo, che fa uso di metodi coltura-indipendenti, basati sulla PCR o sulla microscopia in fluorescenza. In par-

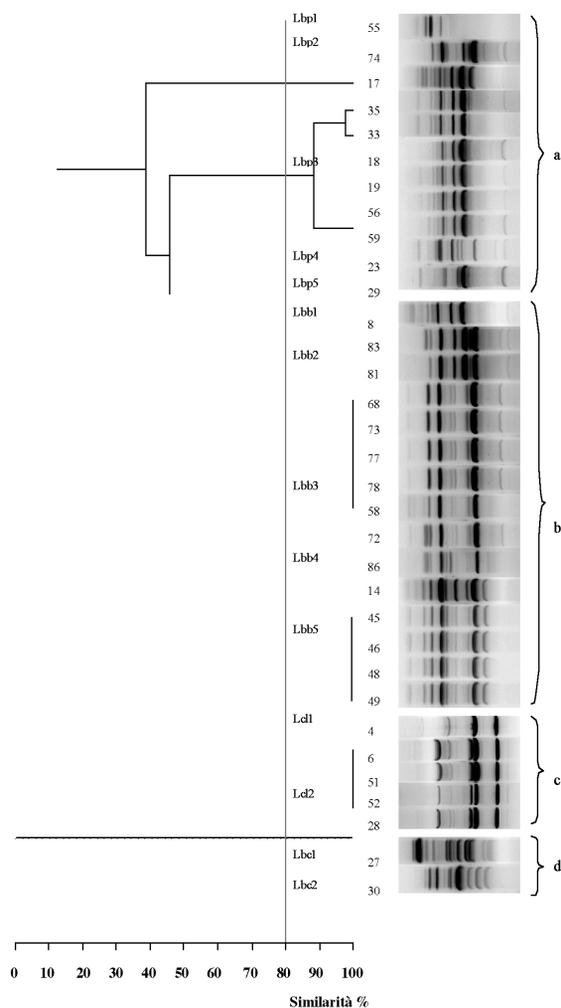


Figura 1. Dendrogramma costruito mediante clusterizzazione col metodo UPGMA dei profili RAPD ottenuti dai 33 isolati di batteri lattici, ascritti alle specie *Lb. plantarum* (a), *Lb. brevis* (b), *L. lactis subsp. cremoris* (c), and *Lb. casei* (d), isolati dal formaggio Canestrato Pugliese. I cluster geneticamente omogenei sono stati definiti utilizzando una soglia arbitraria di similarità dell'80%, calcolata utilizzando il coefficiente Dice (modificata da: Aquilanti et al., 2007a).

Figure 1. UPGMA-dendrogram of the 33 indigenous lactic acid bacteria isolated from the Canestrato Pugliese cheese on the basis of RAPD profiles within the species *Lb. plantarum* (a), *Lb. brevis* (b), *L. lactis subsp. cremoris* (c), and *Lb. casei* (d). An 80% similarity, calculated by using the Dice coefficient, was arbitrarily chosen as a discriminating threshold to define the homogenous clusters, with each corresponding to a genotype (modified from: Aquilanti et al., 2007a).

icolare, la tecnica di LH-RT-PCR (*Length Heterogeneity Reverse Transcriptase-PCR*), in grado di distinguere i microrganismi in base al naturale polimorfismo di lunghezza del 16S rRNA, amplificato via RT, si è dimostrato un valido

strumento per lo studio delle comunità microbiche. Di pari utilità si è rivelato il kit LIVE/DEAD® BacLight™ che permette di evidenziare i batteri vitali nel preparato microscopico, in quanto marcati da una fluorescenza verde, mentre le cellule morte mostrano una fluorescenza rossa.

In alcuni casi, le ricerche si sono orientate alla individuazione di nuovi *marker* per la messa a punto di strumenti molecolari di indagine, specie specifici (quali *primer* o sonde), in grado di fornire una affidabile identificazione e differenziazione di diverse specie di batteri lattici. Studi di questo tipo sono stati condotti sul polimorfismo dei geni *hsp60* in differenti specie del genere *Lactobacillus* (Blaiotta et al., 2008) o sul grado di polimorfismo inter-specifico delle regioni spaziatriche intergeniche (ISR) tra i geni per il 16S rRNA e il 23S rRNA nell'ambito del genere *Lactococcus* (Moschetti et al., 1998; Blaiotta et al., 2002). In particolare, nello studio di Moschetti, l'analisi del polimorfismo di restrizione delle regioni definite ISR (*Intergenic Spacer Regions*) si è dimostrata un valido metodo per la discriminazione dei ceppi all'interno della specie *Streptococcus thermophilus*; la tecnica sviluppata, infatti, se pure non in grado di fornire lo stesso grado di discriminazione della PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), ha tuttavia fornito risultati del tutto comparabili a quelli ottenibili con tale metodo, in genere riconosciuto come *golden standard* in questo campo.

Un altro lavoro finalizzato allo studio della popolazione lattica del formaggio, attraverso l'isolamento e lo studio dei suoi componenti, è stato condotto sul Raschera, un formaggio DOP a pasta semidura prodotto in Piemonte (Dolci et al., 2008a). Dopo identificazione degli isolati, eseguita con l'uso combinato di analisi PCR della regione spaziatrica dei geni per il 16S e 23S rRNA, PCR specie specifiche e sequenziamento di parte del gene per il 16S rRNA, gli isolati appartenenti alla specie dominante (*Lactococcus lactis subsp. lactis*) sono stati biotipizzati, via RAPD. È emersa una estrema omogeneità: tutti i ceppi sono stati infatti raggruppati in due *cluster* che non avevano alcuna relazione con la fonte di isolamento (cagliata o formaggio a diversa stagionatura), o con il produttore.

Uno studio di questo tipo è stato condotto

Tabella 2. Attività acidificante, proteolitica ed autolitica di 33 isolati di batteri lattici ottenuti dal formaggio Canestrato Pugliese. Per ciascuna attività, sono stati riportati valore medio \pm deviazione standard. L'acidificazione è stata valutata mediante misurazione del pH dopo 8 e 24 ore di fermentazione in Skim milk (Oxoid), incubato a 30 °C; la proteolisi è stata valutata mediante determinazione del contenuto in glicina dopo 24 ore e 7 giorni di fermentazione; l'attività autolitica è stata valutata in termini di percentuale (%) e velocità (AR, *autolysis rate*) di autolisi (modificata da: Aquilanti et al., 2007a).

Table 2. The acidifying, proteolytic and autolytic activities of 33 lactic acid bacteria isolates from Canestrato Pugliese cheese. Mean values \pm standard deviations are reported of: pH after 8 and 24 h fermentation in Skimmed milk (Oxoid) incubated at 30 °C; $\mu\text{g/mL}$ of glycine released after 24 h and 7 days; autolysis percentages (%) and autolysis rates (AR) (modified from: Aquilanti et al., 2007a).

Isolato	Specie	Acidificazione		Proteolisi		Autolisi		
		8 h	24 h	24 h	7 giorni	%	AR	
8	<i>Lactobacillus brevis</i>	6,38 \pm 0,01	5,47 \pm 0,01	135,25 \pm 0,00	141,43 \pm 30,60	32,10 \pm 2,69	0,03 \pm 0,01	
14		5,91 \pm 0,01	4,80 \pm 0,01	147,62 \pm 34,97	166,16 \pm 56,83	39,37 \pm 0,10	0,03 \pm 0,01	
45		5,64 \pm 0,01	4,71 \pm 0,01	147,62 \pm 17,48	512,38 \pm 4,37	20,73 \pm 2,13	0,06 \pm 0,01	
46		5,76 \pm 0,01	4,98 \pm 0,00	141,43 \pm 4,37	153,8 \pm 8,74	90,77 \pm 1,75	0,01 \pm 0,00	
48		5,49 \pm 0,01	4,82 \pm 0,10	141,43 \pm 13,11	141,43 \pm 21,85	26,75 \pm 1,03	0,15 \pm 0,03	
68		5,48 \pm 0,04	4,48 \pm 0,01	135,10 \pm 4,37	150,80 \pm 0,00	69,48 \pm 0,73	0,10 \pm 0,01	
77		5,63 \pm 0,05	4,82 \pm 0,03	28,29 \pm 4,37	37,57 \pm 4,37	45,20 \pm 2,13	0,12 \pm 0,03	
81		5,76 \pm 0,00	4,84 \pm 0,00	129,05 \pm 0,10	673,40 \pm 10,20	4,60 \pm 1,46	0,07 \pm 0,00	
83		5,86 \pm 0,00	5,14 \pm 0,10	134,07 \pm 2,14	153,08 \pm 0,00	23,25 \pm 3,93	0,04 \pm 0,01	
86		5,86 \pm 0,01	5,14 \pm 0,10	135,25 \pm 0,00	150,21 \pm 1,60	31,95 \pm 1,91	0,07 \pm 0,01	
49		5,73 \pm 0,02	4,90 \pm 0,02	98,16 \pm 4,37	104,34 \pm 0,00	39,84 \pm 3,06	0,02 \pm 0,00	
58		5,91 \pm 0,00	4,72 \pm 0,01	401,10 \pm 21,85	184,71 \pm 13,11	17,75 \pm 1,38	0,04 \pm 0,02	
72		5,76 \pm 0,00	4,84 \pm 0,00	129,07 \pm 8,47	147,62 \pm 30,60	49,06 \pm 2,82	0,14 \pm 0,01	
73		5,36 \pm 0,03	4,60 \pm 0,05	135,25 \pm 0,00	153,80 \pm 0,00	38,74 \pm 1,56	0,08 \pm 0,03	
78		6,16 \pm 0,01	5,67 \pm 0,00	122,89 \pm 0,00	209,44 \pm 4,37	26,29 \pm 5,32	0,14 \pm 0,08	
29		<i>Lactobacillus plantarum</i>	5,95 \pm 0,02	4,93 \pm 0,22	184,71 \pm 4,37	209,44 \pm 48,08	19,74 \pm 9,20	0,13 \pm 0,06
33			5,88 \pm 0,01	4,88 \pm 0,01	376,37 \pm 21,85	184,71 \pm 39,34	24,76 \pm 4,50	0,08 \pm 0,00
55			6,14 \pm 0,01	5,83 \pm 0,02	116,70 \pm 0,00	104,35 \pm 0,00	28,59 \pm 3,21	0,22 \pm 0,04
23			6,18 \pm 0,00	5,31 \pm 0,01	122,89 \pm 4,37	98,16 \pm 4,37	9,28 \pm 3,44	0,01 \pm 0,00
56	5,51 \pm 0,01		4,41 \pm 0,10	116,80 \pm 0,00	104,35 \pm 0,14	24,58 \pm 5,38	0,07 \pm 0,03	
59	5,51 \pm 0,01		4,41 \pm 0,01	135,25 \pm 21,85	116,70 \pm 43,71	13,40 \pm 2,96	0,60 \pm 0,02	
17	6,38 \pm 0,01		5,47 \pm 0,01	29,53 \pm 0,00	51,79 \pm 0,00	27,06 \pm 2,04	0,07 \pm 0,02	
18	5,53 \pm 0,01		4,76 \pm 0,01	184,71 \pm 4,37	209,46 \pm 21,85	17,11 \pm 3,20	0,07 \pm 0,02	
19	6,28 \pm 0,01		5,40 \pm 0,00	135,25 \pm 0,00	141,43 \pm 30,60	19,27 \pm 4,82	0,05 \pm 0,03	
35	6,29 \pm 0,01		5,70 \pm 0,01	166,16 \pm 17,00	104,34 \pm 4,30	7,06 \pm 3,25	0,05 \pm 0,02	
74	5,56 \pm 0,00	4,79 \pm 0,01	129,07 \pm 0,00	673,13 \pm 21,85	44,17 \pm 1,14	0,17 \pm 0,01		
30	<i>Lactobacillus casei</i>	6,29 \pm 0,01	5,70 \pm 0,01	166,16 \pm 17,00	104,34 \pm 4,30	7,06 \pm 3,25	0,05 \pm 0,02	
27		6,11 \pm 0,01	5,36 \pm 0,01	178,53 \pm 4,37	190,89 \pm 4,37	13,06 \pm 5,82	0,08 \pm 0,05	
4	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	6,00 \pm 0,07	4,39 \pm 0,01	184,71 \pm 8,74	246,54 \pm 17,48	5,21 \pm 2,62	0,04 \pm 0,02	
6		6,20 \pm 0,01	4,55 \pm 0,01	159,98 \pm 4,37	190,89 \pm 8,47	0,00	0,04 \pm 0,01	
28		5,94 \pm 0,01	4,44 \pm 0,00	166,16 \pm 17,48	104,34 \pm 4,37	0,00	0,24 \pm 0,02	
51		5,94 \pm 0,01	4,72 \pm 0,00	122,89 \pm 4,37	98,16 \pm 26,23	11,10 \pm 0,96	0,05 \pm 0,02	
52		6,08 \pm 0,02	4,52 \pm 0,01	159,98 \pm 8,74	178,53 \pm 39,34	9,28 \pm 3,44	0,30 \pm 0,01	

nell'ambito di una ricerca finalizzata alla caratterizzazione di nove formaggi della tradizione casearia italiana, prodotti con latte di pecora (Coda et al., 2006). Questa indagine ha previsto la raccolta di isolati da ciascun formaggio e la loro identificazione e tipizzazione su base genotipica (via RAPD e sequenziamento di una porzione del gene per il 16S rRNA). È stato così possibile individuare le specie dominanti nei diversi formaggi; gli isolati sono stati ulterior-

mente caratterizzati in termini di composizione chimica, proteolisi, via RP-FPLC (*Reversed Phase Fast Protein Liquid Chromatography*) contenuto in composti volatili, via SPME-GC-MS (*Solid Phase Micro Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). Un lavoro analogo è stato condotto per la caratterizzazione di quattro formaggi che prevedono una fase di maturazione in condizioni non convenzionali (Di Cagno et al., 2007).

Tabella 3. Cluster RAPD e biotipi individuati tra i 33 isolati di batteri lattici dal formaggio Canestrato Pugliese. La definizione dei biotipi è stata condotta mediante ANOVA di: attività acidificante (AA) dopo 8 ore di fermentazione; attività proteolitica (AP) e tasso di autolisi (AR, Autolysis Rate). All'interno di ogni specie e gruppo di dati, gli isolati contrassegnati con le stesse lettere non sono significativamente differenti ($P < 0.05$) (modificata da: Aquilanti et al., 2007a).

Table 3. The RAPD clusters and biotypes, related to the 33 lactic acid bacteria from Canestrato Pugliese cheese. The biotypes have been defined by ANOVA carried out on data related to: acidifying activities after 8 h (AA); proteolytic activities after 24 h (PA) and autolysis rates (AR). Within each species and data set, the isolates labelled with the same letters are not significantly different ($P < 0.05$) (modified from: Aquilanti et al., 2007a).

Isolato	Caseificio	Cluster RAPD	Caratterizzazione fenotipica			
			AA	AP	AR	Biotipo
8	F1	Lbb 1	a	c	a	Lbr A
83	F1	Lbb 2	b	c	a	Lbr B
81	F1		e	c	a	Lbr C
72	F3	Lbb 3	e	c	a	
58	F2		b	b	a	Lbr D
73	F3		f	c	a	Lbr E
78	F3		g	c	a	Lbr F
77	F1		c	a	a	Lbr G
68	F1		d	c	a	Lbr H
45	F1	Lbb 5	d	c	a	
46	F1		b	c	a	Lbr I
48	F1		b	c	a	
49	F2		c	c	a	Lbr M
14	F1		e	c	a	Lbr N
86	F1	Lbb 4	e	c	a	
55	F1	Lbp 1	a	a	c	LbpA
17	F3	Lbp 2	b	b	c	Lbp B
74	F3		c	a	bc	Lbp C
18	F3	Lbp 3	c	c	c	Lbp D
19	F3		d	a	c	Lbp E
33	F1		e	d	c	Lbp F
35	F3		d	c	c	Lbp G
56	F2		g	a	c	Lbp I
59	F2		h	a	a	Lbp L
23	F2	Lbp 4	i	a	c	Lbp M
29	F1	Lbp 5	l	c	c	Lbp N
30	F1	Lbc 1	a	a	a	Lbc A
27	F3	Lbc 2	b	a	a	Lbc B
4	F2	Lcc 1	bc	b	c	Lcl A
6	F3	Lcc 2	a	b	c	Lcl B
28	F3		c	b	b	Lcl C
51	F3		c	a	c	Lcl D
52	F3		b	b	a	Lcl E

Nel lavoro di De Angelis et al., 2008 lo studio di 146 isolati di batteri lattici provenienti da siero-fermenti è stato invece finalizzato alla selezione di ceppi autoctoni per la produzione di

Mozzarella. Dopo l'individuazione dei ceppi più acidificanti e la messa a punto di colture *starter* multi-ceppo, il lavoro è stato focalizzato sulla produzione sperimentale di mozzarella. I formaggi sperimentali sono stati caratterizzati in termini di composizione chimica, proteolisi, proprietà sensoriali e strutturali, attraverso analisi di CLSM (*Confocal Laser Scanning Microscopy*). Il monitoraggio dei ceppi è stato effettuato mediante RAPD. Lo stesso gruppo di ricerca ha condotto una indagine su un gran numero di colture di batteri lattici isolati da diversi formaggi italiani, con la finalità di caratterizzarli in base alla loro capacità di produrre acido γ -amino-butyrico (GABA), recentemente al centro dell'attenzione come composto bioattivo (Siragusa et al., 2007). Questo vasto lavoro di screening ha portato alla selezione di tre ceppi di lattobacilli (*Lactobacillus plantarum* WCFS1, *Lb. paracasei* CF6 e *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* PR1, capaci di sopravvivere e sintetizzare GABA in condizioni caratteristiche dell'intestino umano).

Come premesso, lo studio di una popolazione microbica può essere condotto combinando tecniche coltura-dipendenti con analisi coltura-indipendenti integrando le informazioni così ottenute. Una ricerca di questo tipo è stata condotta da Aponte et al., 2008 sulla popolazione lattica del Provolone del Monaco, un formaggio a pasta filata tradizionale della regione Campania. La comunità microbica è stata monitorata durante la caseificazione e la maturazione. Gli esiti dell'identificazione fenotipica e genotipica dei 308 isolati (dominanza di *Streptococcus thermophilus* e *St. macedonicus*, enterococchi e lattobacilli del gruppo *casei*) sono risultati coerenti con quelli ottenuti via PCR-DGGE; quest'ultima analisi, tuttavia, consentiva di mettere in evidenza anche alcune specie (*Lb. fermentum* e *Lb. delbrueckii* subspecies) non emerse dalle indagini coltura-dipendenti. Uno studio analogo è stato condotto su tre produzioni del formaggio DOP piemontese Castelmagno (Dolci et al., 2008b). La dinamica della comunità microbica durante la maturazione è stata seguita mediante metodica PCR-DGGE. Anche in questo caso sono stati raccolti numerosi isolati, che sono stati identificati con metodi molecolari. Per quanto riguarda le identificazioni, si è osservata la tipica successione da lattococchi all'inizio a lattobacilli alla fine della maturazione. Questa

situazione è stata solo parzialmente confermata dall'analisi coltura-indipendente, dove *Lactococcus lactis* è comunque stato osservato fino alla fine (90 giorni di maturazione). Anche questo lavoro ha confermato l'opportunità di combinare i due approcci, coltura-dipendente e coltura-indipendente, al fine di una caratterizzazione più esauriente della comunità microbica.

Uno studio particolare è stato condotto, investigando, con metodi coltura-dipendenti e coltura-indipendenti la comunità microbica presente sulla crosta del formaggio DOP Fontina, nella cui maturazione, di tipo centripeto, i microrganismi superficiali hanno rilevante importanza. Il lavoro ha preso in considerazione quattro *batches* in due differenti *caves* di maturazione (Dolci et al., 2009). L'identificazione degli isolati ha permesso di mettere in evidenza le specie di lieviti (*Debaromyces hansenii* e *Candida sake*) rilevabili durante tutto il periodo di maturazione e la successione tra le specie di batteri (*Lactococcus lactis lactis* e *St. thermophilus* prima, *Arthrobacter nicotianae* e *Brevibacterium casei*, poi). La clusterizzazione dei profili DGGE ha permesso invece di dimostrare come l'ambiente di maturazione abbia un rilevante effetto sulle dinamiche della comunità microbica superficiale della Fontina DOP.

Lo studio della biodiversità microbica di prodotti tipici o tradizionali, la cui produzione è legata ad un determinato territorio, può essere anche finalizzato a verificare se il profilo della comunità microbica può essere correlato con l'origine geografica, cioè verificare se formaggi con profili microbiologici differenti sono attribuibili a zone differenti. Studi di questo tipo sono stati condotti dal gruppo di ricerca della Facoltà di Agraria di Portici dell'Università "Federico II" di Napoli, sulle comunità microbiche del siero fermento per la produzione di formaggi a pasta filata: il Caciocavallo Silano DOP e la Mozzarella di Bufala. Nel primo caso, la ricerca ha riguardato ben 63 siero fermenti per la produzione del Caciocavallo in sei diverse regioni dell'Italia meridionale; la diversità microbica a livello di specie è stata analizzata utilizzando PCR-DGGE e, comparativamente, una tecnica sviluppata molto più recentemente: la DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*), che si è dimostrata altrettanto efficace; la biodiversità intraspecifica è stata analizzata via RAPD (Ercolini et al., 2008). I risulta-

ti ottenuti non hanno permesso di mettere in evidenza alcuna correlazione tra i profili delle comunità microbiche e la zona geografica di produzione. Questa correlazione è stata invece dimostrata con successo nello studio condotto sulla Mozzarella di bufala, in cui i profili DGGE dei siero innesti sono stati combinati con quelli ottenuti dall'analisi dei composti volatili aromatici, via HRGC-MS (*High Resolution Gas Chromatography-Mass Spectrometry*). In questo caso, i risultati dei profili microbiologici ed aromatici risultavano utili per risalire all'origine geografica del formaggio (la cui produzione era localizzata in un'area molto più ristretta rispetto a quella del Caciocavallo Silano) (Mauriello et al., 2003).

I prodotti carnei fermentati

Analogamente a quanto fin qui riferito circa gli studi concernenti le comunità microbiche dei formaggi, numerose indagini dello stesso tipo hanno riguardato le popolazioni microbiche dei prodotti carnei fermentati, nei quali, oltre ai batteri lattici rivestono un ruolo pro-tecnologico i microrganismi riconducibili al gruppo dei cocci coagulasi negativi (CCN), appartenenti ai generi: *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria*.

Nel nostro gruppo, le ricerche in questo settore, condotte nell'ambito di un progetto PRIN-2004: "Individuazione di parametri di qualità in prodotti carnei regionali italiani", si sono soprattutto focalizzate sul Ciauscolo, un salume tradizionale dell'Italia centrale (Umbria e Marche), per il quale è attualmente in fase di acquisizione la denominazione protetta di IGP (Silvestri et al., 2007; Aquilanti et al., 2007c). Le ricerche hanno analizzato comparativamente la comunità di batteri lattici di 22 produzioni a carattere industriale e artigianale e, successivamente, l'evoluzione di queste popolazioni in una delle produzioni risultate di maggiore interesse. Nelle indagini sono state utilizzate tecniche coltura-dipendenti e coltura-indipendenti. Parallelamente, è stato sviluppato un metodo per l'identificazione e la quantizzazione delle specie lattiche tipiche degli insaccati fermentati mediante *real-time* PCR (Silvestri et al., 2006). La enumerazione di coliformi totali, *Escherichia coli* e *S. aureus* ha evidenziato una adeguata applicazione delle norme di buona prassi igienica dei processi produttivi in studio. Dai *fingerprints* molecolari, è emerso che le due specie *Lb. sakei*

e *Lb. curvatus* sono le più rappresentate, essendo state rilevate rispettivamente nell'86% e 81% dei campioni, mentre le specie *Lb. plantarum*, *Lb. farciminis*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* sono state individuate con minore frequenza. L'indagine ha anche permesso di rilevare che alcune produzioni sono rimaste sostanzialmente fedeli alla tradizione mentre in altri casi le condizioni produttive si sono allontanate dallo schema originale (Silvestri et al., 2007).

L'utilizzo combinato di tecniche di indagine coltura-indipendenti e coltura dipendenti è stato applicato anche allo studio della popolazione microbica della Soppresata del Vallo di Diano, un salume tradizionale della regione Campania (Villani et al., 2007). In questo caso, lo studio della ecologia microbica via PCR-DGGE e sequenziamento genico è stato esteso alla comunità di batteri lattici e CCN (tramite amplificazione delle regioni variabili V3 e V1 del gene per il 16S rRNA) e a quella di lieviti (tramite amplificazione del gene per il 26S rRNA). Parallelamente, ceppi di *Staphylococcus xylosum*, *Lb. sakei* e *Lb. curvatus* sono stati caratterizzati con riferimento alle attività nitrato-reduktasica, proteolitica, lipolitica e anti-ossidante, con prove *in vitro* e *in situ*; queste ultime, consistenti nel testare ogni ceppo in lavorazioni sperimentali in scala di laboratorio di soppresata, si sono rivelate maggiormente utili al fine di individuare ceppi potenzialmente utilizzabili come *starter*.

Un approccio combinato di indagine, con tecniche coltura-dipendenti e coltura-indipendenti, è stato utilizzato anche per una indagine su tre salumi fermentati tradizionali del Nord-est d'Italia, mediante conte sui convenzionali substrati selettivi e PCR-DGGE (Rantsiou et al., 2005). Come la precedente, anche questa indagine ha portato a definire le specie dominanti di batteri lattici e di cocchi coagulasi negativi. Sono stati inoltre evidenziati batteri appartenenti ai generi *Bacillus* e *Ruminococcus* e alla specie *Macroccoccus caseolyticus*. Tra i lieviti, i profili DGGE hanno evidenziato: *Debaryomyces hansenii* (trovato anche nella precedente indagine, nella Soppresata del Vallo di Diano), *Candida* spp. e *Willopsis saturnus*. Dall'analisi cluster si è evidenziato che i profili DGGE ottenuti sono in grado di definire il prodotto tradizionale. Mentre i campioni all'inizio della fer-

mentazione erano molto diversi tra di loro, in stagionatura essi sono stati raggruppati per stabilimento.

Un approccio coltura-dipendente è stato invece utilizzato in un'indagine condotta su salicce fermentate tradizionalmente prodotte nell'Italia meridionale (Mauriello et al., 2004). Novantotto isolati appartenenti al genere *Staphylococcus* e 1 al genere *Kocuria* sono stati caratterizzati con riferimento alle attività metaboliche già citate per il lavoro sulla Soppresata del Vallo di Diano, nonché con riferimento alla loro capacità di crescere alle temperature tipiche di maturazione di questi prodotti e in presenza di elevate concentrazioni di NaCl. Nell'insieme, i risultati ottenuti hanno portato ad evidenziare un'ampia variabilità di queste caratteristiche fra gli isolati in studio, che sono risultati di potenziale interesse per l'uso come starter autocloni in diverse condizioni produttive.

Un'altra ricerca condotta attraverso lo studio di un gran numero di isolati ha preso in esame la comunità di stafilococchi coagulasi negativi in due salumi della tradizione meridionale (Blaiotta et al., 2004a). Le proprietà fenotipiche di 471 ceppi sono state analizzate con analisi multivariata, usando 28 ceppi da Collezioni di colture e 48 ceppi identificati in base al genotipo, come riferimento. La composizione delle comunità batteriche in studio è risultata altamente variabile, in funzione del tipo di produzione considerata, dell'impianto, del tempo di maturazione. La caratterizzazione fenotipica, abbinata alla analisi statistica è risultata utile al fine di biotipizzare un gran numero di ceppi e, quindi, monitorare i cambiamenti nelle comunità microbiche durante la maturazione, ma non si è rivelata affidabile ai fini della identificazione degli stafilococchi. Altre ricerche hanno invece evidenziato l'efficacia, a tal fine, di un approccio polifasico, basato sull'uso combinato di due tecniche molecolari: amplificazione via PCR della regione V3 del gene per il 16S rRNA seguita da DGGE e analisi del polimorfismo della regione spaziatrice tra i geni per il 16S e per il 23S rRNA (Blaiotta et al., 2003). Lo stesso gruppo ha messo a punto un metodo di PCR-specie specifica affidabile e rapido (4 ore dalla estrazione del DNA all'ottenimento del risultato), per l'identificazione e differenziazione della specie *equorum* spesso presente in questi prodotti (Blaiotta et al., 2004b).

Anche per i salumi, come per i formaggi, lo studio della comunità microbica può essere combinato con quello delle caratteristiche chimiche e biochimiche dei prodotti, con la finalità di una loro caratterizzazione quanto più possibile completa. Uno studio comparativo di questo tipo è stato condotto da Di Cagno et al., 2008 su tre prodotti carnei fermentati a denominazione protetta (Varzi, Brianza e Piacentino). I prodotti sono stati analizzati con riferimento a: composizione chimica fondamentale; conta e identificazione dei principali componenti la comunità microbica; proteolisi delle proteine miofibrillari e proteolisi secondaria e profilo della componente volatile (52 composti analizzati via SPME-GC-MS).

I prodotti fermentati di origine vegetale

Tra tutti i prodotti della nostra tradizione il pane è probabilmente il più antico e diffuso.

Tradizionalmente la sua produzione è basata sulla cosiddetta “lievitazione naturale”. Questa fermentazione si basa sull’impiego dell’impasto acido (*sourdough*), essenzialmente costituito da una miscela di acqua e farina e da una popolazione microbica di batteri lattici e lieviti, naturalmente selezionatasi. La fermentazione con impasto acido è anche utilizzata per la produzione di alcuni dolci caratteristici delle festività natalizie e pasquali (Panettone, Pandoro, Colomba), nonché della Pizza napoletana e di altri lievitati da forno della nostra tradizione. Analogamente a quanto accade per gli altri alimenti fermentati, la comunità microbica degli impasti acidi è responsabile delle trasformazioni (fermentazione e lievitazione) che avvengono nell’impasto, prima della cottura; quindi la sua composizione e le attività metaboliche dei suoi componenti sono di fondamentale importanza ai fini delle caratteristiche sensoriali e nutrizionali dei prodotti. Il nostro gruppo ha svolto uno studio sulla composizione della comunità di batteri lattici e lieviti di impasti acidi utilizzati nella produzione di tre tipologie di panettone e sulla sua evoluzione nel corso dei processi produttivi (Garofalo et al., 2008). La ricerca è stata condotta utilizzando la tecnica PCR-DGGE, con un approccio duplice, coltura-indipendente e coltura-dipendente: nel primo caso è stato utilizzato come template il DNA direttamente estratto dalle matrici alimentari (gli impasti acidi), nel secondo caso il DNA

template è stato estratto dai *bulk* di colonie isolate dagli stessi impasti acidi, mediante adeguate terreni selettivi (mMRS e mSDB per i batteri lattici e YPD per i lieviti). I due metodi hanno portato ad ottenere risultati complementari, la cui integrazione ha consentito una più completa conoscenza delle comunità in studio e delle loro dinamiche. In particolare l’approccio coltura-indipendente ha evidenziato una preponderanza delle specie *Lb. sanfranciscensis*, *Lb. brevis* e *C. humilis* negli impasti acidi delle tre produzioni dolci in esame; tali specie vengono frequentemente identificate negli impasti acidi utilizzati per le produzioni a lievitazione naturale a conferma della tradizionalità delle produzioni studiate. Inoltre, l’approccio coltura-dipendente ha permesso di evidenziare una successione microbica lungo due delle produzioni in esame: nell’ultimo impasto della produzione di Panettone e Ciambellona, la specie *Lb. sanfranciscensis* scompare e vengono rilevate le specie *Lb. plantarum* e *Leuconostoc mesenteroides*, ad evidenziare la grande sensibilità della comunità microbica degli impasti acidi ai cambiamenti dei parametri tecnologici di produzione. Tale dinamica di popolazione viene schematizzata in figura 2.

Il gruppo del professor Gobbetti, della Facoltà di Agraria di Bari ha condotto un gran numero di ricerche sui microrganismi degli impasti acidi. Qui si cita in particolare la ricerca finalizzata alla caratterizzazione molecolare e funzionale di ceppi di *Lb. sanfranciscensis* isolati da impasti acidi (De Angelis et al., 2007). Cinquanta isolati sono stati identificati e tipizzati con un approccio di indagine polifasico basato su analisi del genotipo: RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*); amplificazione del gene *rpoB* (per la subunità β dell’RNA) seguito da DGGE; rep-PCR e analisi del fenotipo: con *Biolog System* e saggio delle attività acidificante, proteolitica e peptidasica. I risultati ottenuti hanno nel loro insieme indicato che la formulazione di eventuali colture *starter* dovrebbe essere multi-ceppo, cioè basata sull’impiego di un certo numero di ceppi selezionati, sulla base di ognuna delle caratteristiche tecnologiche di interesse.

La comunità microbica degli impasti acidi per la produzione della Pizza napoletana è stata oggetto di ricerca, ovviamente, da parte del gruppo della Facoltà di Agraria di Portici del-

Panettone					
Fonte	A	B	C	D	E
Impasti acidi	✓ ◆	✓ ◆	◆	✓ ◆	□ ◆
mMRS	✓ □	✓ □	□	✓ □	□ ●
mSDB	✓ □	✓ □	□	✓ □	□ ● ▲
YPD	◆	◆	◆	◆	◆
Panettone "Sugar-free"					
Fonte	F	G	H	I	
Impasti acidi	✓ □ ◆ ●	✓ □ ◆	✓ □ ⊙	✓ □ ⊙	
mMRS	✓ □	✓ □	✓ □	✓ □	
mSDB	✓ □	✓ □	✓ □	✓ □	
YPD	◆	◆	◆ ⊙	◆ ⊙	
Ciambellona					
Fonte	L	M	N	O	P
Impasti acidi	✓ □ ◆	✓ □ ◆ ●	✓ □ ◆	✓ □ ◆	✓ □ ◆
mMRS	✓ □	✓ □	✓ □	✓ □	□ ●
mSDB	✓ □	✓ □	✓ □	✓ □	□ ●
YPD	◆	◆	◆	◆	◆
✓ <i>Lb. sanfranciscensis</i> ◆ <i>C. humilis</i> ▲ <i>Leu. mesenteroides</i> ● <i>C. milleri</i> □ <i>Lb. brevis</i> ⊙ <i>S. cerevisiae</i> ● <i>Lb. plantarum</i>					

Figura 2. Dinamiche delle popolazioni di batteri lattici e lieviti in impasti acidi per dolci lievitati, definite tramite PCR-DGGE (modificata da: Garofalo et al., 2008).

Figure 2. Population dynamics of LAB and yeasts in sourdoughs destined to the manufacture of sweets goods assessed by PCR-DGGE (modified from: Garofalo et al., 2008).

l'Università "Federico II" di Napoli. Dieci impasti campionati in ristoranti della città partenopea sono stati caratterizzati con riferimento alle proprietà microbiologiche chimiche e reologiche (Coppola et al., 1996). Lo studio ha permesso di evidenziare 5 diverse specie di lievito e 20 di batteri lattici, fra i 144 isolati raccolti. Gli impasti sono risultati caratterizzati da un rapporto batteri/lieviti molto più basso di quello comunemente riscontrato in tali matrici, per altre produzioni e le caratteristiche chimiche e reologiche sono risultate molto variabili, cosicché una correlazione è stata possibile soltanto per i dati concernenti pH, acidità titolabile e contenuto in acido acetico. Successivamente, 14 diversi *starter* per pizza, contenenti un ceppo di *Saccharomyces cerevisiae* o associazioni di questo con una o più specie di batteri lattici, sono stati presi in esame con riferimento alla loro influenza sulle caratteristiche finali della pizza. Anche in questo caso, il rapporto batteri lieviti si è mantenuto più basso rispetto ad altri tipi di *sourdoughs*. La presenza dei batteri lattici è ri-

sultata determinante ai fini delle caratteristiche reologiche della pizza e il contenuto in acidi organici è risultato, come atteso, funzione delle specie di batteri presenti nell'impasto (Coppola et al., 1998). Più recentemente, Pepe et al., 2003 ha selezionato colture di batteri lattici e lieviti sulla base delle caratteristiche proteolitiche (in saggi *in vitro* su proteine del glutine di frumento) e li hanno saggiati *in situ* come agenti lievitanti nella produzione di pizza. Gli impasti contenenti ceppi Prot⁺ mostravano un aumento delle proprietà viscoelastiche nel corso della fermentazione, se comparati con quelli contenenti ceppi Prot⁻. La pizza ottenuta con il primo tipo di impasti mostrava inoltre una maggiore consistenza della mollica.

Il paniere dei prodotti tradizionali del nostro paese è ricco di sorprese e alcuni degli alimenti fermentati legati alla tradizione locale sono poco conosciuti al di fuori del loro territorio. È questa una ragione in più per valorizzarli e farli conoscere. Il gruppo di ricerca della Università di Udine ha preso in esame le caratteristi-

che chimiche e microbiologiche della Brovada friulana, un prodotto della tradizione alimentare del Nord-est d'Italia, che si ottiene per fermentazione di rape (*Brassica rapa*). Il lavoro descrive il peculiare processo di produzione di questo alimento e i risultati delle analisi microbiologiche e chimiche condotte nel corso fermentazione spontanea (Maifreni et al., 2004). In particolare, sono stati isolate 225 colture di batteri lattici e 63 di lieviti, identificate mediante metodi fenotipici convenzionali, e sono stati analizzati i componenti volatili aromatici, via SPME-GC-MS. La popolazione dominante di batteri lattici è risultata composta sia da lattobacilli eterofermentativi sia da pediococchi omofermentativi; fra i lieviti sono risultati prevalenti specie del genere *Candida*.

Le bevande fermentate

Nella lista dei prodotti fermentati legati alla tradizione italiana non potevano mancare le bevande, prima fra tutti il vino, considerato il gran numero di DOC, DOCG e IGT che si producono nel nostro paese.

Fin dalla sua costituzione, il nostro gruppo di lavoro si è occupato dello studio della biodiversità dei lieviti autoctoni (Guerra et al., 1999a; 1999b; Mannazzu et al., 2002a; Ciani et al., 2004). In particolare, è stato studiato il polimorfismo del gene SED1 che in *S. cerevisiae* codifica per proteine di parete (Mannazzu et al., 2002b; Marinangeli et al., 2004a; 2004b). In base a tali indagini è stato messo a punto un metodo per il monitoraggio dei ceppi di lievito durante la fermentazione (Angelozzi et al., 2007).

Vista la sua collocazione geografica, il gruppo di ricerca della Facoltà di Agraria di Firenze non poteva non occuparsi dei lieviti responsabili della fermentazione vinaria. La biodiversità intraspecifica di *S. cerevisiae* è stata in questo caso investigata mediante analisi RFLP del DNA mitocondriale degli isolati di lievito. I risultati conseguiti hanno permesso di dimostrare come ogni fermentazione risultasse dominata da 1-3 ceppi e come i ceppi dominanti, isolabili anche nel vigneto di origine, mostrassero profili metabolici diversi (Augruso et al., 2006a; 2006b).

La diversità genotipica e fenotipica dei ceppi autoctoni di *Saccharomyces* spp. associati alla fermentazione spontanea del "Malvasia delle Lipari" è stata invece studiata con una combi-

nazione di tre metodi: ITS-PCR, RAPD e RFLP del DNA mitocondriale. Dei 192 isolati, 55 di *S. cerevisiae* sono stati caratterizzati, individuando 12 biotipi diversi (Agnolucci et al., 2007).

Il monitoraggio dei lieviti della fermentazione alcolica e il controllo della loro attività sono stati anche effettuati usando il sistema *Biolog* (DeNittis, 2009). Con questo metodo è stato possibile giungere sia ad una quantizzazione delle popolazioni di lievito, sia alla definizione della diversità specifica ed intra-specifica, ottenendosi risultati coerenti con quelli forniti dalla biotipizzazione genotipica.

Il vino non è la sola bevanda fermentata della tradizione italiana. Nel Nord-est è molto diffusa la produzione di birra, anche in micro-birrifici artigianali. Uno studio condotto presso l'Università di Udine ha riguardato in particolare la popolazione lattica coinvolta nella fermentazione di questi peculiari prodotti (Maifreni et al., 2008). La ricerca ha condotto alla identificazione degli isolati di batteri lattici, via RAPD e alla selezione, fra gli isolati stessi di quelli produttori di batteriocine. Lo stesso studio ha permesso di individuare marcatori molecolari (*horA*) indice di potenziale danno tecnologico.

Sicurezza delle produzioni alimentari tradizionali e tipiche

La sicurezza d'uso degli alimenti per quanto attiene gli aspetti microbiologici può ricondursi essenzialmente a due aspetti: la possibilità che essi siano veicolo di patogeni (agenti di infezioni o tossinfezioni alimentari) e la possibilità che microrganismi cresciuti in materie prime e ingredienti, o nei prodotti vi accumulino sostanze tossiche.

Per quanto riguarda il primo aspetto, per la salvaguardia dei prodotti tradizionali e tipici, così come per tutti gli alimenti, risulta di fondamentale importanza lo sviluppo di strumenti adeguati per la ricerca dei microrganismi patogeni. In un lavoro di Rantsiou et al., 2008 è stata ottimizzata una metodica di PCR quantitativa per la ricerca specifica di *Listeria monocytogenes*, un patogeno condizionale che può essere veicolato da formaggi e prodotti carnei, freschi e stagionati. La sensibilità della metodica è risultata pari a 100-1000 unità formanti colonie

per g o ml e, dopo 24 ore di arricchimento, è risultato possibile rilevare anche la presenza di una singola cellula. La metodica è stata anche verificata su campioni naturalmente contaminati.

Quanto alla possibile presenza di sostanze tossiche di origine microbica, rientrano in questa categoria: i) esotossine prodotte dai microrganismi agenti di intossicazioni alimentari; ii) micotossine che possono contaminare materie prime e ingredienti; iii) metaboliti microbici che possono venire prodotti nel corso delle trasformazioni, come amine biogene o etil carbammato, i cui effetti negativi sulla salute sono stati più recentemente presi in maggiore considerazione.

Le produzioni tradizionali e tipiche non sono esenti da tali problemi, anzi in molti casi possono essere considerate particolarmente vulnerabili per una serie di motivazioni: i processi produttivi si basano su procedure messe a punto empiricamente e talvolta sono ancora condotte con una conoscenza e un controllo solo parziali delle condizioni di processo. Esse generalmente non prevedono, almeno nell'originale schema produttivo, l'impiego di interventi di risanamento delle materie prime e anche l'uso di additivi, originariamente non previsto, è (o dovrebbe essere) evitato o ridotto al minimo.

Al fine di garantire che la sicurezza d'uso di tutte le produzioni tradizionali e tipiche raggiunga lo stesso livello dei processi industriali maggiormente standardizzati, occorre, da una parte, una maggiore conoscenza dei meccanismi che conducono al verificarsi delle condizioni di rischio e, dall'altra, la messa a punto di strumenti di controllo adeguati, se pure quanto più possibile rispettosi della natura tradizionale e territoriale di queste produzioni.

In anni recenti, la produzione di amine biogene in alimenti fermentati, a seguito dell'azione di microrganismi dotati di attività decarbossilasica sugli aminoacidi, è stata oggetto di numerose ricerche. Marino et al. (2008) hanno investigato il contenuto in amine biogene in tre *batches* di formaggio Montasio DOP. In tutti i casi, le concentrazioni rilevate sono risultate inferiori alla soglia individuata come tossica. La concentrazione più elevata è stata rilevata nel formaggio da latte termizzato addizionato di una coltura naturale di batteri lattici (latto-innesto), mentre l'uso di *starter* selezionati ha consentito di ottenere il più basso livello di amine biogene. L'attività aminoacido-decarbossilasica

è risultata molto diffusa tra i ceppi analizzati. Un'altra indagine dello stesso gruppo ha riguardato l'Asino, un formaggio della tradizione locale (Innocente et al., 2009); Coloretto et al., 2008 hanno invece dimostrato l'efficacia di una azione combinata di colture *starter* e additivi per il contenimento della produzione di amine biogene nei salami e il miglioramento dei loro profili sensoriali.

La produzione di amine biogene può costituire un rischio anche nel vino. In questo caso sono principalmente i batteri malolattici i responsabili delle reazioni di decarbossilazione degli aminoacidi con produzione delle amine tossiche. Studi su questo aspetto (Guerrini et al., 2002; Granchi et al., 2005) hanno dimostrato che *Oenococcus oeni*, la specie più frequentemente associata alla fermentazione malo-lattica, è in grado di produrre diverse amine biogene (istamina, putrescina, cadaverina) e che tale capacità è molto variabile fra i diversi ceppi (ceppo-specifica). Fondamentali risultano infatti le attitudini metaboliche dei ceppi e le loro associazioni: è stato dimostrato come l'associazione metabiotica tra ceppi di *O. oeni* capaci di metabolizzare arginina a ornitina (ma incapaci di decarbossilare ornitina) e ceppi capaci di degradare ornitina a putrescina (ma incapaci di degradare arginina) contribuisce all'accumulo di putrescina in vino (Mangani et al., 2005).

Il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Foggia partecipa come Unità operativa (responsabile: Giuseppe Spano) al Progetto europeo BIAMFOOD (*Controlling biogenic amines in traditional food fermentations in regional Europe*), nell'ambito del VII PQ e si occuperà in particolare di studiare questa problematica in vino.

Un altro potenziale rischio concernente il vino è la presenza di ocratossina A (OTA) oltre il limite soglia, oggi previsto per legge pari a 2ppb. Al fine di contrastare questo rischio, è stata studiata l'interazione tra OTA e 20 ceppi di lievito, appartenenti alle specie *S. cerevisiae* e *Kloeckera apiculata* (Angioni et al., 2007). I risultati ottenuti hanno indicato che le cellule di lievito non assorbono OTA; alcuni ceppi hanno mostrato la capacità di ridurre i livelli di questo composto, anche in questo caso con specificità di ceppo.

Considerato il rischio che le muffe possono produrre micotossine, la contaminazione funghi-

na degli alimenti deve essere vista come un potenziale decremento non soltanto della qualità sensoriale, ma anche della sicurezza d'uso. Per tale motivo rivestono particolare interesse gli studi condotti con la finalità di selezionare ceppi di batteri lattici con proprietà antifungina fra gli isolati (Coloretti et al., 2007). Ceppi di *Lb. plantarum* e *Lb. sakei* sono risultati diversamente attivi contro *Aspergillus candidus* e *Penicillium nalgiovense* e il principio attivo prodotto dal ceppo con la maggiore attività è stato parzialmente caratterizzato.

Altre ricerche sono state finalizzate all'uso di microrganismi come colture protettive o "bioconservanti". Il Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroambientali dell'Università *Alma Mater Studiorum* di Bologna partecipa come Unità operativa (responsabile: Bruno Biavati) al Progetto Europeo: *Control and prevention of emergine and future pathogens at cellular level throughout the food chain*, nell'ambito del sesto Programma quadro dell'Unione Europea (VI PQ). In particolare l'Unità operativa di Bologna ha il compito di selezionare microrganismi ad attività probiotica e protettiva in prodotti lattiero caseari e carnei.

L'impiego di microrganismi antagonisti potrebbe consentire di ridurre o eliminare l'aggiunta di additivi. Potrebbero svolgere questo ruolo i lieviti cosiddetti *killer*, capaci di sintetizzare tossine attive contro lieviti selvaggi o lieviti alterativi, possibile via per la eliminazione o riduzione dell'impiego di SO₂ in vinificazione. Con questa finalità sono state studiate le tossine *killer* prodotte da *Kluyveromyces phaffi*, *Pichia anomala* e *Kluyveromyces wickerhamii* (Comitini et al., 2004a; 2004b).

C'è poi "lo strano caso" del lievito *Pichia fermentans* che si comporta da patogeno nei confronti delle pesche, mentre presenta attività protettiva contro l'infezione da *Monilia* nelle mele (Giobbe et al., 2007). Il dimorfismo di questo lievito (filamentoso-patogeno o lievitifforme-protettivo) è oggetto di un progetto PRIN 2008, di cui è coordinatore nazionale Marilena Budroni, dell'Università di Sassari.

Conclusioni

Nei paragrafi precedenti, sono stati riportati, in estrema sintesi, i contributi fatti pervenire dai

soci SIMTREA, concernenti, se pure con modalità diverse, tutela e valorizzazione di prodotti della nostra tradizione alimentare.

In ultimo, ma non ultimi, vanno ancora citati due lavori di ricerca, degni di nota in particolare per la caratteristica di interdisciplinarietà.

La prima ricerca, relativa all'impiego di probiotici e prebiotici per la produzione di carni biologiche (Modesto et al., 2008; Trevisi et al., 2008), risulta inserita nel VI PQ e mette in gioco competenze di Microbiologia Agraria e di Zootecnia. La seconda riguarda invece la microbiologia del suolo e in particolare l'uso di inoculi microbici rizosferici per il miglioramento della produttività e della qualità di varietà di mais autoctone del Piemonte (Aimo et al., 2008).

Entrambi questi lavori costituiscono un esempio di proficua interazione tra settori scientifico disciplinari di ambito agrario, interazione che risulta fondamentale per lo sviluppo della ricerca nell'agro-alimentare e costituisce uno degli obiettivi dell'AISSA. Il potenziamento di ricerche si persegue infatti anche attraverso la realizzazione di occasioni di confronto tra i ricercatori dei diversi settori interdisciplinari, come il Convegno AISSA e questi Atti, cui si spera che questa breve rassegna abbia fornito un utile contributo.

Ringraziamenti

A tutti i contributori vanno i nostri sentiti ringraziamenti e le scuse per eventuali errori ed omissioni.

Bibliografia

- Agnolucci M., Scarano S., Santoro S., Sassano C., Toffanin A., Nuti M. 2007. Genetic and phenotypic diversity of autochthonous *Saccharomyces* spp. strains associated to natural fermentation of "Malvasia delle Lipari". Lett. Appl. Microbiol., 45, 6:657-662.
- Aimo S., Bertolone E., Bardi L. 2008. Rhizospheric microbial inoculum addition to soil in maize cultivation to reduce the environmental impact of mineral fertilization and improve yield and product quality. It. J. Agron., 3 suppl.:75.
- Angelozzi D., Clementi F., Ciani M., Mannazzu I. 2007. Dominanza di starter commerciali nel corso di fermentazioni inoculate: analisi di trentasei vinificazioni industriali. Vigne e Vini, 1:61-64.

- Angioni A., Caboni P., Garau A., Farris A., Orro D., Budroni M., Cabras P. 2007. In vitro interaction between ochratoxin A and different strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. J. Agric. Food Chem., 55, 5:2043-2048.
- Aponte M., Fusco V., Andolfi R., Coppola S. 2008. Lactic acid bacteria occurring during manufacture and ripening of Provolone del Monaco cheese: detection by different analytical approaches. Int. Dairy J., 18:403-413.
- Aquilanti L., Zannini E., Dell'Aquila L., Zocchetti A., Clementi F. 2006. Resident lactic acid bacteria in raw milk Canestrato Pugliese cheese. Lett. Appl. Microbiol., 43, 2:161-167.
- Aquilanti L., Zannini E., Zocchetti A., Osimani A., Clementi F. 2007a. Polyphasic characterization of indigenous lactobacilli and lactococci from PDO Canestrato Pugliese cheese. LWT-Food Sci. Technol., 40:1146-1155.
- Aquilanti L., Silvestri G., Zannini E., Osimani A., Santarelli S., Clementi F. 2007b. Phenotypic, genotypic and technological characterization of resident lactic acid bacteria in Pecorino cheese from central Italy. J. Appl. Microbiol., 103, 4:948-960.
- Aquilanti L., Santarelli S., Silvestri G., Osimani A., Petruzzelli A., Clementi F. 2007c. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. Int. J. Food Microbiol., 120, 1-2:136-145.
- Augruso S., Granchi L., Vincenzini M. 2006a. Biodiversità intraspecifica di *Saccharomyces cerevisiae* e ambiente vitivinicolo. Vite Vino Qualità, 7.
- Augruso S., Ganucci D., Buscioni G., Granchi L., Vincenzini M. 2006b. A ogni cantina il suo lievito? Vite Vino Qualità, 5.
- Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G., Villani F., Andolfi R., Moschetti G. 2002. 16S-23S rDNA intergenic spacer region polymorphism of *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus raffinolactis* and *Lactococcus lactis* as revealed by PCR and nucleotide sequence analysis. Syst. Appl. Microbiol., 25, 4:520-527.
- Blaiotta G., Pennacchia C., Ercolini D., Moschetti G., Villani F. 2003. Combining denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA V3 region and 16S-23S rDNA spacer region polymorphism analyses for the identification of staphylococci from Italian fermented sausages. Syst. Appl. Microbiol., 26, 3:423-33.
- Blaiotta G., Pennacchia C., Villani F., Ricciardi A., Tofalo R., Parente E. 2004a. Diversity and dynamics of communities of coagulase-negative staphylococci in traditional fermented sausages. J. Appl. Microbiol., 97, 2:271-284.
- Blaiotta G., Ercolini D., Mauriello G., Salzano G., Villani F. 2004b. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus equorum* by a species-specific PCR assay targeting the *sodA* gene. System. Appl. Microbiol., 27:696-702.
- Blaiotta G., Fusco V., Ercolini D., Aponte M., Pepe O., Villani F. 2008. *Lactobacillus* strain diversity based on partial *hsp60* gene sequences and design of PCR-restriction fragment length polymorphism assays for species identification and differentiation. Appl. Environ. Microbiol., 74, 1:208-215.
- Ciani M., Mannazzu I., Marinangeli P., Clementi F., Martini A. 2004. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. Antonie Van Leeuwenhoek, 85, 2:159-164.
- Ciarrocchi F., Natale V., Aquilanti L., Clementi F. 2006. Autochthonous lactic acid bacteria in the production of mozzarella cheese. Austr. J. Dairy Technol., 61, 2:122.
- Coda R., Brechany E., De Angelis M., De Candia S., Di Cagno R., Gobbetti M. 2006. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of nine Italian ewes' milk cheeses. Austr. Dairy Sci. Ass., 89:4126-4143.
- Coloretti F., Carri S., Armaforte E., Chiavari C., Grazia L., Zambonelli C. 2007. Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. FEMS Microbiol. Lett., 1, 2:245-250.
- Coloretti F., Chiavari C., Armaforte E., Carri S., Castagnetti G.B. 2008. Combined use of starter cultures and preservatives to control production of biogenic amines and improve sensorial profile in low-acid salami. J. Agric. Food Chem., 56, 23:11238-11244.
- Comitini F., De Ingeniis J., Pepe L., Mannazzu I., Ciani M. 2004a. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. FEMS Microbiol. Lett., 238, 1:235-240.
- Comitini F., Di Pietro N., Zacchi L., Mannazzu I., Ciani M. 2004b. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. Microbiol., 150(Pt 8):2535-2541.
- Coppola S., Pepe O., Masi P., Sepe M. 1996. Characterization of leavened doughs for pizza in Naples. Adv. Food Sci., 18, 5/6:160-162.
- Coppola S., Pepe O., Mauriello G. 1998. Effect of leavening microflora on pizza dough properties. J. Appl. Microbiol., 5:891-897.
- De Angelis M., Di Cagno R., Gallo G., Curci M., Siragusa S., Crecchio C., Parente E., Gobbetti M. 2007. Molecular and functional characterization of *Lactobacillus sanfranciscensis* strains isolated from sourdoughs. Int. J. Food Microbiol., 114:69-82.
- De Angelis M., de Candia S., Calasso M.P., Faccia M., Guinee T.P., Simonetti M.C., Gobbetti M. 2008. Selection and use of autochthonous multiple strain cultures for the manufacture of high-moisture traditional Mozzarella cheese. Int. J. Food Microbiol., 125, 2:123-132.
- DeNittis M. 2009. Biology and Biotechnology of Fungi. Tesi di Dottorato, Università di Torino.
- Di Cagno R., Buchin S., de Candia S., De Angelis M., Fox P.F., Gobbetti M. 2007. Characterization of Italian cheeses ripened under nonconventional conditions. J. Dairy Sci., 90, 6:2689-2704.
- Di Cagno R., Chaves Lopez C., Tofalo R., Gallo G., De Angelis M., Paparella A., Hammes W.P., Gobbetti M. 2008. Comparison of the compositional, microbiological, biochemical and volatile profile characteristics of three Italian PDO fermented sausages. Meat Sci., 79:231-235.

- Dolci P., Alessandria V., Zeppa G., Rantsiou K., Cocolin L. 2008a. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiol.*, 25, 2:392-399.
- Dolci P., Alessandria V., Rantsiou K., Rolle L., Zeppa G., Cocolin L. 2008b. Microbial dynamics of Castelmagno PDO, a traditional Italian cheese, with a focus of lactic acid bacteria ecology. *Int. J. Food Microbiol.*, 122:302-311.
- Dolci P., Barmaz A., Zenato S., Pramotton R., Alessandria V., Cocolin L., Rantsiou K., Ambrosoli R. 2009. Maturing dynamics of surface microflora in Fontina PDO cheese studied by culture-dependent and -independent methods. *J. Appl. Microbiol.*, 106, 1:278-287.
- Ercolini D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Methods*, 56, 3:297-314.
- Ercolini D., Frisso G., Mauriello G., Salvatore F., Coppola S. 2008. Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 124, 2:164-170.
- Garofalo C., Silvestri G., Aquilanti L., Clementi F. 2008. PCR-DGGE analysis of lactic acid bacteria and yeasts dynamics during the production processes of three varieties of Panettone. *J. Appl. Microbiol.*, 105, 1:243-254.
- Gatti M., Lazzi C., Rossetti L., Mucchetti G., Neviani E. 2003. Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano Reggiano cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 95:463-470.
- Gatti M., Trivisano C., Fabrizi E., Neviani E., Gardini F. 2004. Biodiversity among *Lactobacillus helveticus* strains isolated from different natural whey starter cultures as revealed by classification trees. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:182-190.
- Gatti M., Bernini V., Lazzi C., Neviani E. 2006. Fluorescence microscopy for studying the viability of microorganisms in natural whey starters. *Lett. Appl. Microbiol.*, 42, 4:338-343.
- Giobbe S., Marceddu S., Scherm B., Zara G., Mazzarello V.L., Budroni M., Migheli Q. 2007. The strange case of a biofilm-forming strain of *Pichia fermentans*, which controls Monilinia brown rot on apple but is pathogenic on peach fruit. *FEMS Yeast Res.*, 7, 8:1389-1398.
- Granchi L., Romano P., Mangani S., Guerrini S., Vincenzini M. 2005. Production of biogenic amines by wine microorganisms. *Bulletin O.I.V.*, 78, 895-896:595-609.
- Guerra E., Mannazzu I., Sordi G., Tangherlini M., Clementi F., Faticenti F. 1999a. Characterization of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* from the Italian region of Marche: hunting for new strains for local wine quality improvement. *Ann. di Microbiol. e Enzimol.*, 49:79-88.
- Guerra E., Sordi G., Mannazzu I., Clementi F., Faticenti F. 1999b. Occurrence of wine yeasts on grapes subjected to different pesticide treatments. *It. J. Food Sci.*, 11:221-230.
- Guerrini S., Mangani S., Granchi L., Vincenzini M. 2002. Biogenic amine production by *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.*, 44:374-378.
- Innocente N., Marino M., Marchesini G., Biasutti M. 2009. Presence of biogenic amines in a traditional salted Italian cheese. *Int. J. Dairy Technol.*, 62. doi:10.1111/j.1471-0307.2009.00479.x.
- Maifreni M., Marino M., Conte L. 2004. Lactic acid fermentation of *Brassica rapa*: chemical and microbial evaluation of a typical Italian product (*brovada*). *Eur. Food Res. Technol.*, 218:469-473.
- Maifreni M., Bartolomeoli I., Sebastianutto N., Frigo F., Marino M. 2008. Spoilage ability of lactic acid bacteria isolated from craft beer. *Proceedings 21st International ICFMH Symposium, Food Micro – Evolving microbial food quality and safety*. Aberdeen, Scotland, 366.
- Mangani S., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M. 2005. Putrescine accumulation in wine: role of *Oenococcus oeni*. *Curr. Microbiol.*, 51, 1:6-10.
- Mannazzu I., Clementi F., Ciani M. 2002a. Strategies and criteria for the isolation and selection of autochthonous starters. In: Ciani M. (ed.): *Biodiversity and Biotechnology of wine yeasts*. Research Signpost Publ., Trivandrum, India.
- Mannazzu I., Simonetti E., Marinangeli P., Guerra E., Budroni M., Thangavelu M., Bowen S., Wheals A., Clementi F. 2002b. SED1 gene length and sequence polymorphisms in feral strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 11:5437-5444.
- Marinangeli P., Clementi F., Ciani M., Mannazzu I. 2004a. SED1 polymorphism within the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Res.*, 5, 1:73-79.
- Marinangeli P., Angelozzi D., Ciani M., Clementi F., Mannazzu I. 2004b. Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterization. *FEMS Yeast Res.*, 4, 4-5:427-435.
- Marino M., Maifreni M., Rondinini G. 2003. Microbiological characterization of artisanal Montasio Cheese: analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 229:133-140.
- Marino M., Maifreni M., Bartolomeoli I., Rondinini G. 2008. Evaluation of amino acid-decarboxylative microbiota throughout the ripening of an Italian PDO cheese produced using different manufacturing practices. *J. Appl. Microbiol.*, doi:10.1111/j.1365-2672.2008.03793.x.
- Mauriello G., Moio L., Genovese A., Ercolini D. 2003. Relationships between flavoring capabilities, bacterial composition, and geographical origin of natural whey cultures used for traditional water-buffalo mozzarella cheese manufacture. *J. Dairy Sci.*, 2:486-497.
- Mauriello G., Casaburi G., Blaiotta G., Villani F. 2004. Isolation and technological properties of coagulase negative staphylococci from fermented sausages of Southern Italy. *Meat Sci.*, 67:149-158.
- Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, Decreto luglio 2000, 21-07-2009. Supplemento ordinario della Gazzetta Ufficiale Serie Generale n. 194.

- Modesto M., D'Aimmo M.R., Stefanini I., Trevisi P., De Filippi S., Caini L., Mazzoni M., Bosi P., Biavati B. 2008. A Novel strategy to select bifidobacterium strains and prebiotic as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Science*.
- Moschetti G., Blaiotta G., Aponte M., Catzeddu P., Villani F., Deiana P., Coppola S. 1998. Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism: powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 85, 1:25-36.
- Pepe O., Villani F., Oliviero D., Greco T., Coppola S. 2003. Effect of proteolytic starter cultures as leaving agents of pizza dough. *Int. J. Food Microbiol.*, 84:319-326.
- Rantsiou K., Urso R., Iacumin L., Cantoni C., Cattaneo P., Comi G., Cocolin L. 2005. Culture-dependent and -independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71, 4:1977-1986.
- Rantsiou K., Alessandria V., Urso R., Dolci P., Cocolin L. 2008. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 1:99-105.
- Rossetti L., Fornasari M.E., Gatti M., Lazzi C., Neviani E., Giraffa G. 2008. Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. *Int. J. Food Microbiol.*, 127:168-171.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4:406-425.
- Santarelli M., Gatti M., Lazzi C., Bernini V., Zapparoli G.A., Neviani E. 2008. Whey starter for Grana Padano cheese: effect of technological parameters on viability and composition of the microbial community. *J. Dairy Sci.*, 91, 3:883-891.
- Silvestri G., Aquilanti L., Santarelli S., Manconi L., Raffaelli N., Clementi F. 2006. Real-time PCR for quantification and identification of lactic acid bacteria in fermented sausages. *Proceedings FoodMicro2006*, 29 August-2 September, Bologna, Italy, 449.
- Silvestri G., Santarelli S., Aquilanti L., Beccaceci A., Osmani A., Tonucci F., Clementi F. 2007. Investigation of the microbial ecology of Ciauscolo, a traditional Italian salami, by culture-dependent techniques and PCR-DGGE. *Meat Sci.*, 77:413-423.
- Siragusa S., De Angelis M., Di Cagno R., Rizzello C.G., Coda R., Gobbetti M. 2007. Synthesis of gamma-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 22:7283-90.
- Trevisi P., De Filippi S., Minieri L., Mazzoni M., Modesto M., Biavati B., Bosi P. 2008. Effect of fructo-oligosaccharides and different doses of *Bifidobacterium animalis* in weaning diet on bacterial translocation and TLR' s gene expression. *Nutrition*, 24:1023-1029.
- Villani F., Casaburi A., Pennacchia C., Filosa L., Russo F., Ercolini D. 2007. Microbial ecology of the soppressata of Vallo di Diano, a traditional dry fermented sausage from southern Italy, and in vitro and in situ selection of autochthonous starter cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 17:5453-5463.
- Waterman M.S. 1995. *Introduction to computational biology*. Chapman & Hall, New York, 201-202.