



RELAZIONE FINALE

Convenzione di Ricerca: ACCERTAMENTO, MEDIANTE METODI MOLECOLARI, DELLA DIVERSITÀ MICROBICA RICORRENTE IN IMPASTI ACIDI IMPIEGATI PER LA PRODUZIONE DI PRODOTTI DA FORNO A LIEVITAZIONE NATURALE.

Committente: Fresystem S.p.A.

OBIETTIVO

Lo scopo del lavoro è stato quello di caratterizzare dal punto di vista microbiologico il lievito madre utilizzato in azienda e di monitorare il microbiota batterico durante la produzione di un cornetto a lievitazione naturale mediante sequenziamento ad alto rendimento (*high-throughput sequencing*) di geni microbici di interesse tassonomico (rRNA).

MATERIALI E METODI

Campioni

Le diverse tipologie di campione analizzate sono elencate nello schema riportato in Figura 1. I campioni analizzati sono stati prelevati durante 3 diversi processi di produzione, i risultati riportati di seguito rappresentano valori medi. Sono stati analizzati campioni di lievito madre, tre rinfreschi precedenti la lavorazione, biga a due diversi tempi di fermentazione, impasto lievitato e cornetto dopo lievitazione (Figura 1).



Gli intermedi di produzione sono stati così codificati:

- C1: Lievito madre (*Bambinello*)
- C2: I Rinfresco
- C3: II Rinfresco
- C4: III Rinfresco
- C5: Biga dopo 18 ore di lavorazione
- C6: Biga dopo 22 ore di lavorazione
- C7: Impasto
- C8: Prodotto dopo la levitazione

Su tutti i campioni sono stati effettuati conteggi mediante il metodo di rilevamento delle unità formanti colonie (UFC) per la ricerca di lieviti e batteri lattici.

Analisi molecolare

I campioni sono stati sottoposti ad estrazione del DNA e preparazione di librerie di ampliconi rRNA secondo protocolli riportati in letteratura (Ercolini et al., 2012). Il sequenziamento ad alto rendimento è stato ottenuto mediante procedura 454 (Roche) con sequenziatore GS Junior.

Analisi bioinformatica

Le sequenze ottenute sono state analizzate mediante l'utilizzo del software Qiime v. 1.7. Le analisi di alpha- e beta- diversity e le OTU network sono state effettuate con protocolli bioinformatici descritti in letteratura e già applicati in Dipartimento (De Filippis et al., 2013).



RISULTATI

I risultati dei conteggi microbici in piastra sono riportati in Tabella 1. Sono state rilevate alte cariche sia di batteri lattici che di lieviti durante tutta la lavorazione. Le differenze tra i conteggi nei campioni dalle diverse fasi di produzione non sono statisticamente significative. I risultati delle cariche microbiche indicano una concentrazione di lieviti e batteri lattici idonea per una fermentazione naturale.

Le sequenze ottenute sono state analizzate con il software QIIME (v1.7.0), scartando quelle che non superavano i filtri di qualità impostati. Sono state raggruppate in cluster con similarità del 97% e sequenze rappresentative di ogni cluster sono state analizzate per ottenere l'identificazione tassonomica e l'abbondanza relativa di ogni *OTU* (*Operational Taxonomic Unit*).

La lunghezza media dei frammenti sequenziati è stata di 492bp. Per verificare il livello di profondità di descrizione della comunità microbica per ogni campione, è stata effettuata l'analisi di rarefazione (alpha-diversity). Per ogni campione è stato descritto più del 99% del microbiota, indicando un ottimo livello di copertura della diversità microbica (Figura 2).

L'analisi delle sequenze ottenute ha permesso di identificare le *Operational Taxonomic Units* (OTUs), di cui 10 con un'incidenza maggiore dello 0.5%. I risultati sono riportati in Figura 3. Nel lievito madre e nei rinfreschi è stata riscontrata una netta dominanza di *Lactobacillus sanfranciscensis* (80-85%), mentre altri batteri lattici risultavano avere incidenze nettamente inferiori. Nelle successive fasi di lavorazione, ed in particolare nelle fasi di fermentazione della biga e dell'impasto, il *Lactobacillus sanfranciscensis*



(25-40%) è affiancato da altre specie microbiche di lattobacilli come *Lactobacillus plantarum* (fino al 30%) e da altri batteri lattici omofermentanti (*Streptococcus* sp.) ed eterofermentanti obbligati (*Weissella* sp. e *Leuconostoc* sp.). In tutti i campioni è stata rilevata una presenza di membri del *phylum Proteobacteria*.

Per quanto concerne i lieviti, la specie dominante identificata è stata *Saccharomyces cerevisiae*, presente sia nel lievito madre sia negli altri intermedi di lavorazione.

L'analisi della β - diversity (Weighted Unifrac), che permette un confronto tra i campioni sulla base della diversità filogenetica dei microrganismi in essi presenti, mostra un raggruppamento chiaro dei campioni in base alla fase di lavorazione di appartenenza evidenziando inoltre le similarità tra il lievito madre e i tre rinfreschi (Figura 4).

Il livello di diversità tra i campioni è apprezzabile anche dall'elaborazione dell'OTU-network. Tale rappresentazione mostra il livello di diversità tra i campioni basato sulla presenza e assenza delle specie microbiche evidenziando le specie ricorrenti soltanto in un campione e quelle invece condivise tra diversi campioni (Figura 5).



CONCLUSIONI

Nel processo produttivo analizzato, la fermentazione per la produzione di cornetto a lievitazione naturale sembra essere guidata da *Saccharomyces cerevisiae* e da batteri lattici la cui ricorrenza è dipendente dalla fase di lavorazione. La composizione del lievito madre è essenzialmente riconducibile alla presenza di *Lactobacillus sanfranciscensis* come specie dominante oltre al lievito.

Probabilmente a causa di fattori legati al processo, alcuni altri microrganismi presenti a più basse concentrazioni nel lievito madre, quali batteri lattici omofermentanti (*Streptococcus* sp.) ed eterofermentanti obbligati (*Weissella* sp. e *Leuconostoc* sp.), si sviluppano durante la preparazione della biga e contribuiscono all'ottenimento del prodotto finito.

Bibliografia

- Ercolini, D., De Filippis, F., La Stora, A., Iacono, M. 2012. "Remake" by high-throughput sequencing of the microbiota involved in the production of water buffalo mozzarella cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 8142–8145.
- De Filippis, F., La Stora, A., Villani, F., Ercolini, D. 2013. Exploring the sources of bacterial spoilers in beefsteaks by culture-independent high-throughput sequencing. *PLoS One* 8, e70222.

Portici, 14/01/2014

Il Responsabile Scientifico

Prof. Danilo Ercolini