



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI DI BARI  
ALDO MORO



*Associazione Nazionale degli Insegnanti  
di Scienze Naturali*



Centro di Ricerca  
Sperimentazione e Formazione  
in Agricoltura "BASILE CARAMIA"

# BIODIVERSITÀ MICROBICA E BIOTECNOLOGIE ALIMENTARI

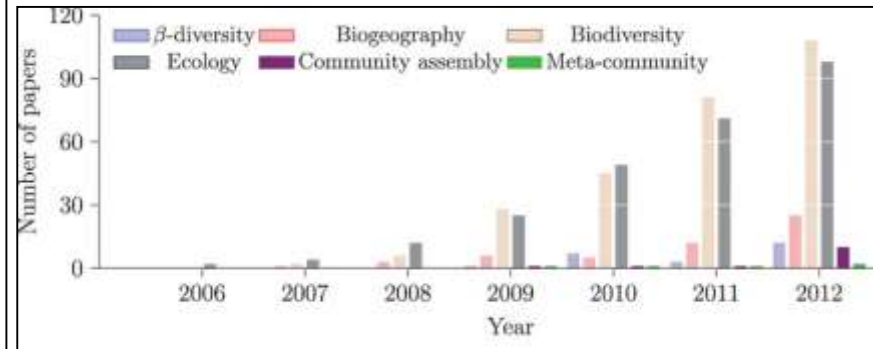
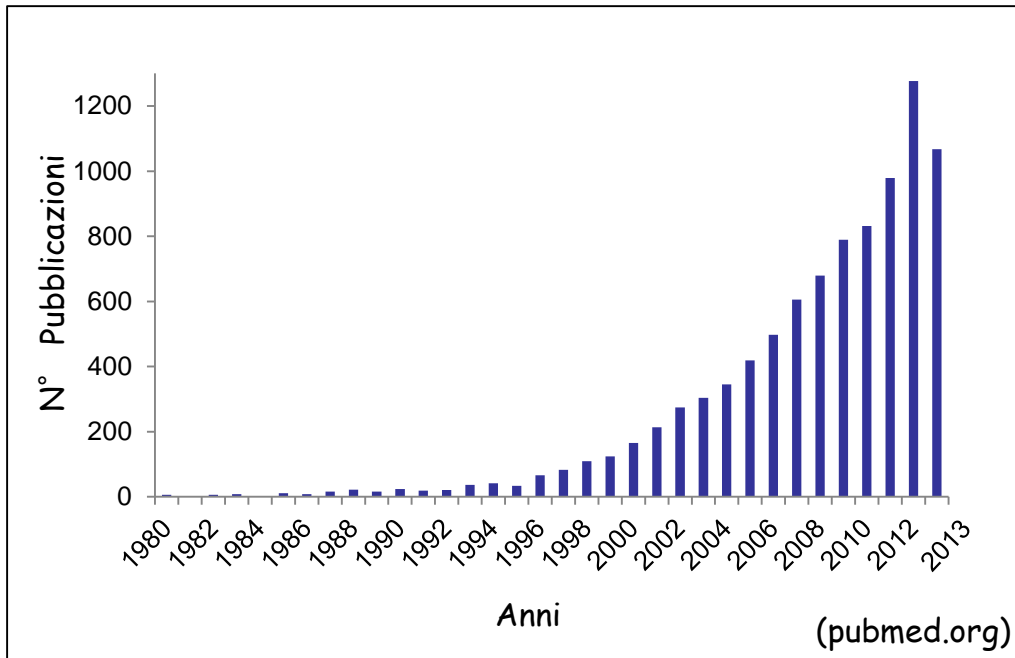
Marco Gobbetti

XVI Convegno Nazionale ANISN  
«Innovazione Didattica e Scelte Sostenibili  
per lo Sviluppo del Territorio»

Bari, 9-13 Settembre 2013



# Trend delle pubblicazioni sulla «biodiversità microbica»



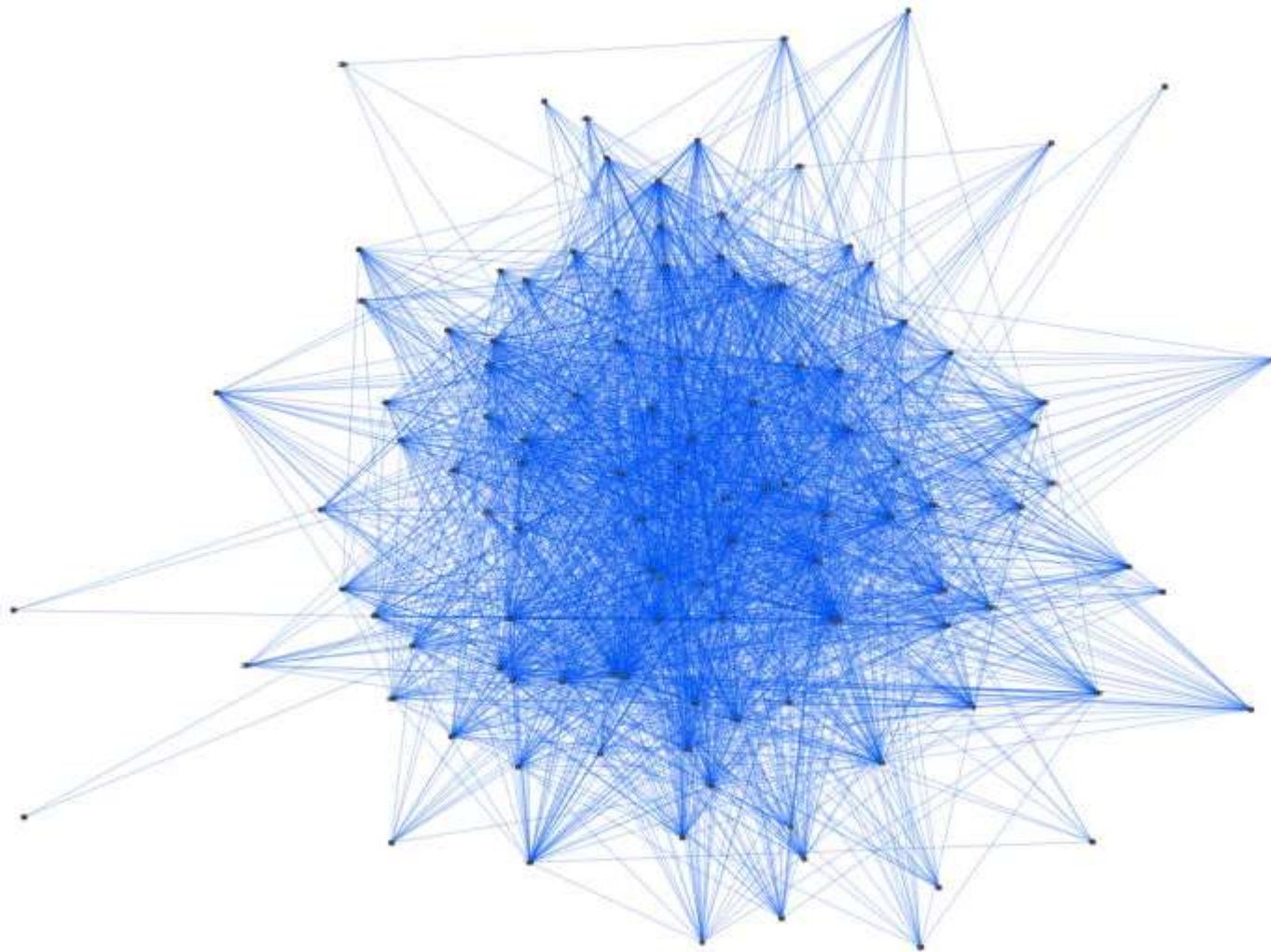
## “Uncultivable organisms”

- ✓ Su 100 phyla studiati attraverso analisi filogenetiche solo 30 contengono microorganismi coltivabili.
- ✓ 1 - 10% della diversità microbica è stata coltivata.

Zengler *et al.*, 2009. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, 73:712-729



# Rappresentazione network del microbioma intestinale umano



Naqvi *et al.*, 2013. *Chem. Biodivers.*, 7:1040-1050



# Il lievito naturale

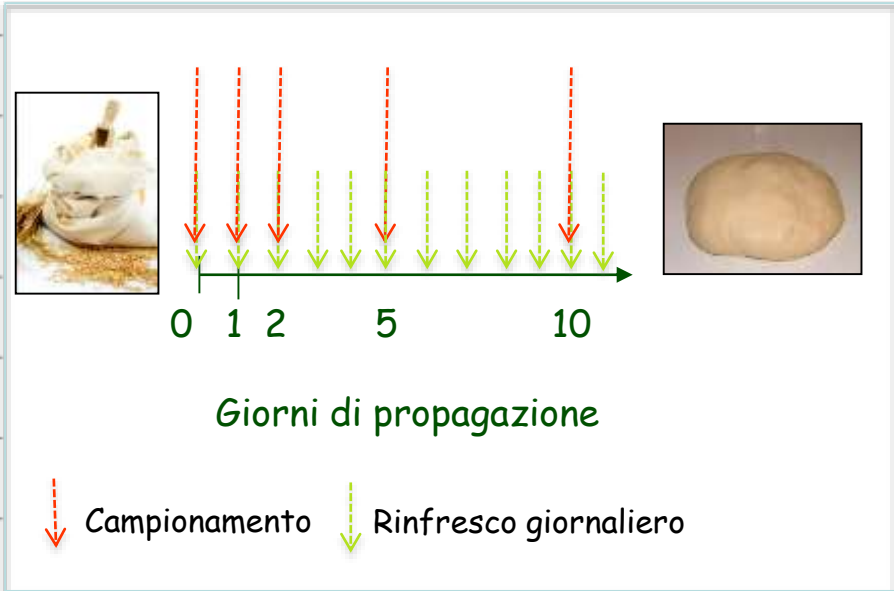
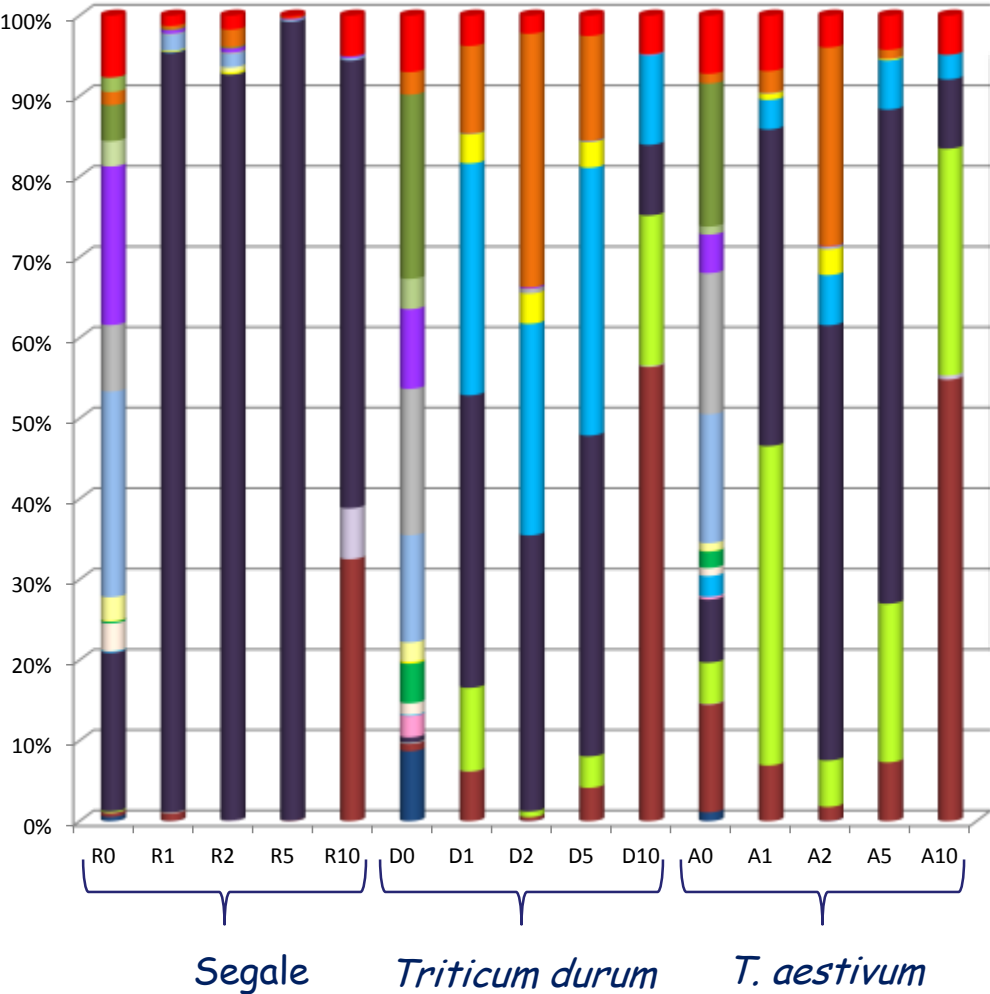
“Impasto costituito da farina (in genere di grano e/o segale), acqua ed eventualmente sale, fermentato senza l'intervento di microrganismi volontariamente aggiunti e ottenuto grazie ad una serie successiva di rinfreschi che hanno ottimizzato la capacità di acidificazione e di lievitazione.”

(Gobbetti e Corsetti, 2010. *Biotechnologia dei prodotti lievitati da forno*)



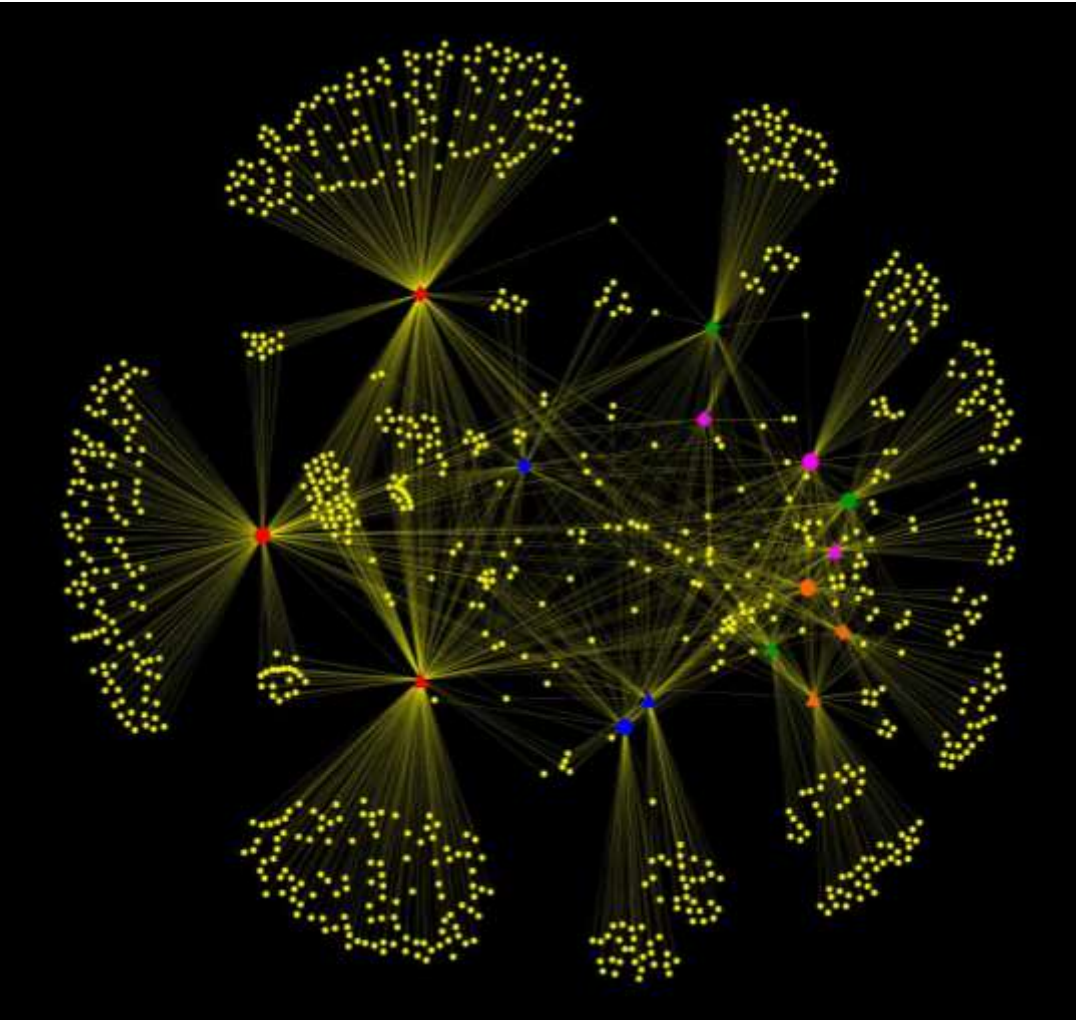
# Dinamiche dell'ecologia microbica

Ercolini et al., 2013.  
AEM, submitted



# Dinamiche dell'ecologia microbica

Simplified illustration of possible sourdough - microbe networks based on RNA data

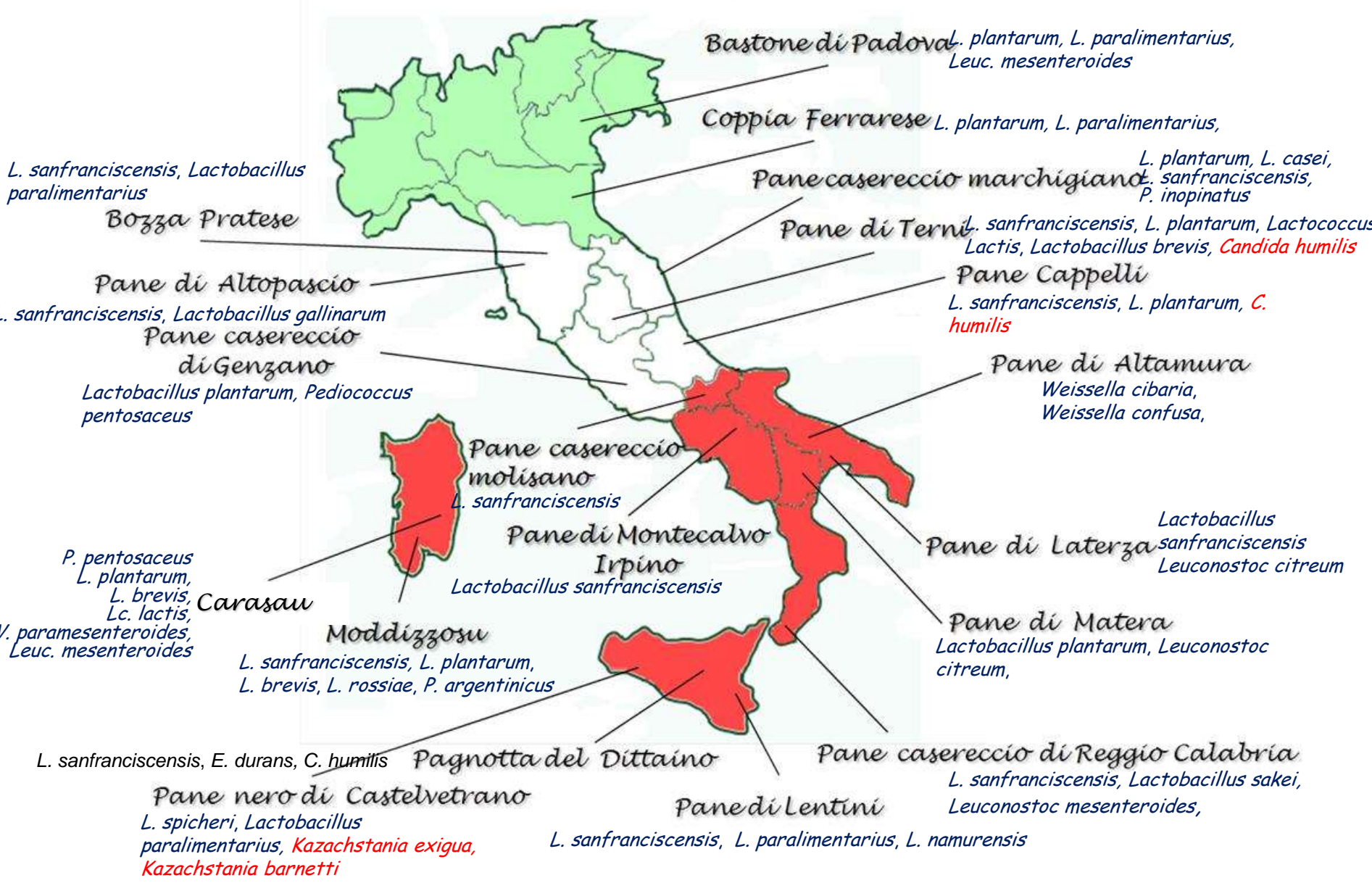


- ◆ R0
  - ◆ R1
  - ◆ R2
  - ◆ R5
  - ◆ R10
  - D0
  - D1
  - D2
  - D5
  - D10
  - ▲ T0
  - ▲ T1
  - ▲ T2
  - ▲ T5
  - ▲ T10
- Segale
- Triticum durum*
- T. aestivum*



# Biodiversità dei lieviti naturali italiani I

Minervini et al., 2012.  
*Applied Environ Microb*, 78:1251-1264



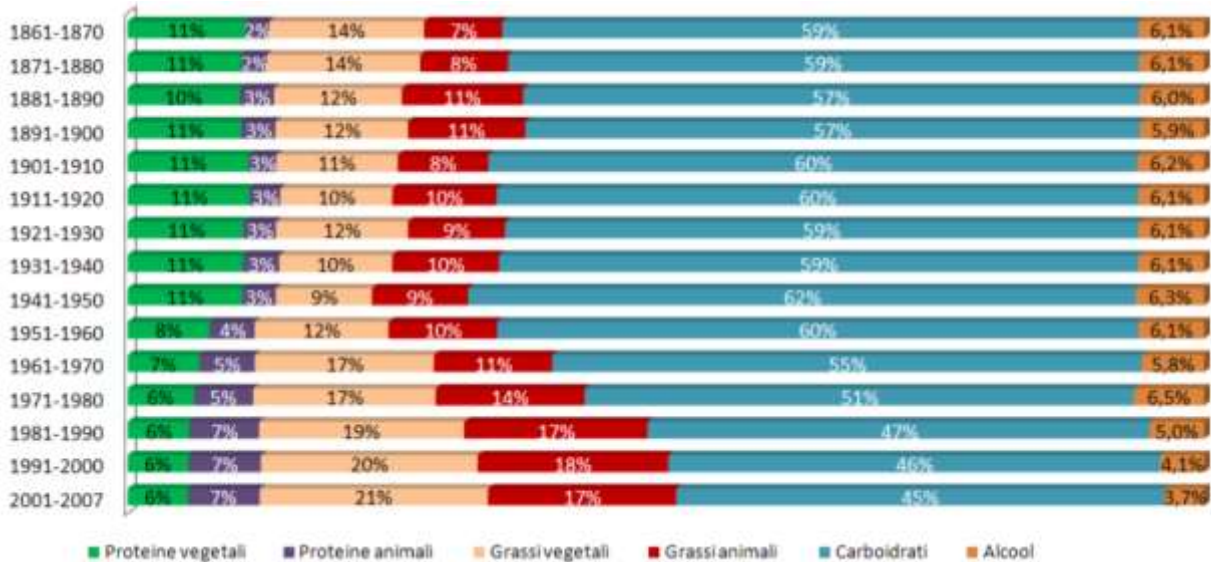
# Identificazione e caratterizzazione mediante analisi 16S rDNA dei batteri lattici

Lieviti naturali	Isolati	Ceppi	Specie (numero di ceppi)
Pane di Altamura PDO	39	14	<i>W. cibaria</i> (12), <i>W. confusa</i> (1)
Pane di Laterza	17	9	<i>L. sanfranciscensis</i> (4), <i>Leuc. citreum</i> (5)
Pane di Matera PGI	18	5	<i>L. plantarum</i> (1), <i>Leuc. citreum</i> (4)
Pane di Montecalvo Irpino	19	8	<i>L. sanfranciscensis</i> (7)
Pane casereccio di Reggio Calabria	19	11	<i>L. sanfranciscensis</i> (1), <i>L. sakei</i> (3), <i>Leuc. mesenteroides</i> (5)
Pane casereccio del Molise	24	8	<i>L. sanfranciscensis</i> (7)
Pane casareccio di Genzano PGI	22	12	<i>L. plantarum</i> (5), <i>P. pentosaceus</i> (5)
Bozza Pratese	28	6	<i>L. sanfranciscensis</i> (4), <i>L. paralimentarius</i> (1)
Pane di Altopascio Tradizionale	25	8	<i>L. gallinarum</i> (7), <i>L. sanfranciscensis</i> (1)
Pane di Terni	20	9	<i>L. sanfranciscensis</i> (1), <i>L. plantarum</i> (3), <i>Lc. lactis</i> (3), <i>L. brevis</i> (1)
Bastone di Padova	25	8	<i>L. plantarum</i> (1), <i>L. paralimentarius</i> (4), <i>Leuc. mesenteroides</i> (1)
Coppia ferrarese PGI	28	7	<i>L. plantarum</i> (4) <i>L. paralimentarius</i> (2)
Pane casereccio marchigiano	14	7	<i>L. plantarum</i> (2), <i>L. casei</i> (1), <i>L. sanfranciscensis</i> (1), <i>P. inopinatus</i> (2)
Pane Cappelli	18	10	<i>L. sanfranciscensis</i> (6), <i>L. plantarum</i> (2)
Moddizzosu	25	17	<i>L. Sanfranciscensis</i> (3), <i>L. plantarum</i> (1), <i>L. brevis</i> (7), <i>L. rossiae</i> (3), <i>P. argentinicus</i> (1)
Pane Carasau	29	13	<i>P. pentosaceus</i> (1), <i>L. plantarum</i> (7), <i>L. brevis</i> (1), <i>Lc. lactic</i> (1), <i>W. paramesenteroides</i> (1), <i>Leuc. mesenteroides</i> (1)
Pane nero di Castelvetro	32	9	<i>L. spicheri</i> (3), <i>L. paralimentarius</i> (4)
Pane di Lentini	20	9	<i>L. sanfranciscensis</i> (1), <i>L. paralimentarius</i> (4), <i>L. namurensis</i> (1)
Pagnotta del Dittaino PDO	10	7	<i>L. sanfranciscensis</i> (4), <i>E. durans</i> (3)





# Cambiamenti delle abitudini alimentari



■ Grasso animale

(INRAN, 2011)

I prodotti lattiero-caseari sono un punto fermo nelle linee guida dietetiche nei paesi occidentali



(Bach-Faig et al., 2012. Public Health Nutr.)

# Caratteristiche dei formaggi a ridotto contenuto in grasso

---

- Proprietà salutistiche
- Secchezza
- Durezza
- Gommosità
- Difficoltà alla masticazione
- *Flavour* atipici

(Costa et al., 2010, J. Dairy Sci. 93: 3469-3486; Banks, 2004. Int. J. Dairy Technol. 57: 199-207)



# Strategie impiegate per migliorare la qualità dei formaggi

- Uso di colture starter produttori di esopolisaccaridi (EPS)
- Uso di proteine del siero
- Uso di colture aggiunte

**Use of microparticulated whey protein concentrate, exo-polysaccharide (EPS)-producing *Streptococcus thermophilus* and adjunct cultures for making low-fat Italian Caciotta-type cheese**

**R. DI CAGNO<sup>1</sup>, I. DE PASQUALE<sup>1</sup>, M. DE ANGELIS<sup>1</sup>, S. BUCHIN<sup>2</sup>, C. G. RIZZELLO<sup>1</sup>,  
AND M. GOBBETTI<sup>1</sup>**

*(J. Dairy Sci. under revision)*



# Produzione di un formaggio "low fat" su scala industriale

(Maturazione a 10° C per 28 giorni)



**FFC** Latte bovino pastorizzato *Streptococcus thermophilus* ST042 (EPS<sup>-</sup>)



**LFC** Latte bovino pastorizzato scremato *St. thermophilus* ST042 (EPS<sup>-</sup>)



**LFC - MWPC** *St. thermophilus* ST042 (EPS<sup>-</sup>) + concentrato di proteine del siero microparticolato



**LFC - MWPC-EPS** *St. thermophilus* ST446 (EPS<sup>+</sup>)



**LFC - MWPC-EPS-A** *St. thermophilus* ST446 (EPS<sup>+</sup>) + *Lactobacillus plantarum* LP e *Lactobacillus rhamnosus* LRA

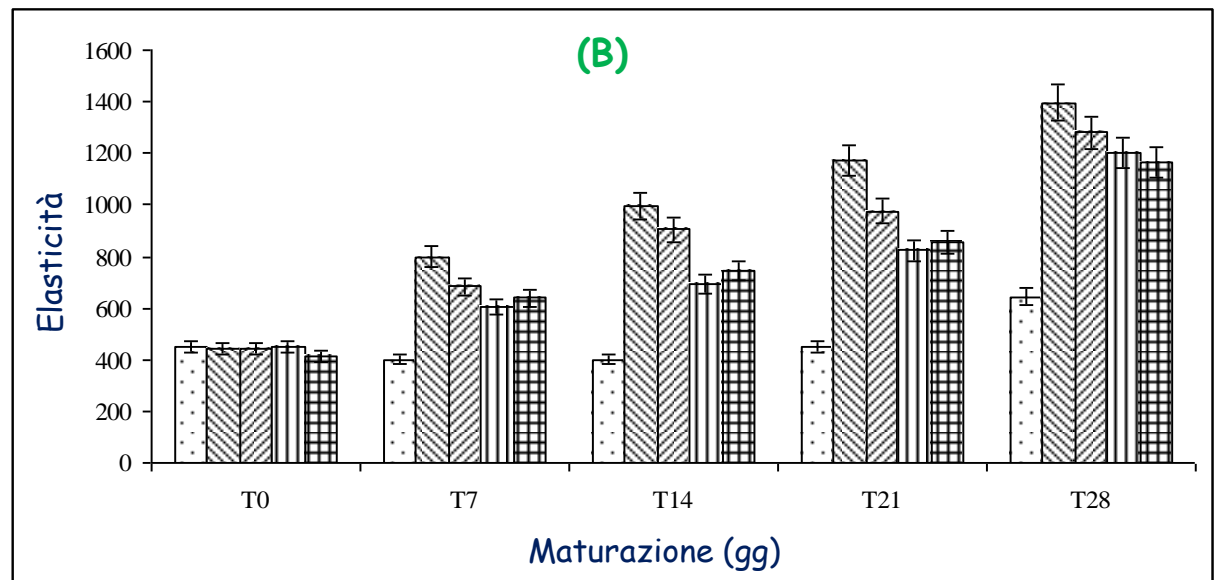
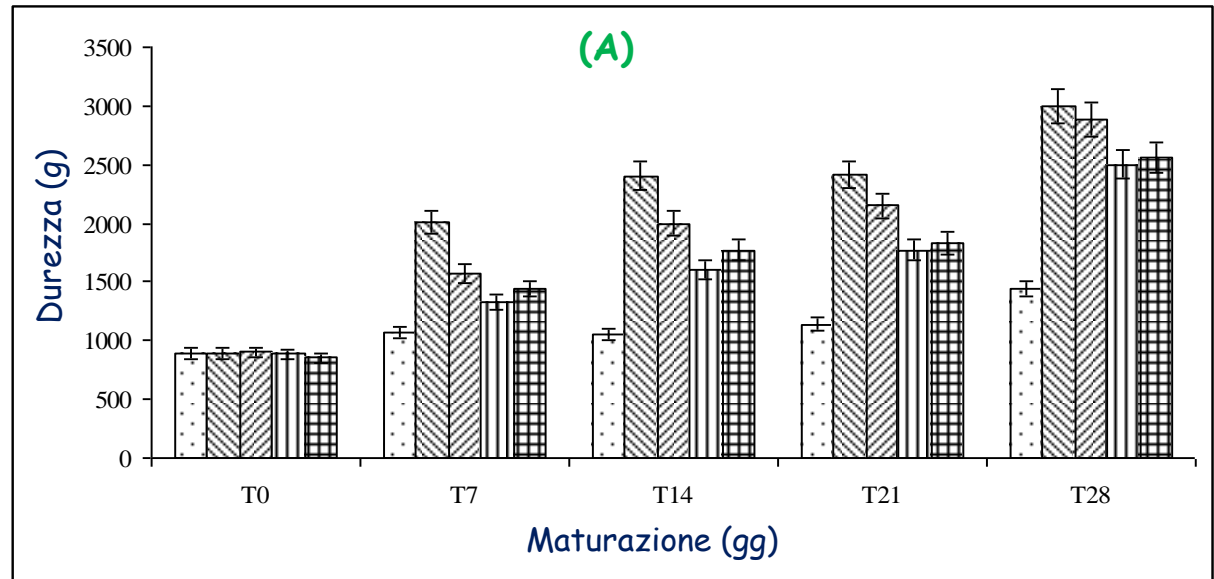


# Resa e composizione chimica dei formaggi a fine maturazione

Formaggio	pH	Umidità %	Grasso %	Proteine %	NaCl %	Resa kg/ 100 kg
<b>FFC</b>	<b>5,31± 0,1</b>	<b>51,6± 0,7</b>	<b>22,6±0,8</b>	<b>24,5± 0,8</b>	<b>0,61± 0,04</b>	<b>15 ± 0,6</b>
LFC	5,25±0,2	53,0±0,9	5,5± 0,3	38,1± 0,6	0,77±0,06	9 ± 0,6
LFC - MWPC	5,25±0,2	57,5±0,5	5,6± 0,2	33,0± 0,4	0,77±0,06	10 ± 0,6
LFC - MWPC- EPS	5,27±0,2	60,2± 1,1	5,0± 0,3	30,7± 0,9	0,78±0,06	12 ± 0,8
<b>LFC - MWPC- EPS-A</b>	<b>4,93±0,1</b>	<b>60,5±1,1</b>	<b>5,0± 0,3</b>	<b>31,0± 0,8</b>	<b>0,77±0,06</b>	<b>12 ± 0,5</b>

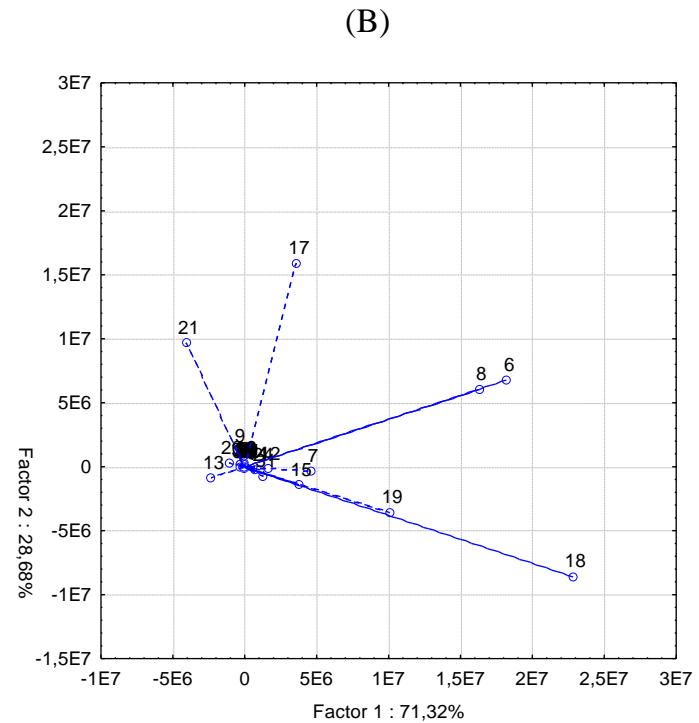
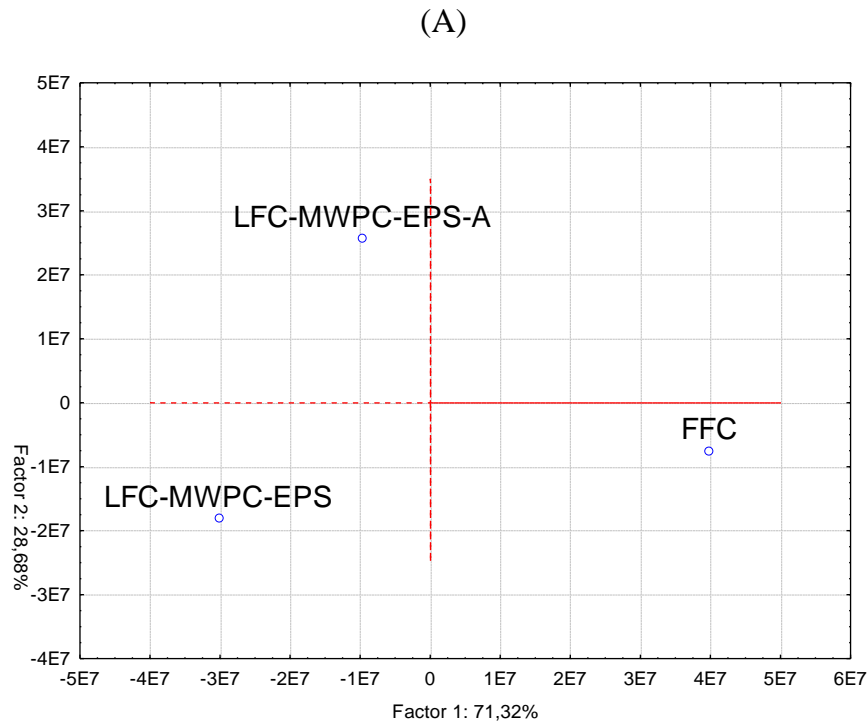


# Analisi strutturale dei formaggi durante la maturazione



- FFC
- ▨ LFC
- ▩ LFC - MWPC
- ▭ LFC - MWPC-EPS
- ▧ LFC - MWPC-EPS-A

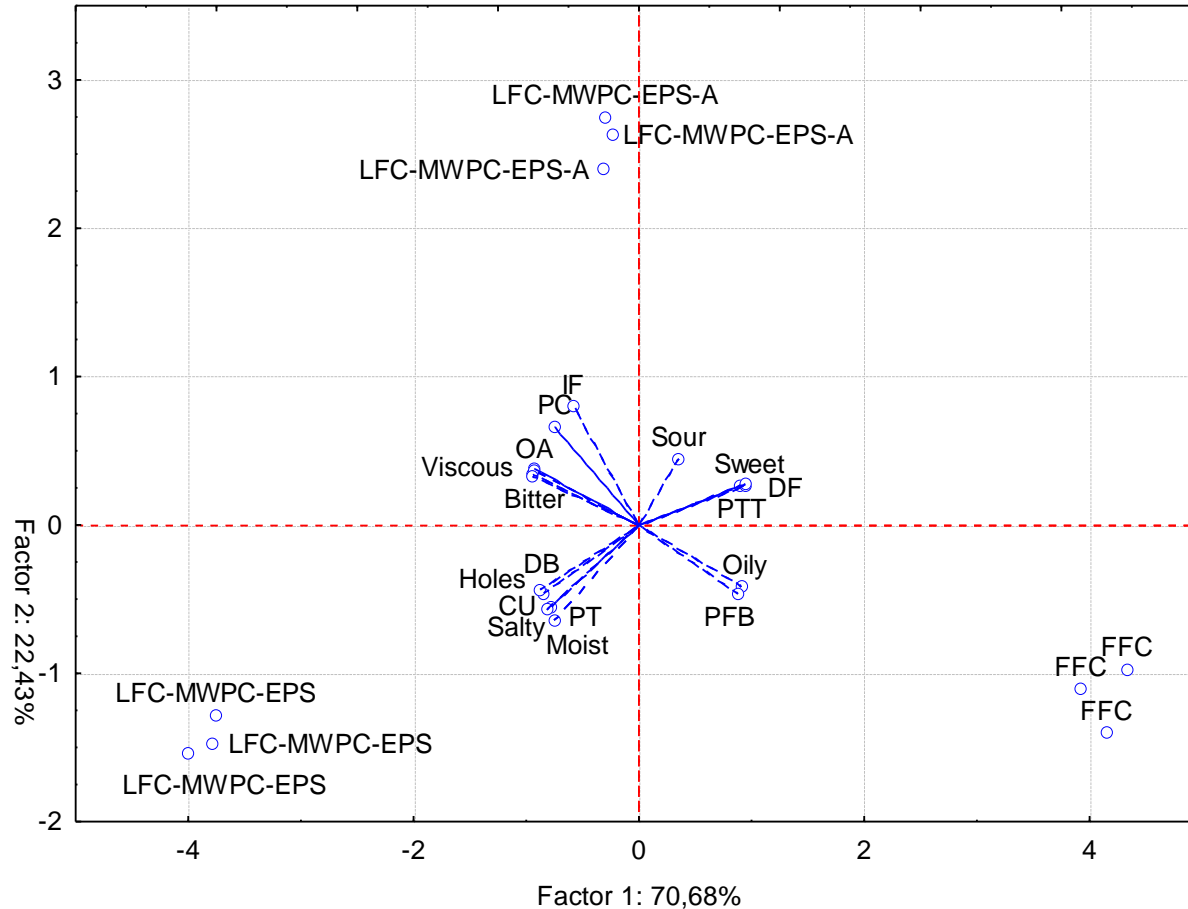
# Composti volatili dei formaggi a fine maturazione (unità arbitraria dell'area)



(6) ethanol, (7) 1-butanol, (8) 1-hexanol, (13) 2-butanol, (15) 2-heptanol, (17) 3-methyl-1-butanol, (18) 2-pentanone, (19) 2-heptanone, (21) 2,3-butanedione.



# Analisi sensoriale dei formaggi a fine maturazione



Sour, salty, sweet, bitter, oily and moist, intensity of flavor (IF), dried fruit (DF), viscous, degree of breakdown (DB), pleasure at first bite (PFB), and pleasant to chew (PC), pleasure to the touch (PTT), pleasant to taste (PT), color uniformity (CU), overall acceptability (OA), and holes.





# Biotecnologia dei cereali

## Lievito naturale

(cocktail of acidifying and proteolytic lactic acid bacteria with yeasts)



- Lunghi tempi di fermentazione (ca. 24 h)
- Fermentazione lattica ed alcolica
- Intensa degradazione dei polimeri dei cereali (es. proteine)

## Agenti lievitanti chimici

(es. Bicarbonato di sodio ed acido tartarico)



- Assenza di fermentazione
- Processo istantaneo
- Nessuna degradazione dei polimeri dei cereali

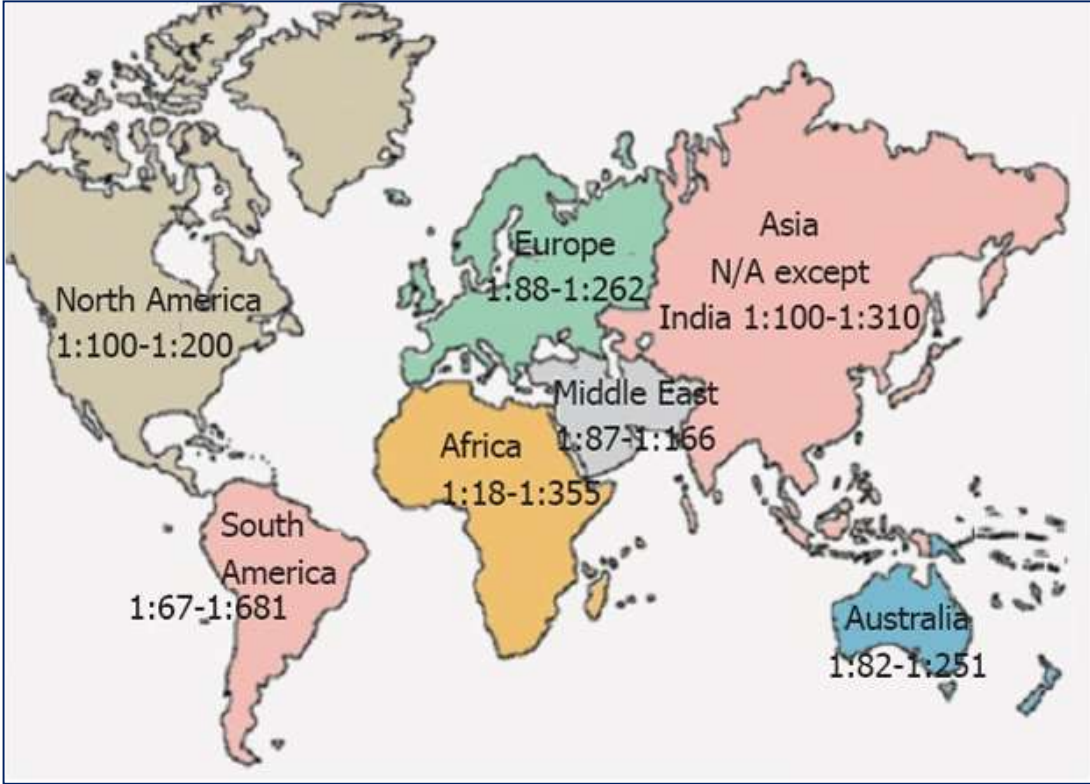
## Lievito di birra

- Processo molto rapido (0.5 - 1 h)
- Fermentazione alcolica
- Nessuna degradazione dei polimeri dei cereali

Dalla tradizione... 1900  Ai processi odierni 2010



# Prevalenza globale della celiachia



- **1-2%**

(Collin e Kaukinen, 2013. Dig Dis Sci 58:1165-66)

- **1-2,67%**

(Rastom et al., 2006. Gastroenterology 131:1981-2002;  
Green e Celier. 2007. N Engl J Med 357:1731-43)

- **1 - 1,96%**

(Kang et al., 2013. AP&T doi:10.1111/apt.12373)

World Journal of Gastroenterology : WJG  
Baishideng Publishing Group Co., Limited

Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment

Naiyana Gujral, Hugh J Freeman, and Alan BR Thomson  
2012.18:6036-59



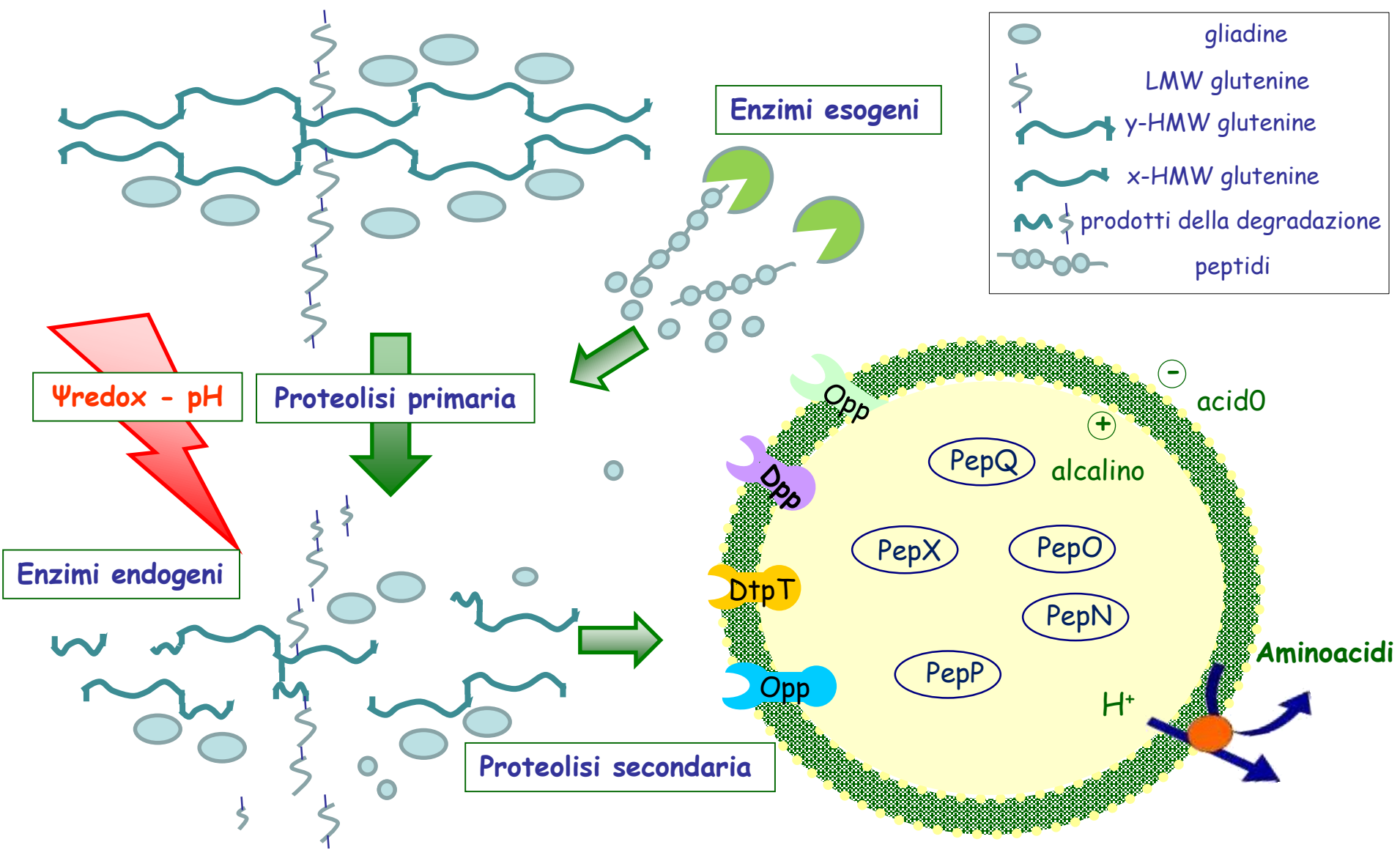
# Oligopeptidi responsabili della risposta immunitaria

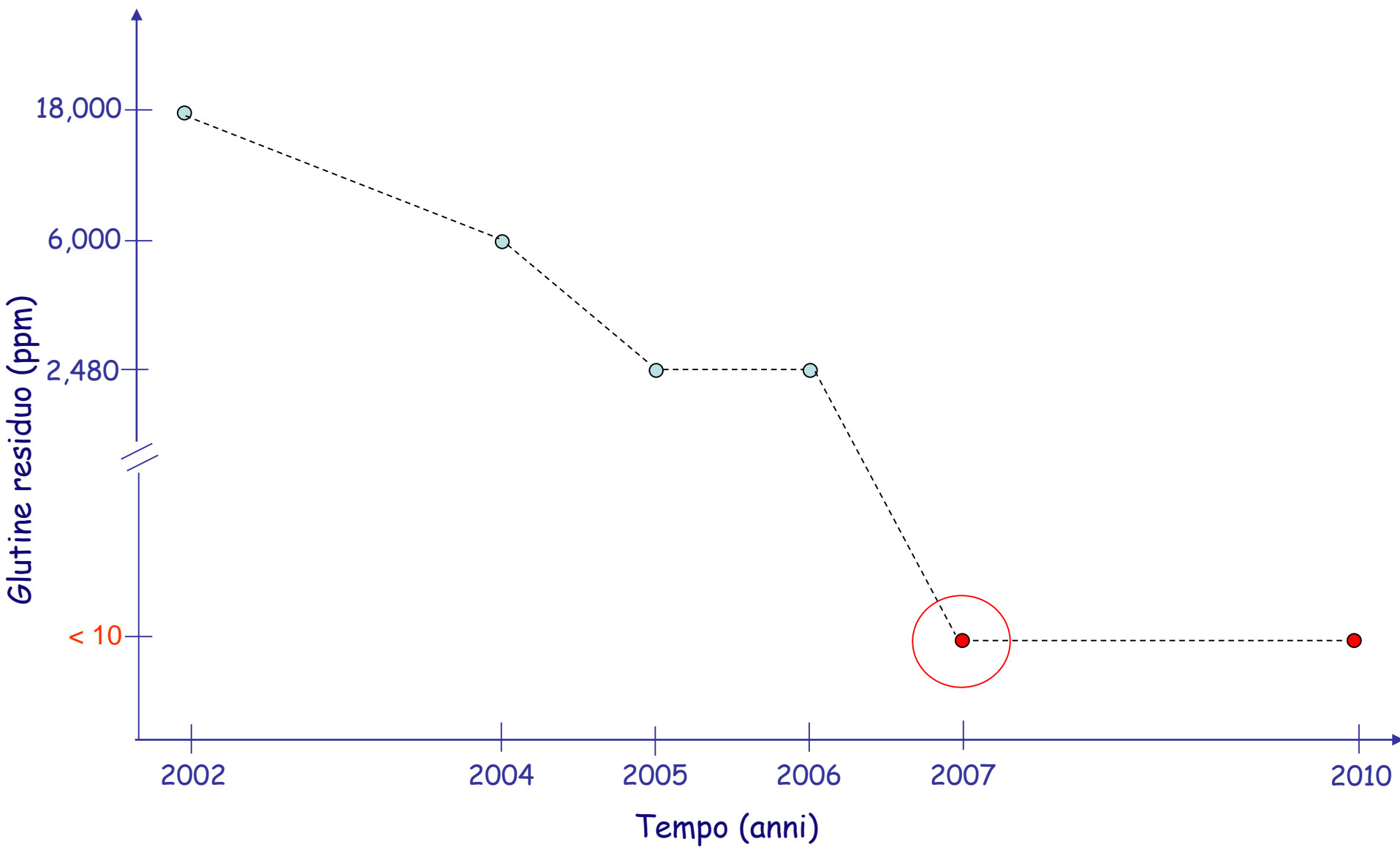
Peptide	Sequenza	Referenza
Glia- $\alpha$ (31-43)	LGQQQPFPQQPY	Silano e De Vincenzi, 1999
Glia- $\alpha$ 2 (62-75)	PQPQLPYPQPQSFR	Auricchio et al., 1996
Glia - $\alpha$ 2 (57-89)	LQLQPFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF	Shan et al., 2002
Glia- $\alpha$ (206-217)	SGQG5FQPSQQN	
Glia- $\alpha$ 9 (57-68)	QLQPFPQPQLPY	Arentz-Hansen et al., 2000
Glia- $\alpha$ 20 (93-106)	PFRPQQPYPQPQPQ	
Glia- $\gamma$ 1 (138-153)	QPQQPQQSFPQQQRPF	Aleanzi et al., 2001
Glia- $\gamma$ 30 (222-236)	VQGQGIIQPQQPAQL	Haush et al., 2002
LMW-GIt-156 (40-59)	QPPFSQQQQSPFSQ	Haush et al., 2002
LMW-GIt-17 (46-60)	QQPPFSQQQQQPLPQ	Haush et al., 2002
HMW-GIt (723-735)	QQGYYPSTSPQQSG	Haush et al., 2002
Glu-5	QQQXPQQPQQF	Haush et al., 2002
Glu-21	PQQSEQSQQPFPQPQ	Haush et al., 2002



# Proteolisi durante la fermentazione del lievito naturale

(Ganzle *et al.* 2008, Trends Food Sci Technol 19:513)

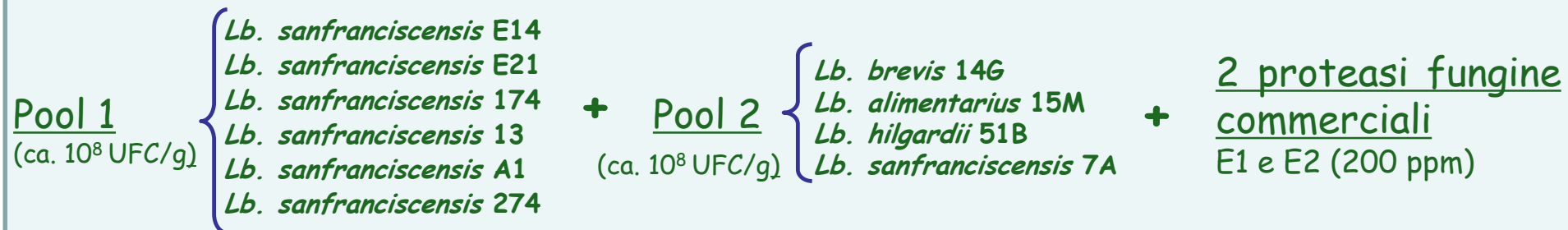




## Highly Efficient Gluten Degradation by Lactobacilli and Fungal Proteases during Food Processing: New Perspectives for Celiac Disease<sup>∇</sup>

Carlo G. Rizzello,<sup>1</sup> Maria De Angelis,<sup>1</sup> Raffaella Di Cagno,<sup>1</sup> Alessandra Camarca,<sup>2</sup> Marco Silano,<sup>3</sup> Ilario Losito,<sup>4</sup> Massimo De Vincenzi,<sup>3</sup> Maria D. De Bari,<sup>4</sup> Francesco Palmisano,<sup>4</sup> Francesco Maurano,<sup>2</sup> Carmen Gianfrani,<sup>2</sup> and Marco Gobbetti<sup>1\*</sup>

- ✓ Isolamento di batteri lattici da lievito naturale
- ✓ Selezione per l'attività peptidasi e ri-costituzione di un lievito naturale

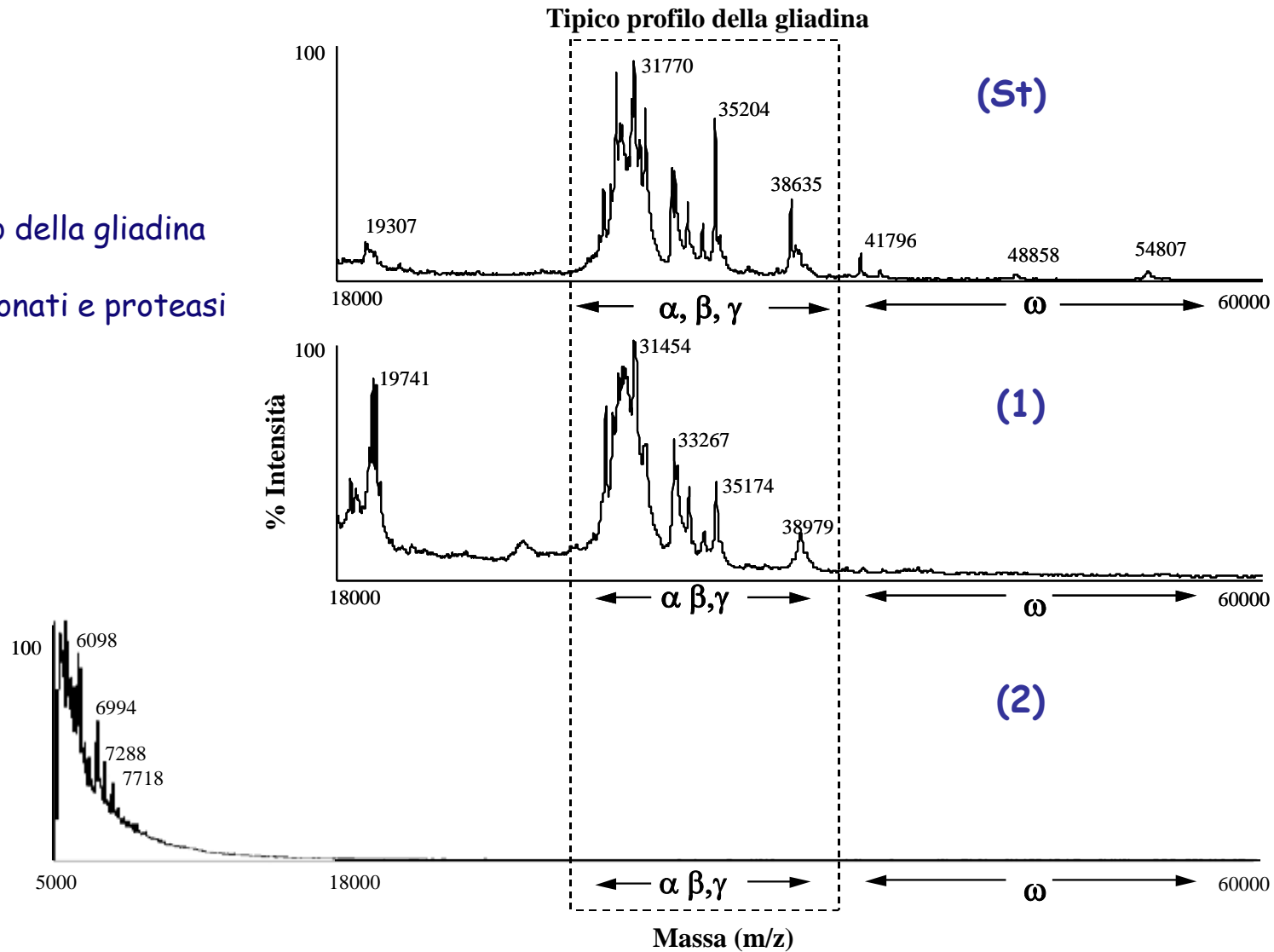


Incubazione per 48 h a 37° C (ca. 200 rpm)

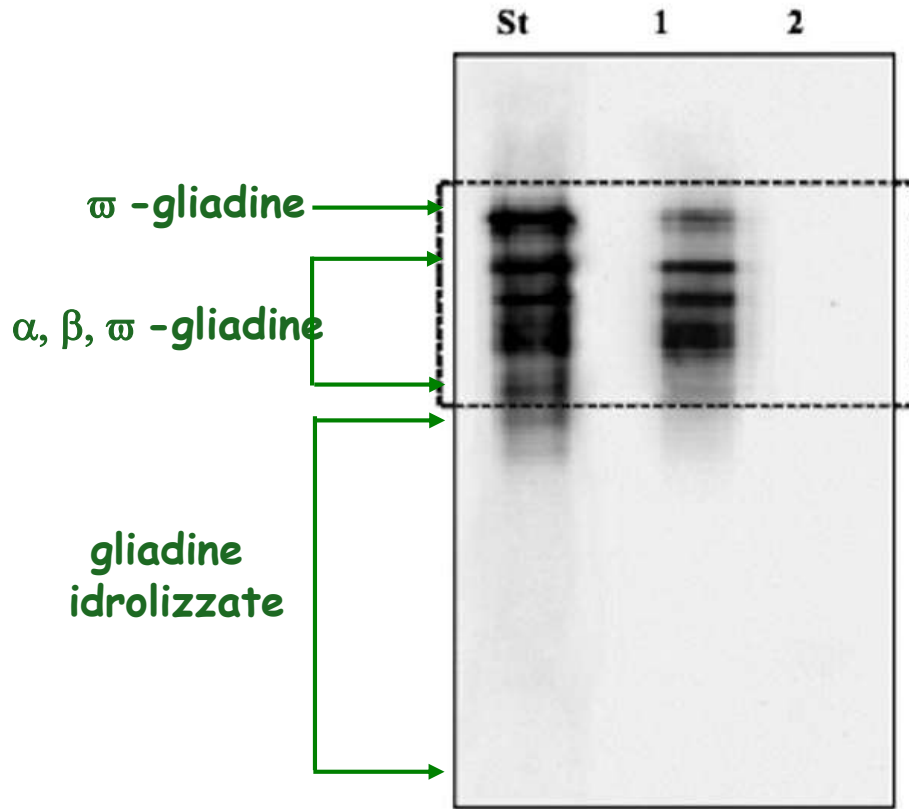


# Spettri di massa MALDI-ToF

- St, Standard Europeo della gliadina
- 1, CAD
- 2, Lattobacilli selezionati e proteasi



# R5-Western blot



**St**, Standard europeo della gliadina ;  
1, Lievito acidificato chimicamente;  
2, Lievito fermentato (20% di farina di frumetno) con batteri lattici selezionati e protoneasi (SLP) per 48 h at 37° C

## R5-ELISA

Campioni	Glutine (ppm)
CAD	18.700
SLP	<10

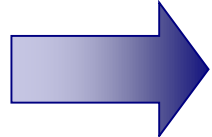




# Clinical Challenge 1: Dipartimento di Pediatria, Sapienza - Università di Roma

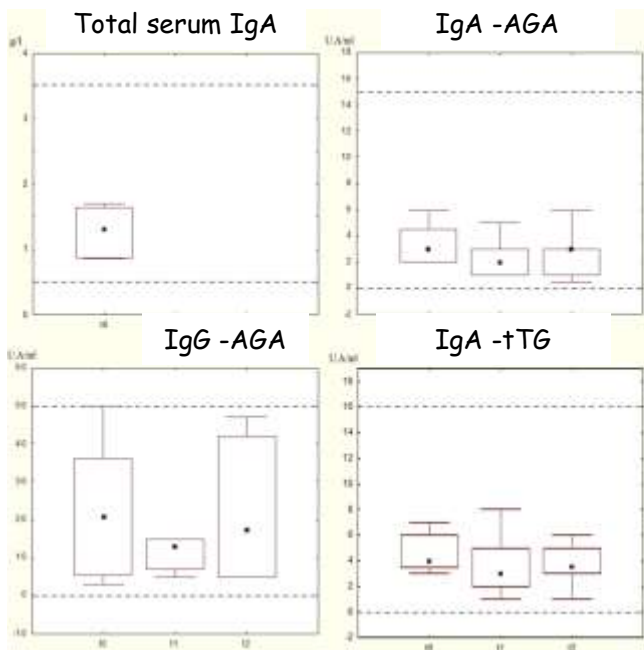


Lievitati dolci (muffin) (200 g) corrispondenti a 100 g di farina di grano trattata contenente 10 g di glutine idrolizzato

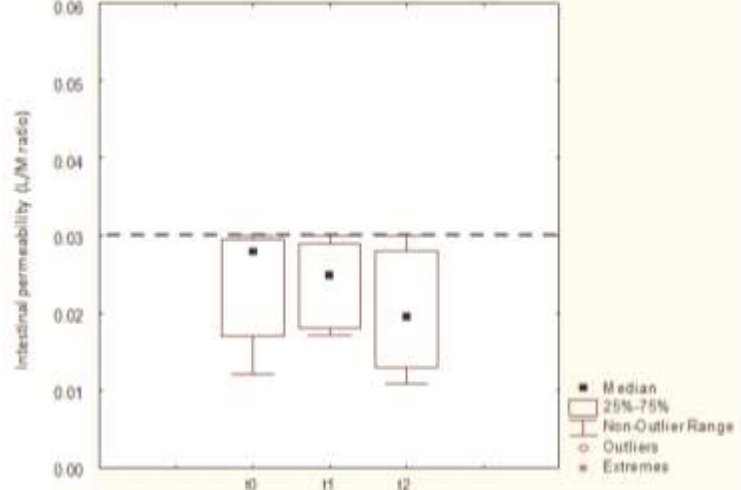


## Sperimentazione clinica

- otto soggetti celiaci (età media 13, range 8-17 anni),
- consumo giornaliero di ca. 200 g di prodotto,
- durata del challenge pari a 60 giorni



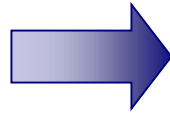
Analisi sierologiche (A) e permeabilità intestinale (B) a 0 (t0), 30 (t1), e 60 (t2) giorni di sperimentazione clinica



# Clinical Challenge 2: Dipartimento di Pediatria - Università di Napoli Federico II



Biscotti (200 g)  
corrispondenti a 100 g di  
farina di grano  
trattata contenente 8 g  
di glutine idrolizzato



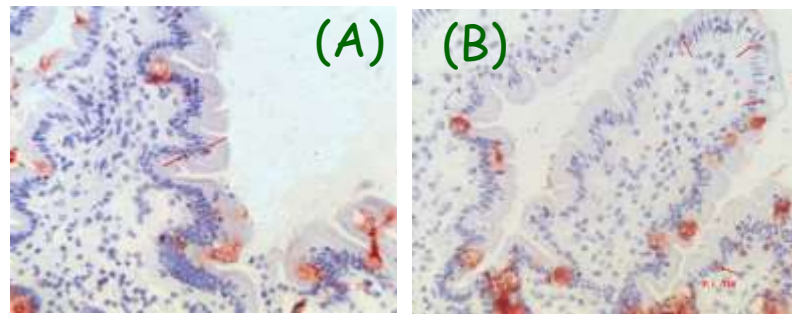
## Sperimentazione clinica

- sedici soggetti celiaci (età media 19, range 12-23 anni),
- consumo giornaliero di ca. 200 g di prodotto,
- durata del challenge pari a 60 giorni

Greco et al. 2011, *Clin Gastroenterol Hepatol* 78:1087

	TIME	tTG	MARSH GRADE	CD3	$\gamma\delta$	CD25
F.I.	t <sub>0</sub>	1.6	T0	39	5.6	6
	t <sub>60</sub>	1.0	T0	38	8.6	5
I.C.	t <sub>0</sub>	1.9	T0	3.7	0.9	11
	t <sub>60</sub>	1.1	T0	11	3.8	9
R.R.	t <sub>0</sub>	0.3	T1	53	11.5	3
	t <sub>60</sub>	0.3	T1	56	17.8	4
I.I.	t <sub>0</sub>	0.5	T0	31	8.4	21
	t <sub>60</sub>	0.3	T0	36	12.8	21
C.C.	t <sub>0</sub>	0.4	T0	32	21	3
	t <sub>60</sub>	0.7	T0	47	18	7

Densità dei linfociti intraepiteliali sd+ in biopsie di mucosa intestinale del paziente 4 F.I. all' inizio (A) e dopo 60 giorni di sperimentazione clinica (B)

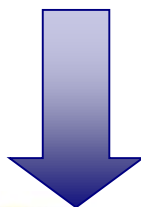


tTG, anti-tissue transglutaminase antibodies; T0, normal duodenal mucosa; CD3, T1, architecturally normal duodenal mucosa with increased intraepithelial lymphocytes infiltration; and CD3,  $\gamma\delta$  CD25 are markers for intraepithelial lymphocytes in duodenal mucosa



# Clinical Challenge 3: Pediatrics and European Laboratory for the Study of Food Induced Diseases University of Naples, Federico II, Italy

Farina detossificata mediante fermentazione  
(pool S2 e proteasi fungine)



CHALLENGE CLINICO IN CORSO  
20 pazienti (12-23 anni)

- Analisi sierologiche,
- Analisi morfometriche
- Analisi immunochimiche



**Tempi:  $t_0 - t_1 - t_2 - t_3 - t_4 - t_5 - t_6$  MESI**

## Synthesis of $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) by *Lactobacillus plantarum* DSM19463: functional grape must beverage and dermatological applications

Raffaella Di Cagno · Francesco Mazzacane · Carlo Giuseppe Rizzello ·  
Maria De Angelis · Giammaria Giuliani · Marisa Meloni  
Barbara De Servi · Marco Gobetti

# GABA

modulazione di funzioni fisiologiche (neurotrasmissione, ipotensivo, effetti diuretici, effetto tranquillizzante, prevenzione del diabete)

Jakobs *et al.*, 1993, Guin Ting Wong *et al.*, 2003; Hagiwara *et al.*, 2004

Prodotto da lieviti (Hao e Scmith, 1993), altri funghi (Kono e Himeno, 2000) e batteri lattici in alimenti, es.

*Lactococcus lactis* - Nomura *et al.*, 1998

*Lactobacillus brevis* - Ueno *et al.*, 1997, Yokoama *et al.*, 2002,

*Lactobacillus paracasei* - Komatsuzaki *et al.*, 2005

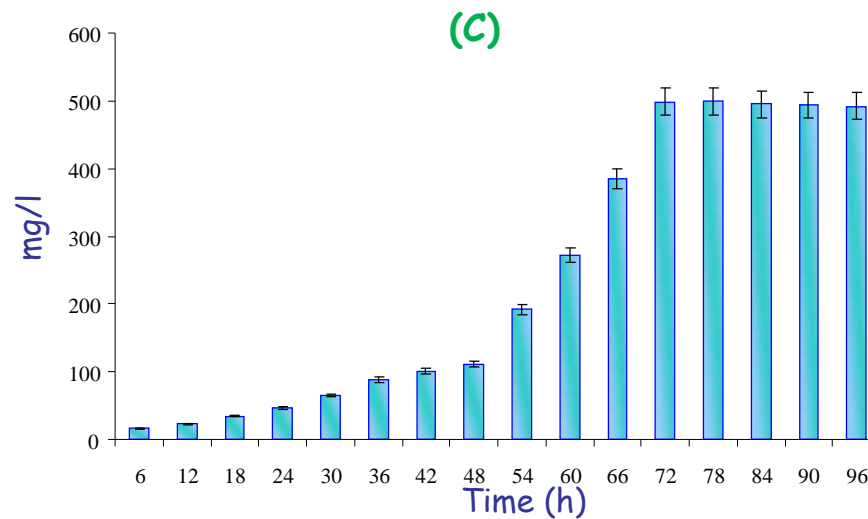
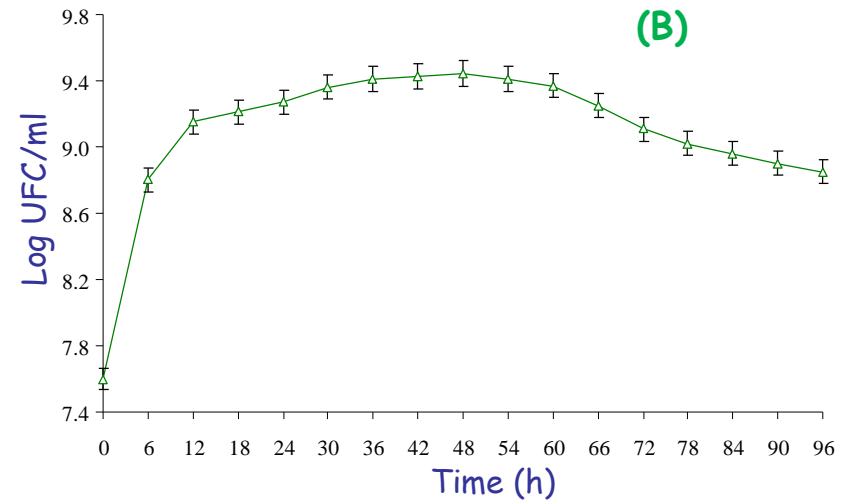
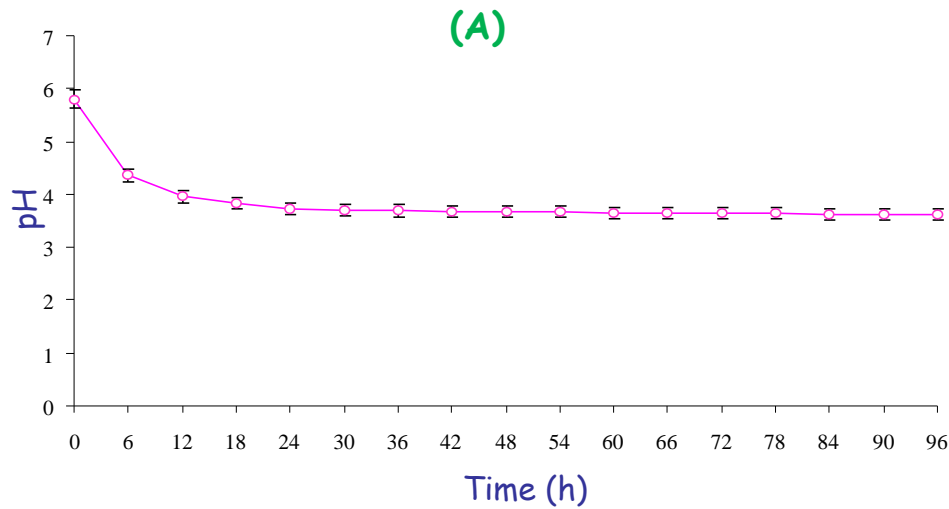
*Lb. paracasei*, *Lb. delbrueckii subsp bulgaricus*,

*Lactococcus lactis*, *Lb. plantarum*,

*Lb. brevis* - Siragusa *et al.*, 2007



**Cinetica di acidificazione (unità di pH) (A), crescita (Log UFC/ml) (B) e sintesi di GABA (mg/l) (C) durante la fermentazione (30° C per 96 h) del mosto diluito (1%, p/v) da *Lactobacillus plantarum* DSM19463**

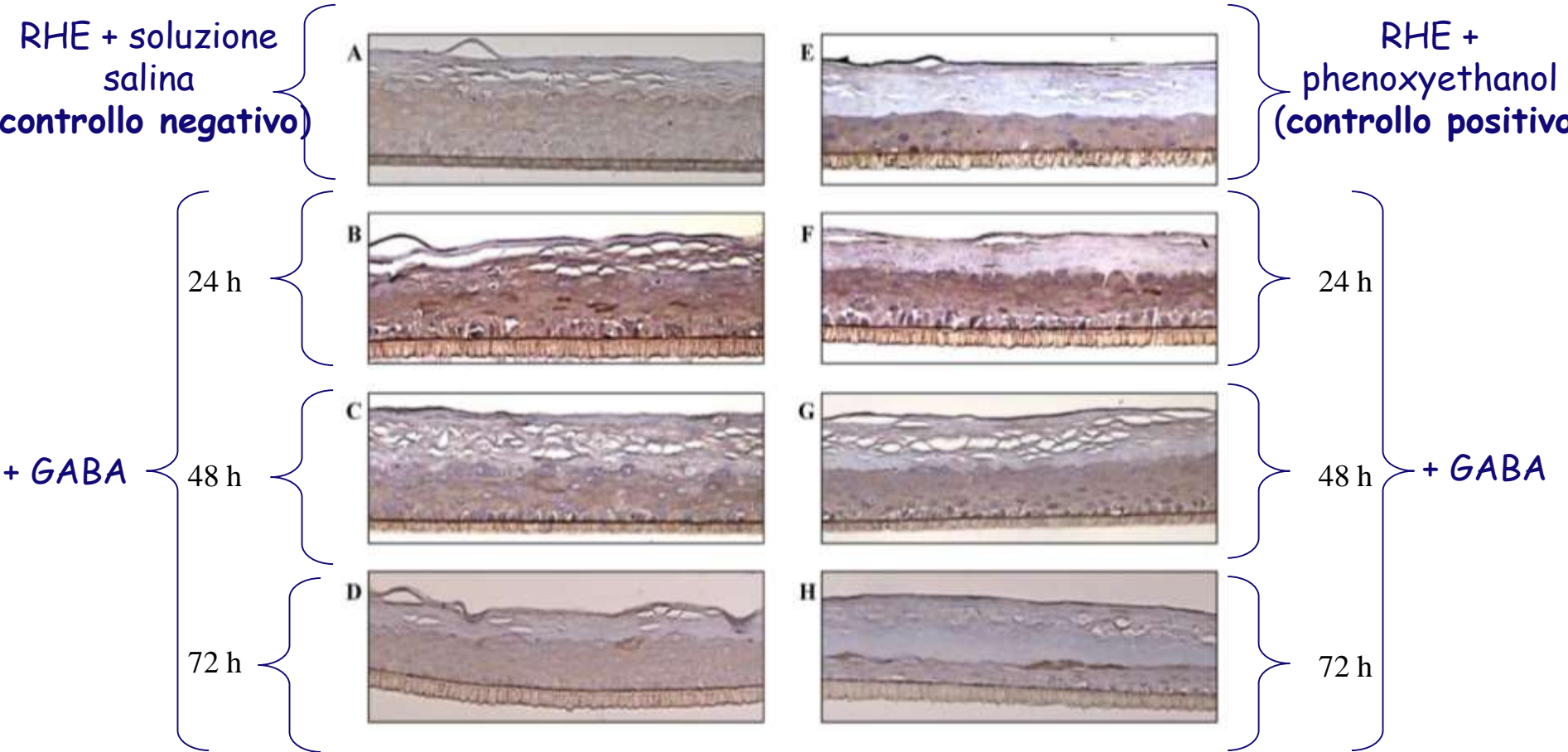


Concentrazione di GABA (g/kg), niacina e minerali (mg/kg), polifenoli totali (g/kg), cellule vitali di *Lactobacillus plantarum* DSM19463 (log UFC/g) nella preparazione di mosto fermentato e liofilizzato

Composto/batteri lattici	Concentrazione/densità cellulare
GABA	$8,9 \pm 0,18$ g/kg
Niacina	$258 \pm 2,87$ mg/kg
Zn <sup>++</sup>	$281 \pm 3,11$ mg/kg
Cu <sup>++</sup>	$11,1 \pm 0,16$ mg/kg
Mg <sup>++</sup>	$1550 \pm 17,9$ mg/kg
Polifenoli Totali	$20,9 \pm 0,34$ g/kg
<i>L. plantarum</i> DSM19463	$\text{Log } 10 \pm 0,3$ UFC/g



# Analisi immunoistochimica della proteina umana beta-defensina-2 su epidermide umana ricostruita SkinEthic®



# LICHTENA

EQUILYDRA®

ATTIVA DALL'INTERNO  
I MECCANISMI DI IDRATAZIONE DELLA PELLE E  
DI RIPARAZIONE DELLA BARRIERA



PER RIPORTARE LA PELLE AL SUO OTTIMALE  
EQUILIBRIO IDROLIPIDICO

## 3 GRANDI INNOVAZIONI in un unico **BREVETTATO** COMPLESSO EQUILYDRA®

1 Ottenuto da **ESCLUSIVE BIOTECNOLOGIE** con  
fermentazione di **FERMENTI LATTICI** vivi su **MOSTO  
D'UVA**

2 **NATURALMENTE RICCO** DI VITAMINE,  
MINERALI E POLIFENOLI  
→ per riparare e proteggere dallo **STRESS OSSIDATIVO**

3 e in particolare **RICCO DI AMINOACIDO GABA:**

- PRESENTE IN GRANDI QUANTITÀ
- TOTALMENTE NATURALE

→ In grado di stimolare la **PRODUZIONE DI ACIDO  
JALURONICO**

**PIU' BIO-DISPONIBILE**



■ IDRATANTE ■ EQUILIBRANTE ■ RIPARATRICE

Patente n. RM2007A000398,  
17/07/2007



**“If you take care of your microbial friends, they will take care of your future and you will live happily ever after”  
(D. Perlman)**

(Demain, 2000. Small bugs, big business: The economic power of the microbe. *Biotechnology Advances*. 18:499-514)

