



La biblioteca dei lieviti naturali italiani al servizio della produzione industriale di pani tipici e tradizionali

Parma 8-9 Giugno 2011

Marco Gobbetti



Biotecnologia dei prodotti lievitati da forno

a cura di
Marco Gobbetti e Aldo Corsetti

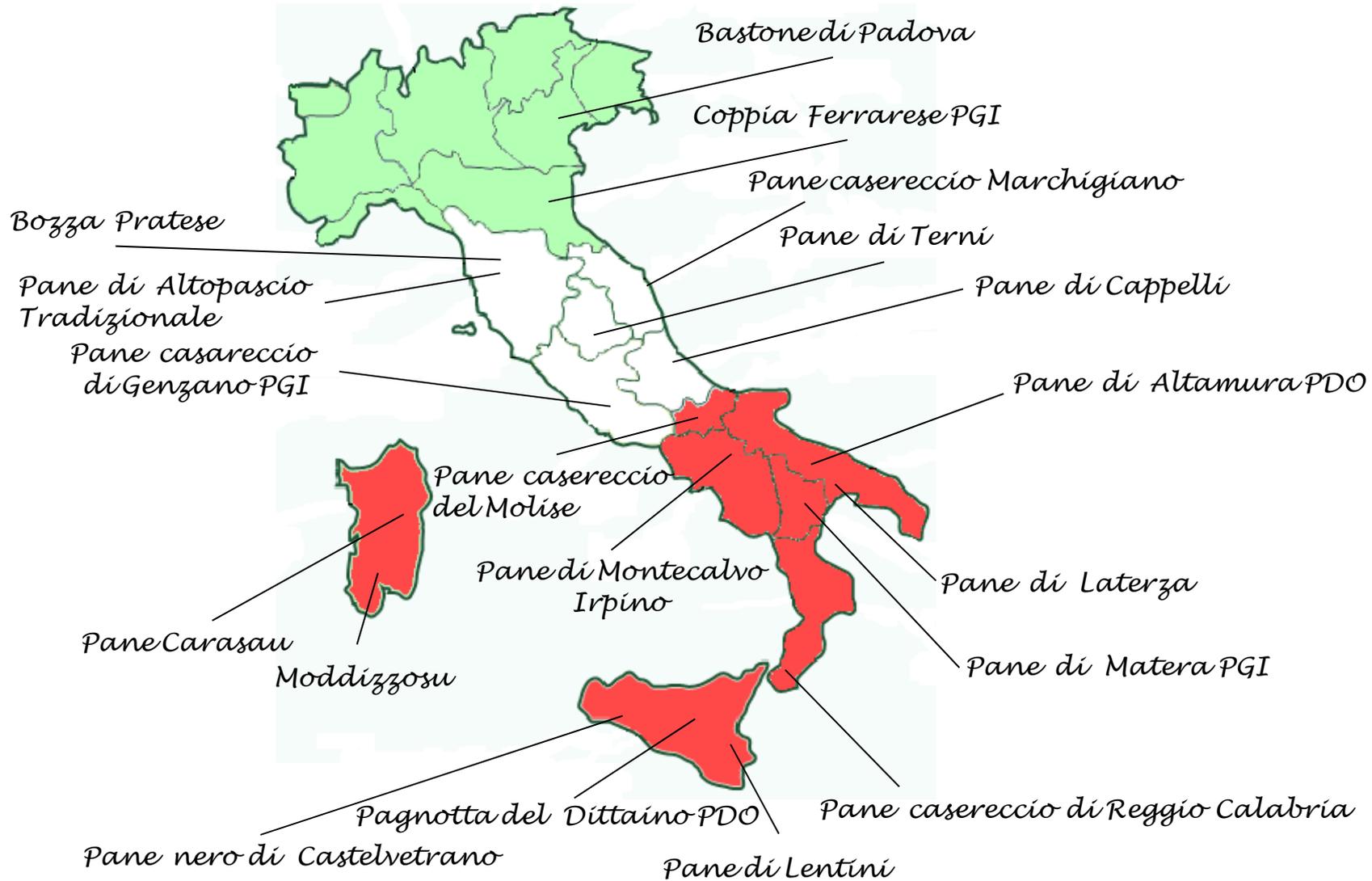


CASA EDITRICE AMBROSIANA



Building up the "Italian Sourdough Library"

Lieviti naturali italiani oggetto di caratterizzazione



Moddizzosu (Sardegna)



Lievito naturale

Rinfresco quotidiano
(18-25°C, 10 - 12 h)



Semola di grano duro,
sale e acqua

25-30%

Lavorazione
dell'impasto (15 - 20
min)

18-25°C, 1 h

Porzionatura e
formatura

18-25°C, 2 - 3 h

Cottura (250 - 280°C, 40 -
60 min)



Ingredienti e parametri tecnologici dei lieviti naturali (I)

Tipo di frumento:

a) Duro: Pane di Altamura DOP; Pane di Laterza; Pane di Matera IGP, Pane di Montecalvo Irpino; Pane di Cappelli; Moddizzosu; Pane Carasau, Pane nero di Castelvetro; Pane di Lentini e Pagnotta del Dittaino DOP

b) Tenero: Pane Casereccio di Reggio Calabria; Pane Casereccio del Molise; Pane Casereccio di Genzano IGP; Bozza Pratese; Pane di Altopascio Tradizionale; Pane di Terni; Bastone di Padova; Coppia Ferrarese IGP e Pane Casereccio Marchigiano

NaCl (%):

a) 1,5: Pane di Cappelli; Pane carasau e Pane nero di Castelvetro

b) 2: Pane di Altamura DOP; Pane di Laterza; Pane di Montecalvo Irpino; Pane Casereccio di Reggio Calabria; Pane Casereccio del Molise; Pane Casereccio di Genzano IGP; Bastone di Padova; Coppia Ferrarese IGP; Pane Casereccio Marchigiano; Moddizzosu; Pane di Lentini e Pagnotta del Dittaino DOP

c) 3: Pane di Matera IGP

d) Non utilizzato in: Bozza Pratese; Pane di Altopascio Tradizionale e Pane di Terni

Ingredienti e parametri tecnologici dei lieviti naturali (II)

Lievito di birra (%):

- a) 0,4: Pane Casareccio di Genzano IGP
- b) 0,6: Bastone di Padova
- c) Non utilizzato in tutti gli altri

Lievito naturale utilizzato nel rinfresco (%):

- a) ≤10: Pane di Matera; Pane Casareccio di Genzano IGP; Coppia Ferrarese IGP e Pane nero di Castelvetro
- b) 14-20: Pane di Altamura DOP; Pane di Montecalvo Irpino; Bozza Pratese; Pane di Terni; Pane di Lentini e Pagnotta del Dittaino DOP
- c) 25-30: Pane di Laterza; Pane Casereccio del Molise; Pane Casereccio Marchigiano; Pane di Cappelli; Moddizzosu e Pane carasau
- d) 40-50: Pane Casereccio di Reggio Calabria; Pane di Altopascio Tradizionale e Bastone di Padova



Ingredienti e parametri tecnologici dei lieviti naturali (III)

Lievito naturale	Rinfresco (tempo, h; temperatura, °C)
Pane di Altamura	10; 25
DOP	
Pane di Laterza	6; 25
Pane di Matera IGP	6; 25
Pane di Montecalvo	6; 25
Irpino	
Pane Casereccio di	6; 22
Reggio Calabria	
Pane Casereccio del	10; 22
Molise	
Pane Casereccio di	2; 30
Genzano IGP	
Bozza Pratese	15; 11
Pane di Altopascio	24; 9
Tradizionale	

Lievito naturale	Rinfresco (tempo e temperatura)
Pane di Terni	12; 16
Bastone di Padova	18; 27
Coppia Ferrarese IGP	12; 22
Pane Casereccio	6; 23
Marchigiano	
Pane di Cappelli	4; 26
Moddizzosu	11; 22
Pane Carasau	11; 27
Pane nero di	10; 26
Castelvetro	
Pane di Lentini	11; 25
Pagnotta del Dittaino	5; 22
DOP	

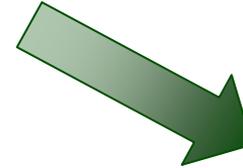


Disegno sperimentale



Caratterizzazione biochimica:

- pH
- concentrazione di acido lattico e acido acetico (HPLC)
- concentrazioni di aminoacidi liberi (Amino Acid Analyser)



Caratterizzazione microbiologica:

- metodo coltura-indipendente
- metodo coltura-dipendente



Caratterizzazione microbiologica: studio della biodiversità dei batteri lattici e dei lieviti

Metodo coltura-indipendente

I. Estrazione del DNA totale dal lievito naturale

II. PCR-DGGE

Metodo coltura-dipendente

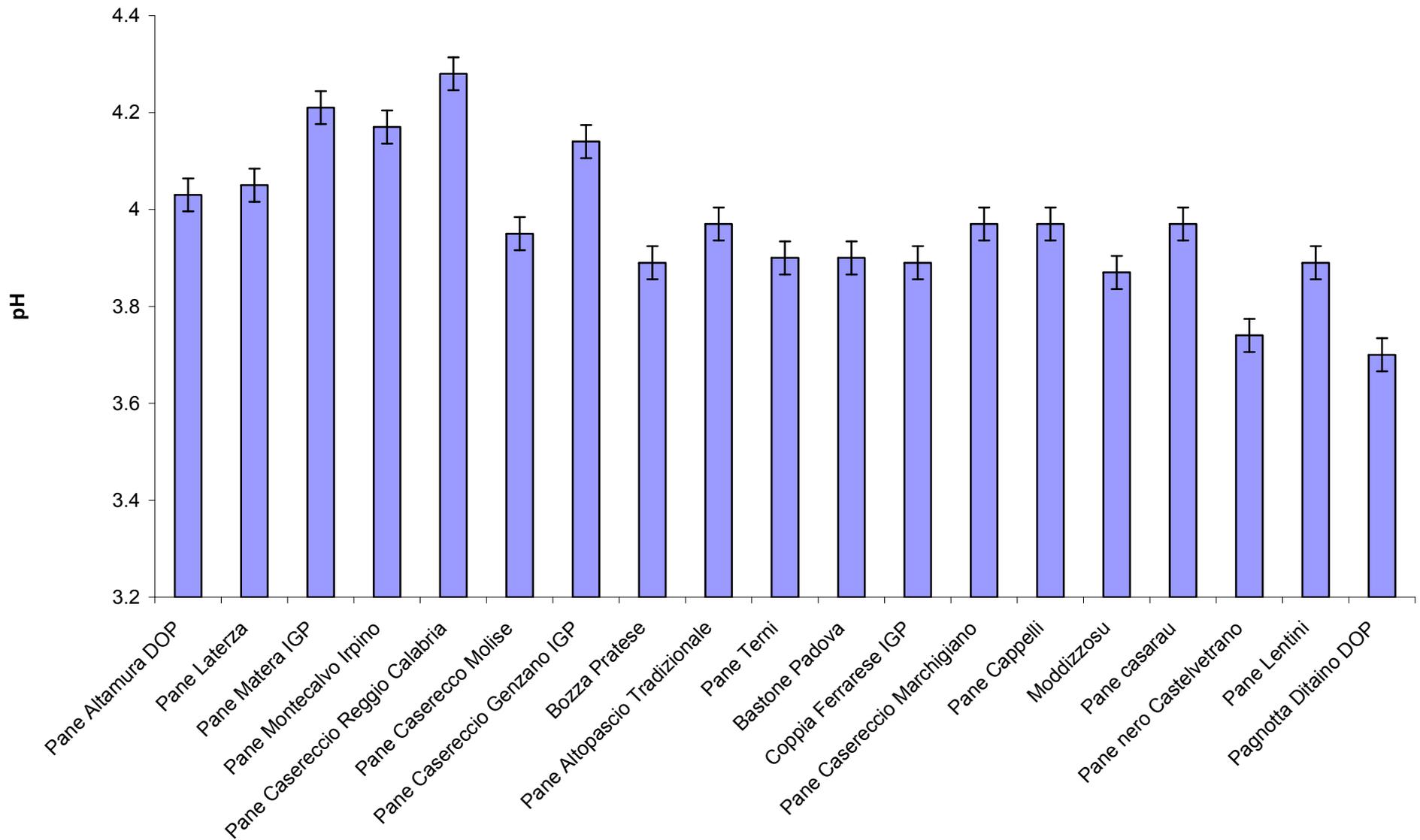
I. Isolamento in coltura pura { Batteri lattici (mMRS, SDB, MRS5, M17)
Lieviti (MEA, SDA)

II. Estrazione del DNA dagli isolati e tipizzazione mediante metodi di DNA fingerprinting (RAPD-PCR e iSSR di (GACA)₄, rispettivamente per batteri lattici e lieviti)

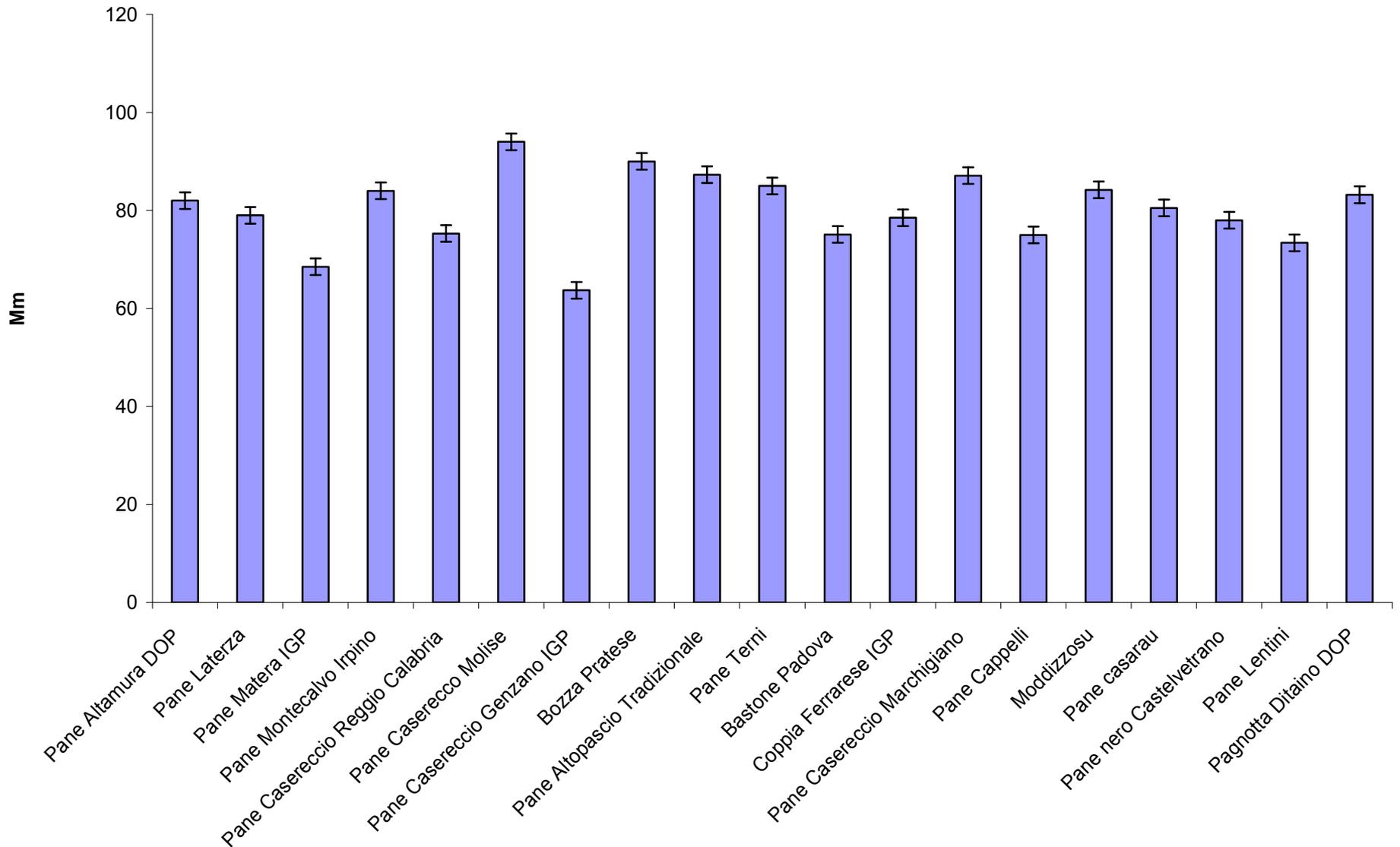
III. Identificazione mediante sequenziamento del gene codificante per l'r-RNA 16S (batteri lattici) e dominio D1/D2 rDNA 26S (lieviti)



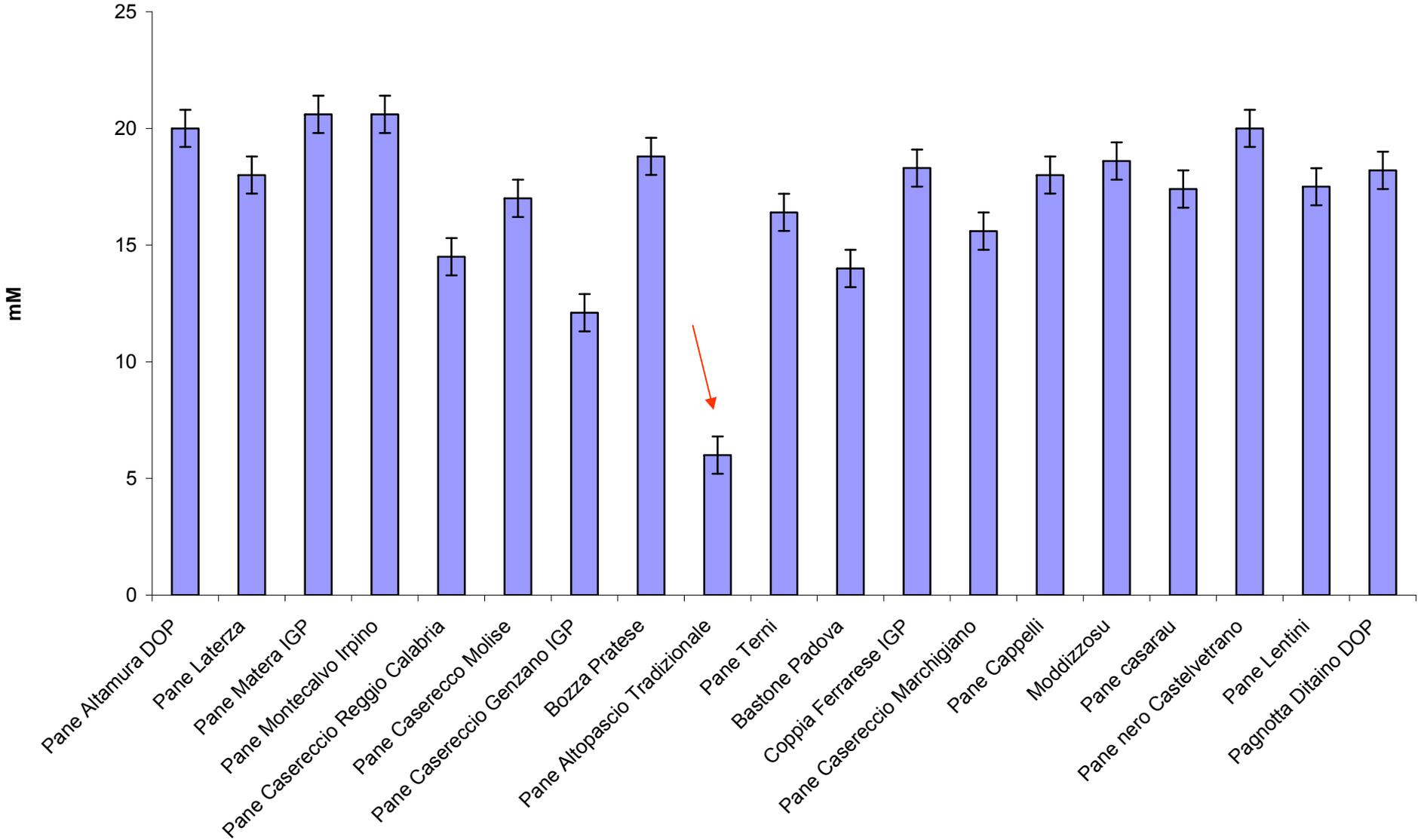
Caratterizzazione biochimica dei lieviti naturali: pH



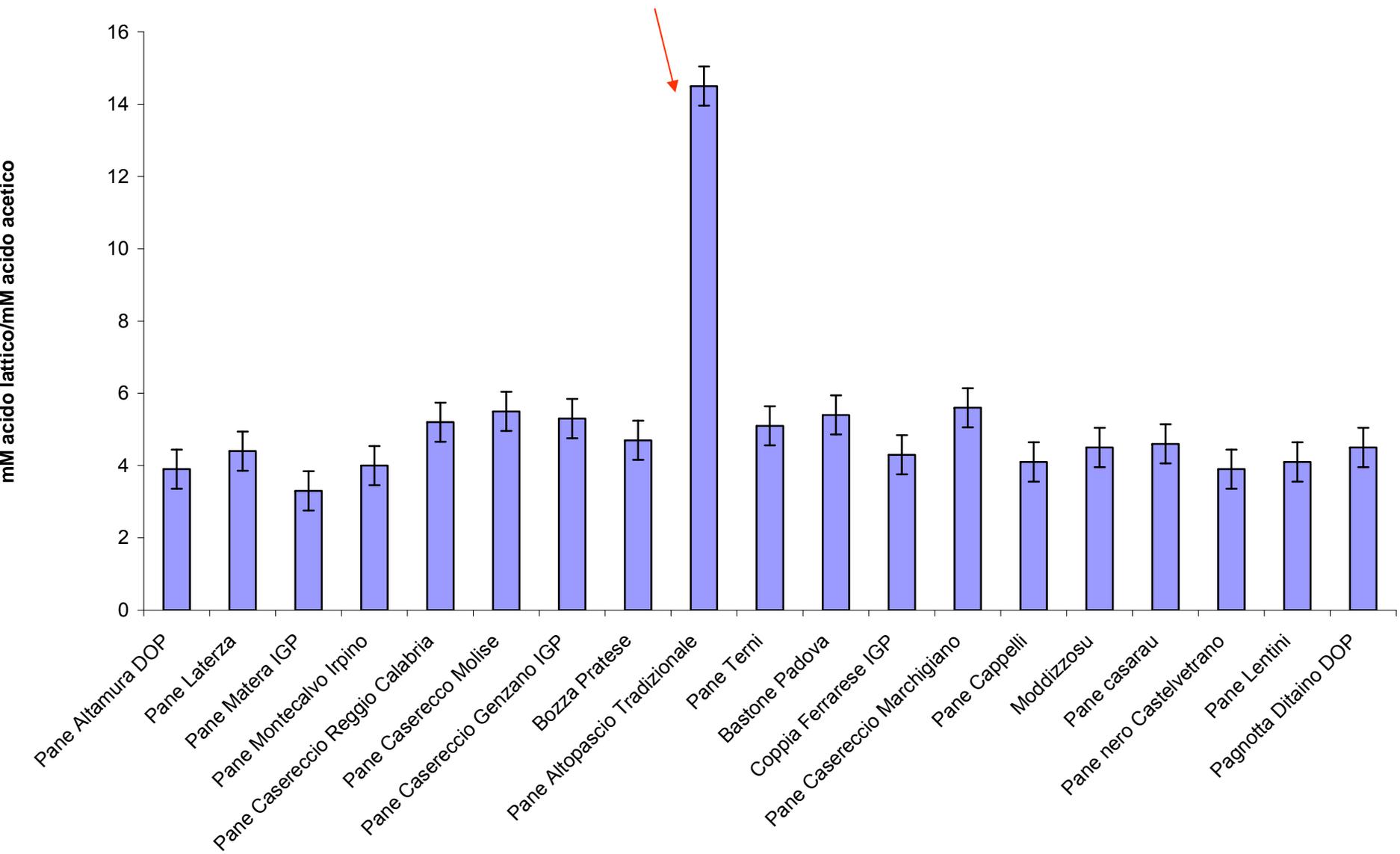
Caratterizzazione biochimica dei lieviti naturali: acido lattico



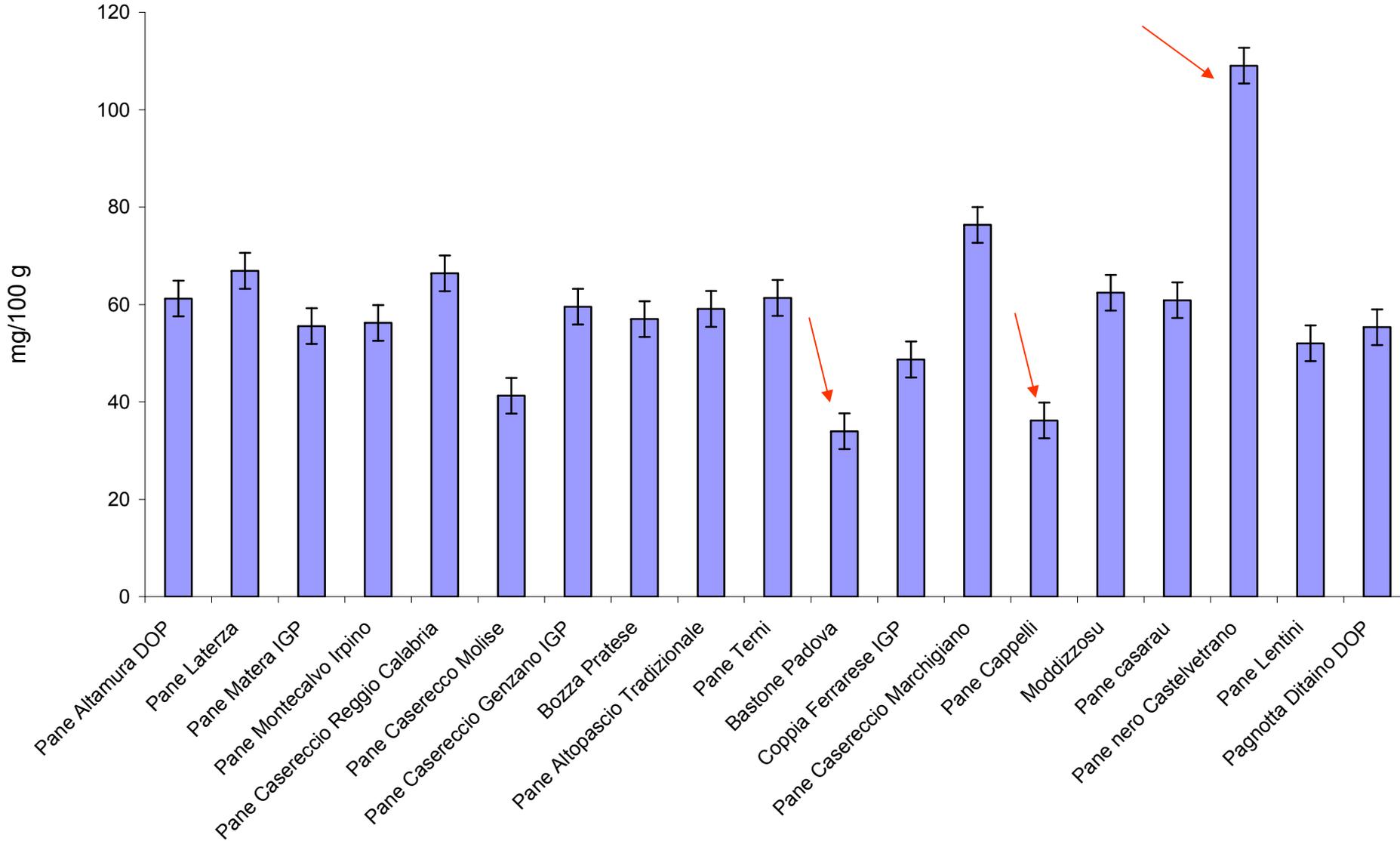
Caratterizzazione biochimica dei lieviti naturali: acido acetico



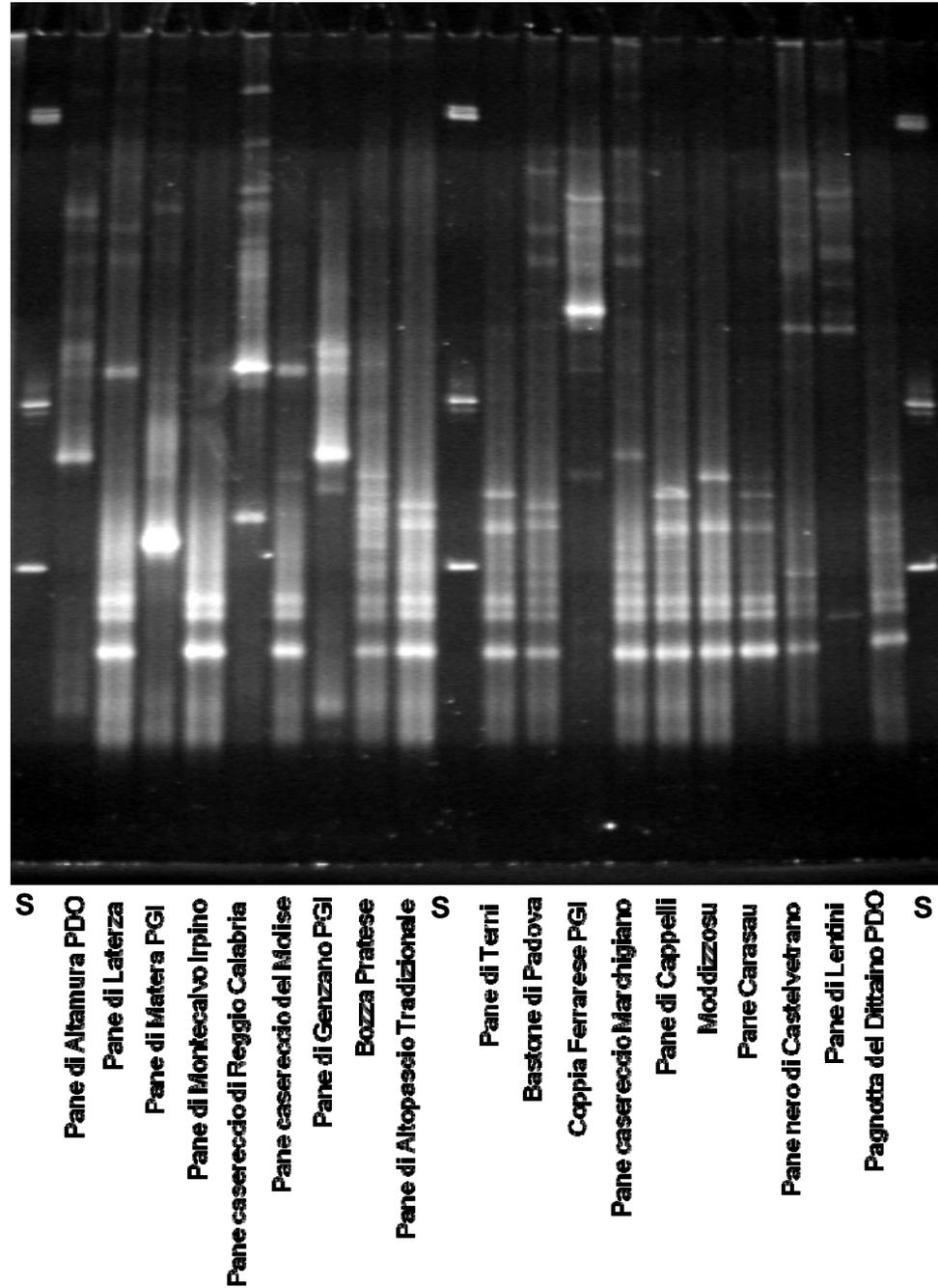
Caratterizzazione biochimica dei lieviti naturali: QF



Caratterizzazione biochimica dei lieviti naturali: amino acidi liberi



Profili DGGE dei lieviti naturali: primer Lac1/Lac2 per il gruppo dei lattobacilli

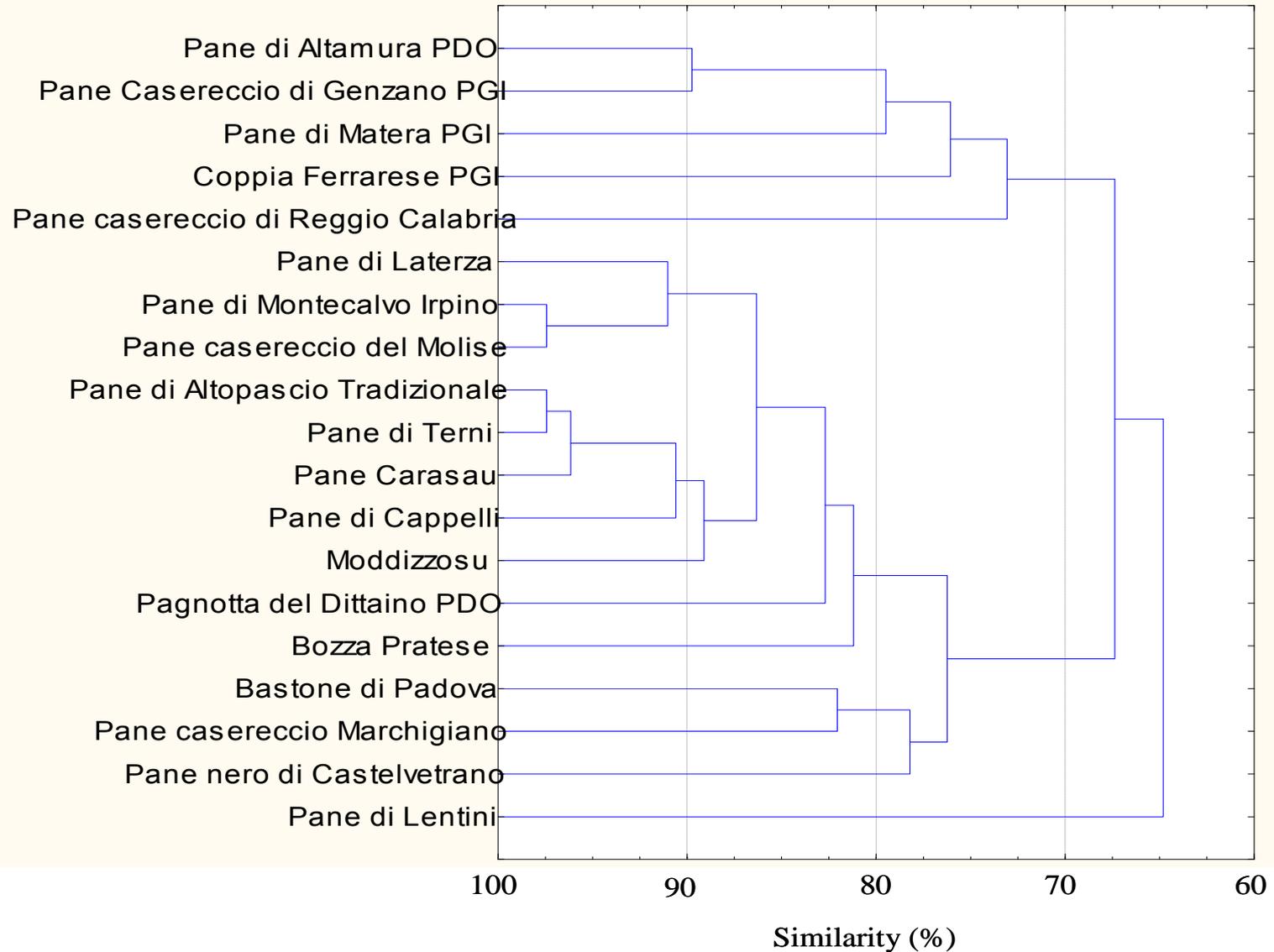


Il gruppo dei lattobacilli comprende i generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella*.

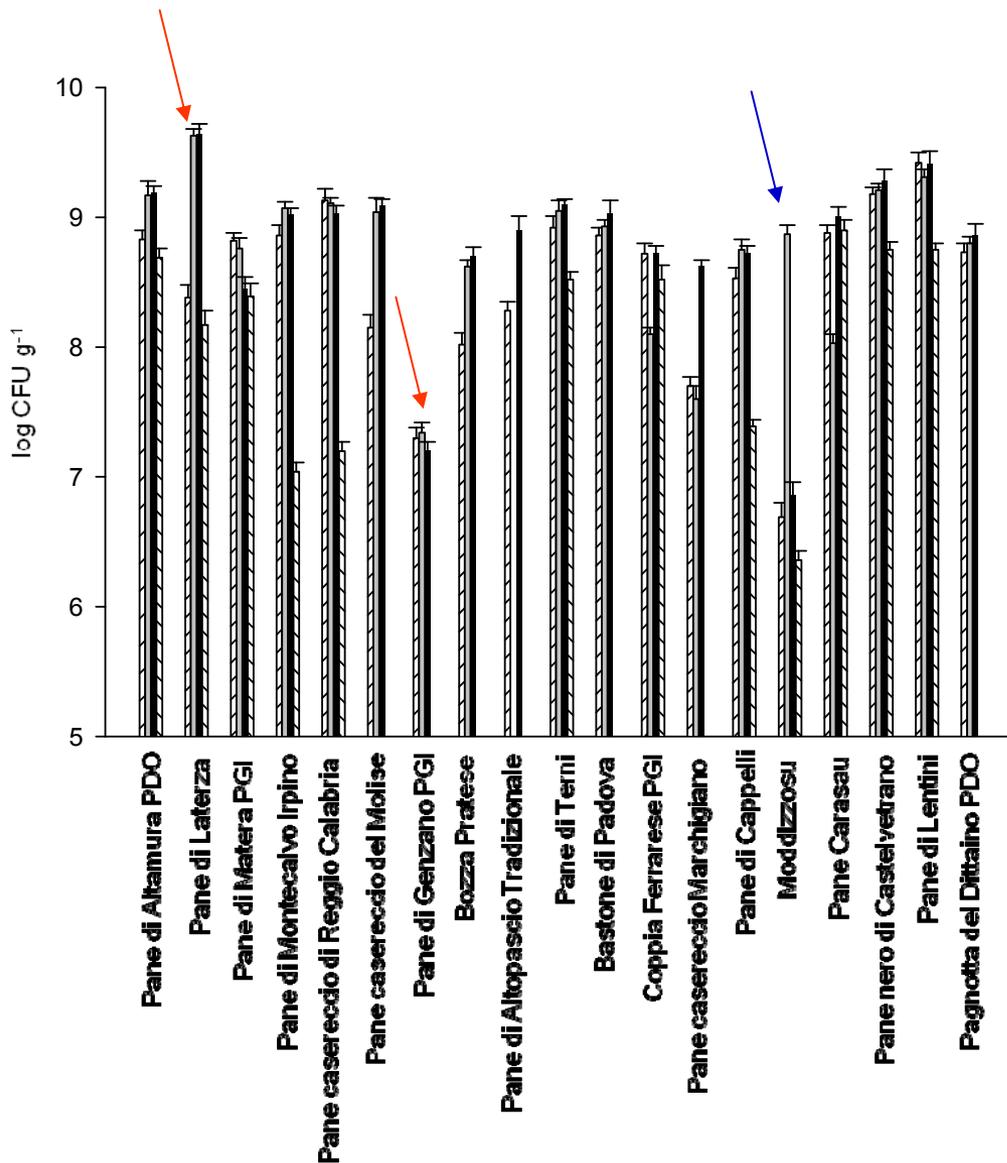
Principali risultati:

- 1-5 ampliconi per ogni lievito naturale
- Ciascun lievito naturale mostra un profilo caratteristico

Clustering dei profili DGGE (batteri lattici) dei lieviti naturali



Densità cellulari dei batteri lattici nei lieviti naturali

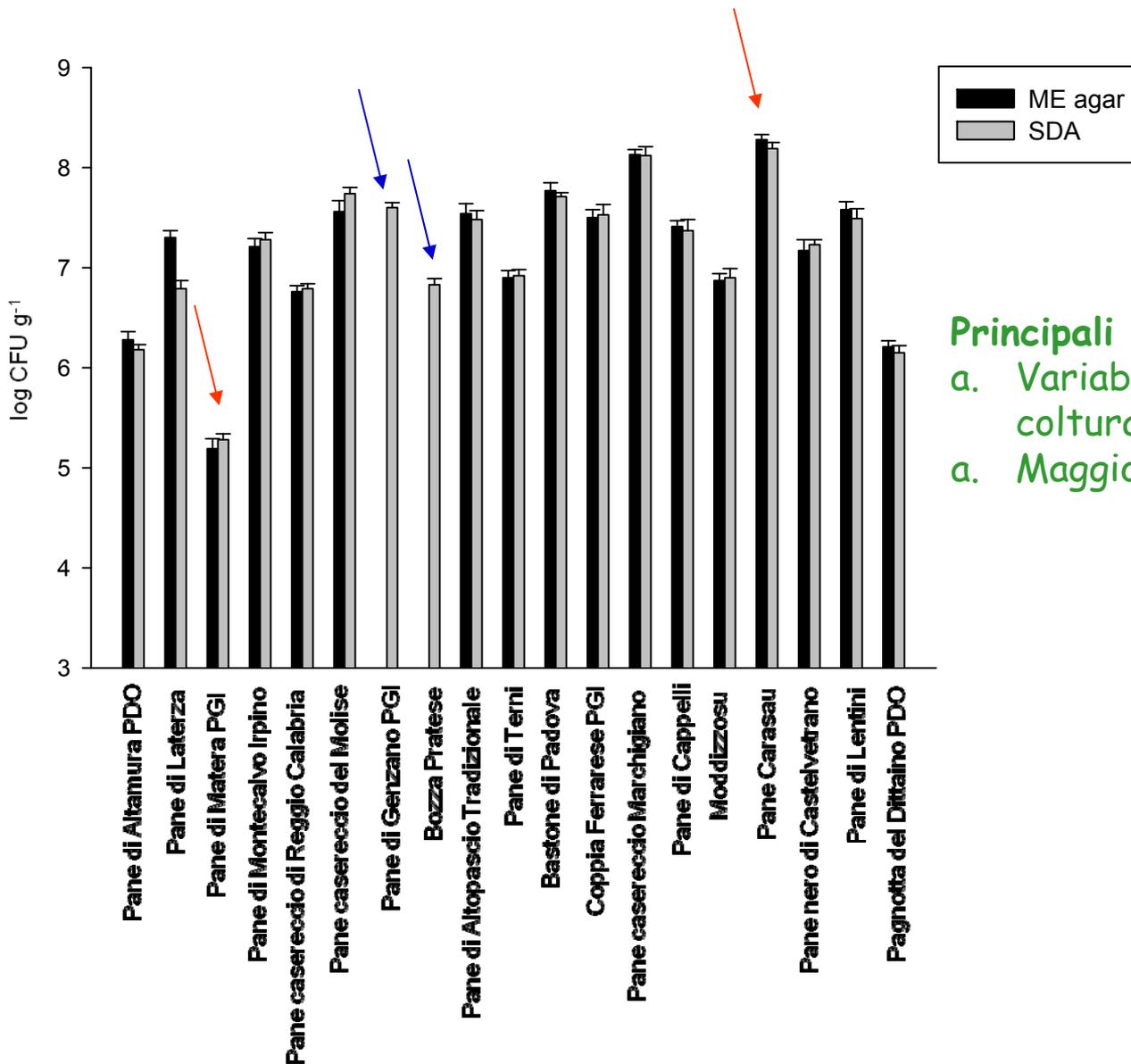


Principali risultati:

- Variabilità in funzione del terreno culturale
- La densità cellulare più elevata è stata riscontrata su SDB e MRS5



Densità cellulari dei lieviti nei lieviti naturali



Principali risultati:

- Variabilità in funzione del terreno colturale
- Maggiore numero di lieviti su SDA

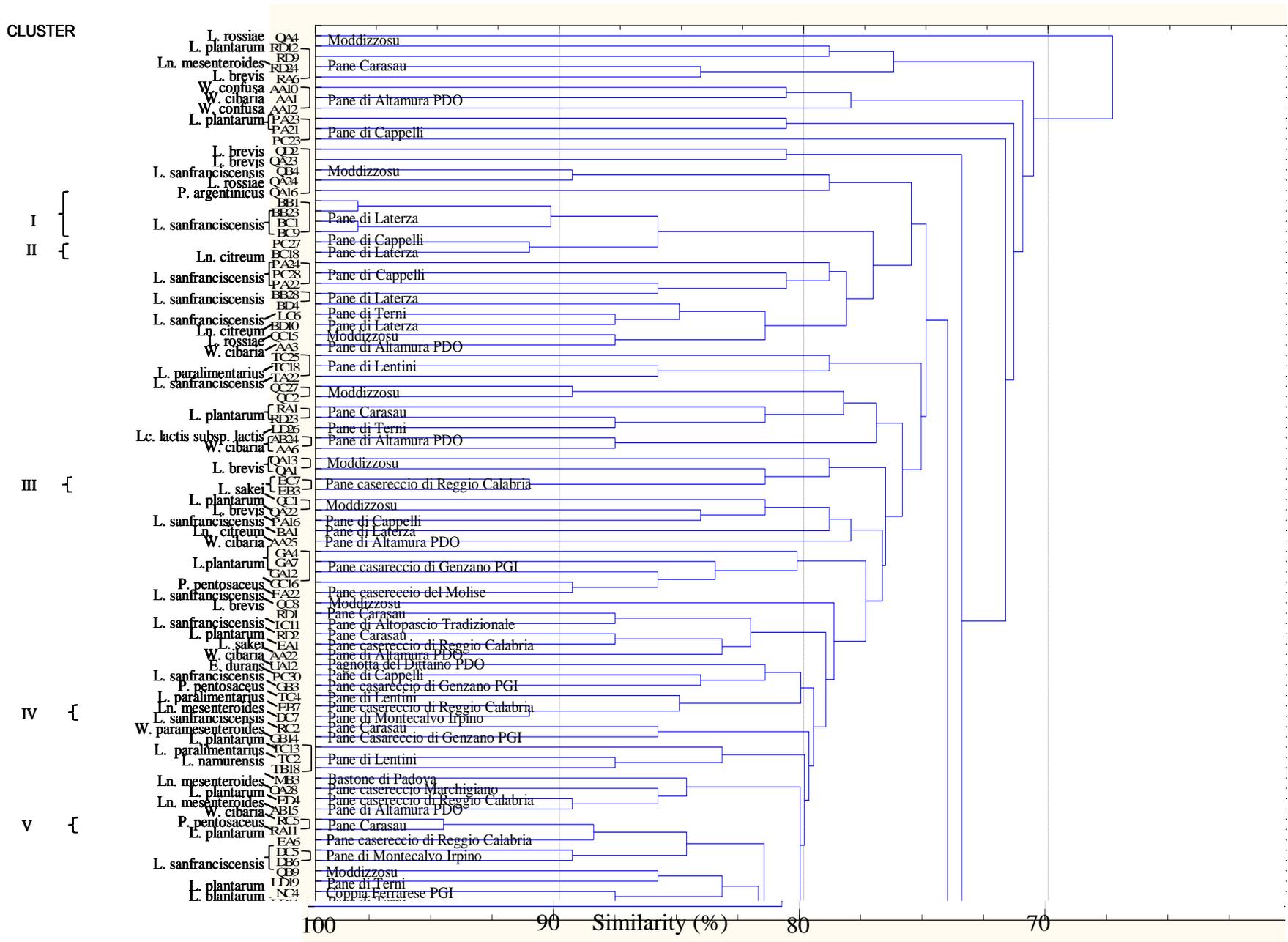


Densità cellulari di batteri lattici e lieviti

•Il rapporto batteri lattici e lieviti nei 19 lieviti naturali analizzati è compreso nel range 100:1 - 10:1. Rapporti diversi (ca. 1:1) sono stati rilevati per il Pane di Montecalvo Irpino e il Pane Casereccio di Genzano PGI.



Clustering dei profili PCR-RAPD dei batteri lattici



Identificazione e caratterizzazione mediante analisi 16S rDNA e PCR-RAPD dei batteri lattici

Lievito naturale	Isolati	Cluster	Specie (percentuale di identità)	Numero di accessione
Pane di Altamura DOP	AC13 (AC20, AD1, AD10, AD11p, AD17)	UC ^e	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AC1 (AD5)	XXIII	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AA25 (AA24)	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AA22	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AA3	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AB15 (AA18, AA21, AB20, AA23, AB2, AB22)	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AB24 (AA4, AA16, AA7, AA8, AA9, AA11)	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AA1 (AA2)	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AA6	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AA12 (AA5, AA13, AA14)	UC	<i>W. confusa</i> (100)	HM032145.1
	AC26	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AA15	UC	NI ^e	
	AA10 (AA19, AA20)	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	AC22p	UC	<i>W. cibaria</i> (99)	HM058481.1
	Pane di Laterza	BA1 (BA2)	UC	<i>Ln. citreum</i> (99)
BC18		II	<i>Ln. citreum</i> (99)	HM058687.1
BB23 (BB22, BB21)		I	<i>L. sanfranciscensis</i> (99)	HM162420.1
BB28 (BB6)		UC	<i>L. sanfranciscensis</i> (99)	HM162420.1
BC9		I	<i>L. sanfranciscensis</i> (99)	HM162420.1
BB1 (BA13, BA17g, BA14, BA10)		I	NI ^f	
BC1		I	<i>L. sanfranciscensis</i> (99)	HM162420.1
BD10		UC	<i>Ln. citreum</i> (99)	HM058687.1
BD4		UC	NI	
Pane di Matera IGP	CA1 (CA8)	XXIII	<i>Ln. citreum</i> (99)	HM058687.1
	CA10 (CA9)	XXIII	<i>Ln. citreum</i> (99)	HM058687.1
	CA25 (CB8, CB11, CB20, CB23, CC21, CC25, CD2, CD12)	XVIII	<i>Ln. citreum</i> (99)	HM058687.1
	CD5	XVII	<i>Ln. citreum</i> (99)	HM058687.1
	CD14 (CA14, CC6, CC12)	XVIII	<i>L. plantarum</i> (100)	EF439680.1

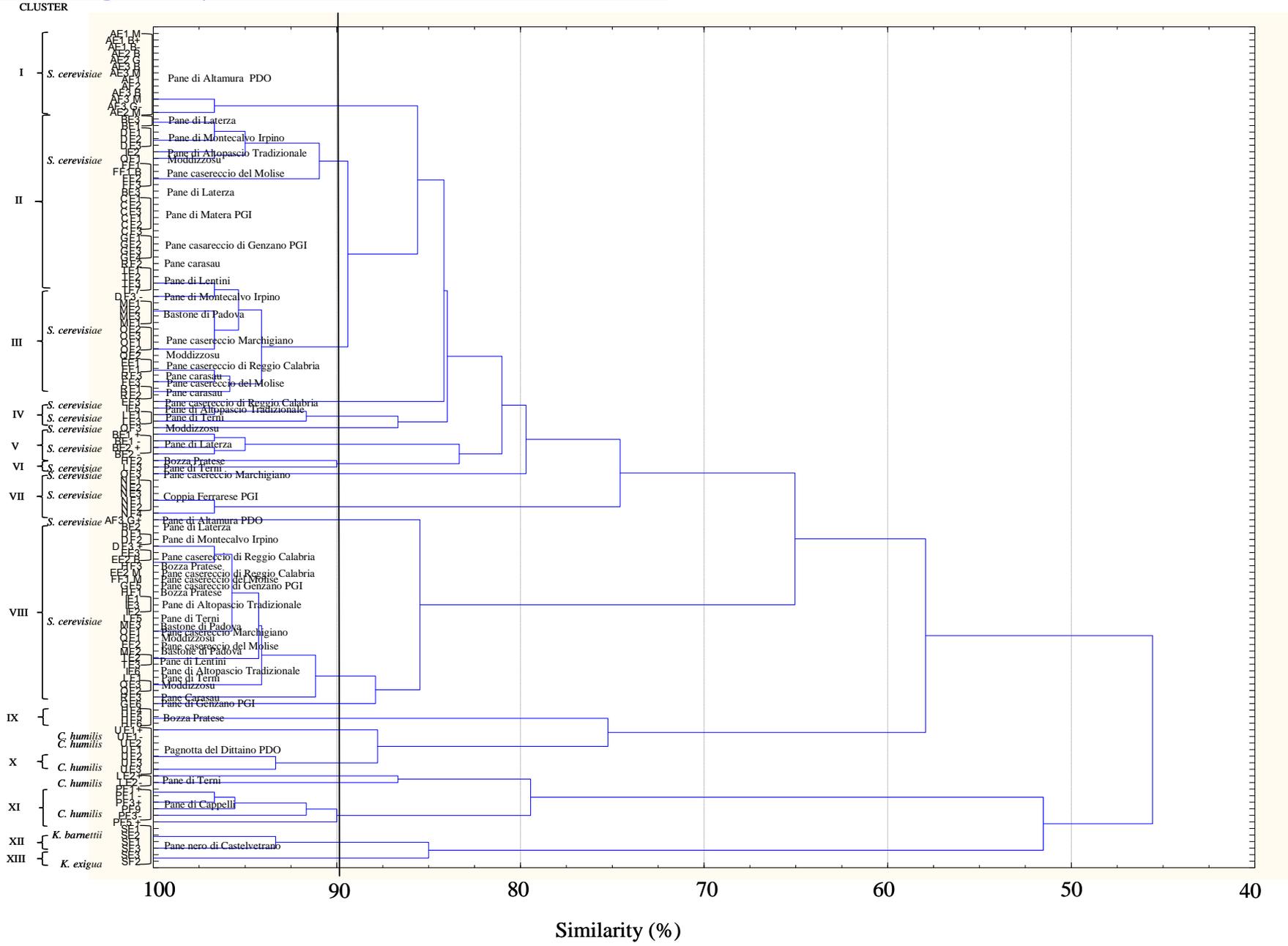
Pani	Isolati	Ceppi	Specie (numero di ceppi)
Pane di Altamura DOP	39	14	<i>W. cibaria</i> (12); <i>W. confusa</i> (1)
Pane di Laterza	17	9	<i>L. sanfranciscensis</i> (4); <i>Leuc. citreum</i> (5)
Pane di Matera IGP	18	5	<i>L. plantarum</i> ; (1) <i>Leuc. citreum</i> (4)
Pane di Montecalvo Irpino	19	8	<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 IGP	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 IGP	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. argentini</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 DOP	10	7	<i>L. sanfranciscensis</i> (4); <i>E. durans</i> (3)

Biodiversità dei lieviti naturali: batteri lattici

- Il numero delle specie identificate nei 19 lieviti naturali varia sensibilmente:
 - - 1 specie (*L. sanfranciscensis*) è stata identificata in Pane di Montecalvo Irpino e Pane Casereccio del Molise;
 - - 6 specie (*L. plantarum*, *L. brevis*, *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *W. paramesenteroides*, *P. pentosaceus* e *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) sono state trovate nel Pane Carasau.
- Il numero di ceppi varia da 5 (Pane di Matera PGI) a 17 (Moddizzosu).
- In accordo con i dati coltura-indipendenti (DGGE), ciascun lievito naturale mostra una combinazione specie/ceppi caratteristica



Clustering dei profili PCR-RAPD dei lieviti



Similarity (%)

Biodiversità dei lieviti naturali: lieviti

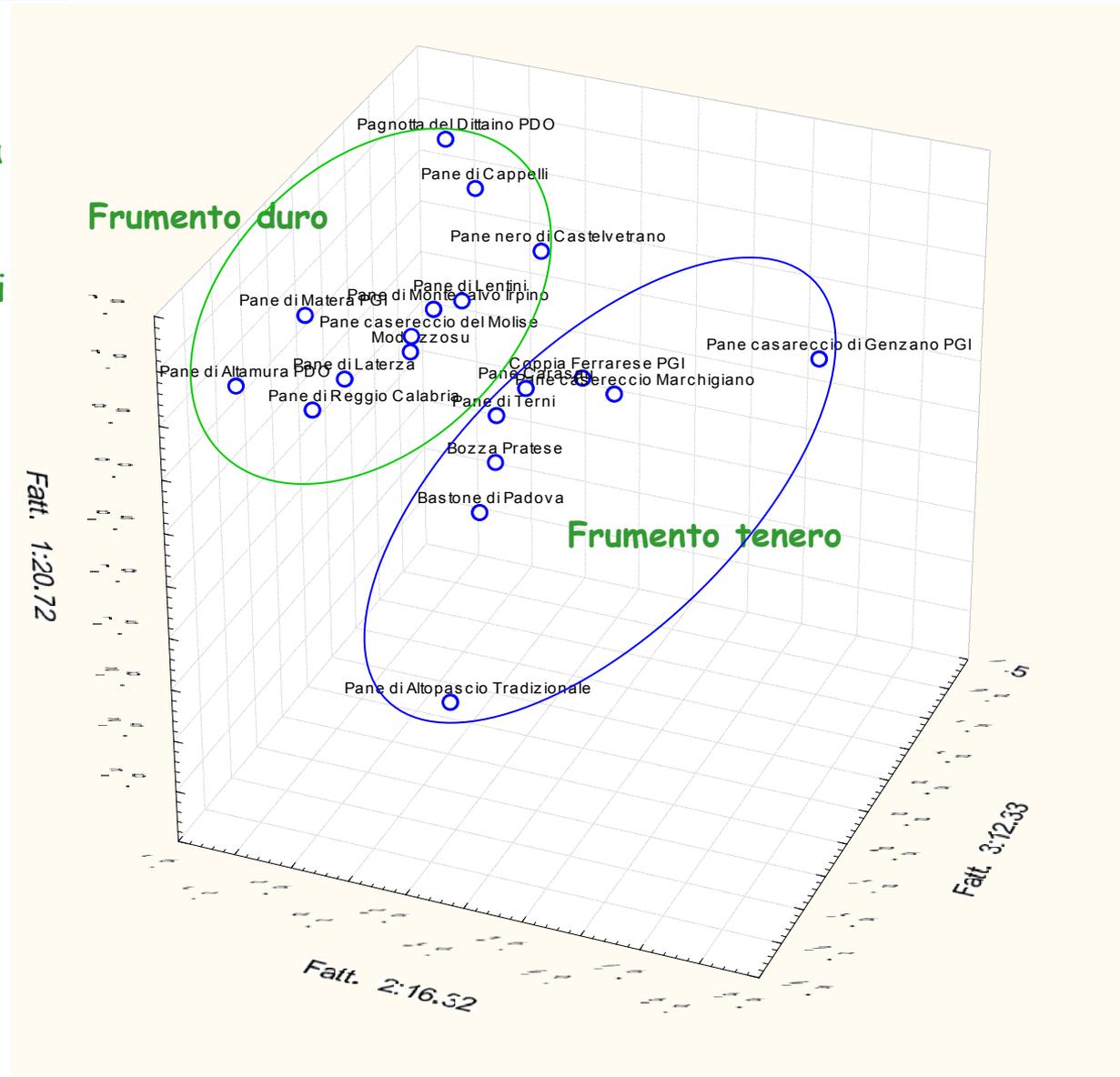
Pani	Isolati	Ceppi	Specie (numero di ceppi)
Pane di Altamura DOP	6	4	<i>S. cerevisiae</i> (4)
Pane di Laterza	6	3	<i>S. cerevisiae</i> (3)
Pane di Matera IGP	6	5	<i>S. cerevisiae</i> (5)
Pane di Montecalvo Irpino	6	2	<i>S. cerevisiae</i> (2)
Pane casereccio di Reggio Calabria	6	4	<i>S. cerevisiae</i> (4)
Pane casereccio del Molise	6	1	<i>S. cerevisiae</i> (1)
Pane casareccio di Genzano IGP	6	5	<i>S. cerevisiae</i> (5)
Bozza Pratese	6	3	<i>S. cerevisiae</i> (3)
Pane di Altopascio Tradizionale	6	1	<i>S. cerevisiae</i> (1)
Pane di Terni	6	5	<i>S. cerevisiae</i> (4); <i>C. humilis</i> (1)
Bastone di Padova	6	3	<i>S. cerevisiae</i> (3)
Coppia ferrarese IGP	6	6	<i>S. cerevisiae</i> (6)
Pane casereccio marchigiano	6	4	<i>S. cerevisiae</i> (4)
Pane di Cappelli	6	3	<i>C. humilis</i> (3)
Moddizzosu	6	4	<i>S. cerevisiae</i> (4)
Pane Carasau	6	2	<i>S. cerevisiae</i> (2)
Pane nero di Castelvetrano	6	2	<i>K. barnettii</i> (1); <i>K. exigua</i> (1)
Pane di Lentini	6	2	<i>S. cerevisiae</i> (2)
Pagnotta del Dittaino DOP	6	4	<i>C. humilis</i> (4)



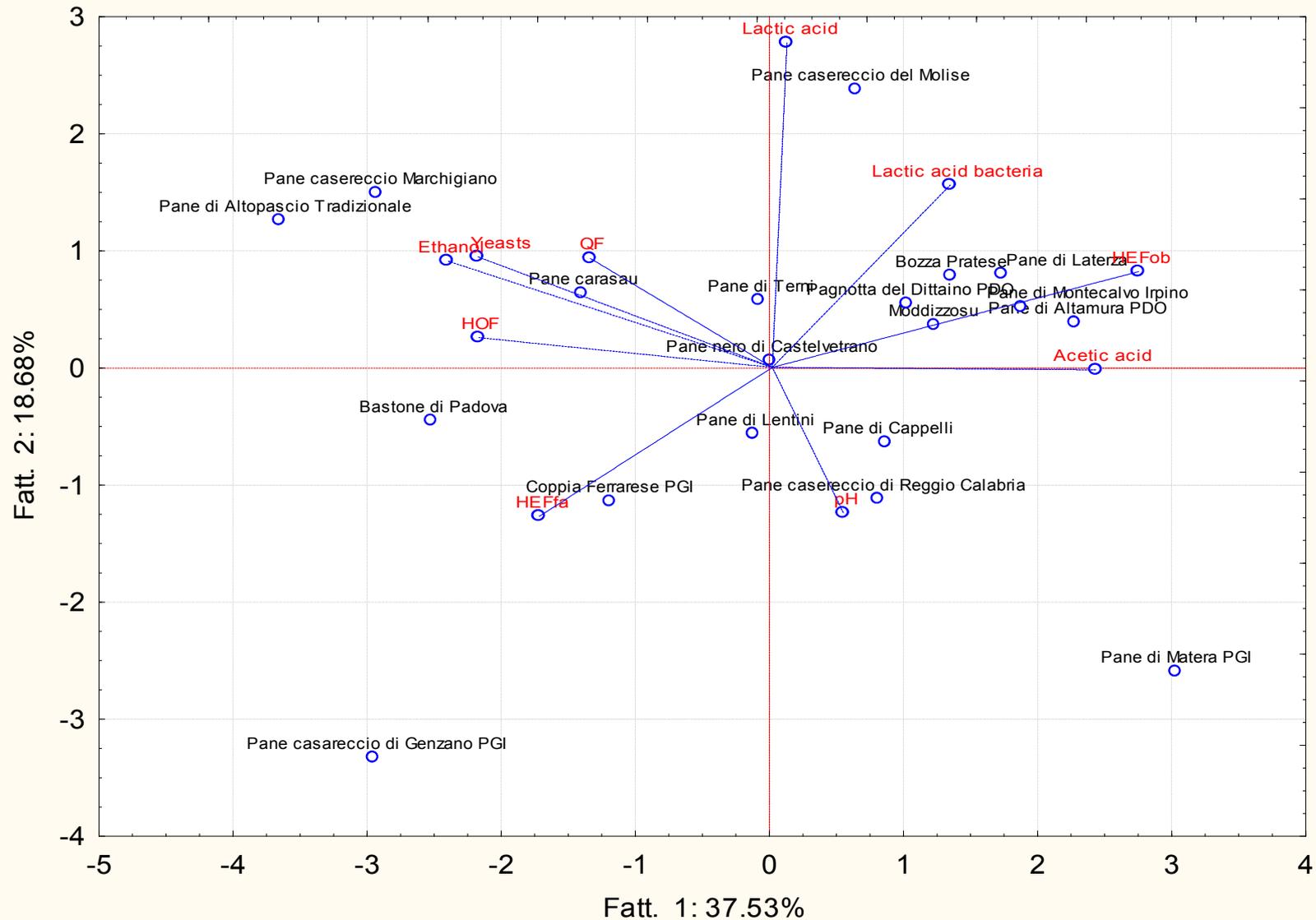
PCA basata sugli ingredienti, i parametri tecnologici e la comunità microbica dei lieviti naturali

Principali risultati:

- Ruolo-chiave del tipo di farina
- Correlazione tra frumento duro e predominanza di batteri lattici eterofermentanti obbligati
- Ruolo secondario di tempo e temperatura di rinfresco (ad eccezione dei casi estremi)



PCA basata sulla comunità microbica e sulle caratteristiche biochimiche dei lieviti naturali



Conclusioni

- I lieviti naturali impiegati per la produzione di pani tipici e/o tradizionali italiani si caratterizzano per la presenza di un microbiota lattico specifico
- La composizione del microbiota è influenzata dall'interazione di fattori ambientali e tecnologici; in particolare dalla farina o semola e limitatamente dal tempo e temperatura dei rinfreschi
- Come atteso, è stata riscontrata una buona correlazione statistica tra la composizione del microbiota e le caratteristiche biochimiche dei lieviti naturali





Taxonomic Structure and Monitoring of the Dominant Population of Lactic Acid Bacteria during Wheat Flour Sourdough Type I Propagation Using *Lactobacillus sanfranciscensis* Starters^V

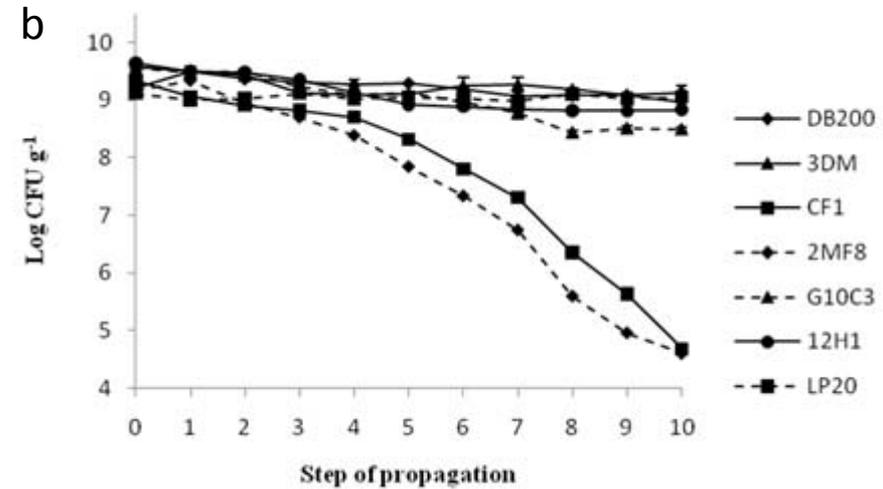
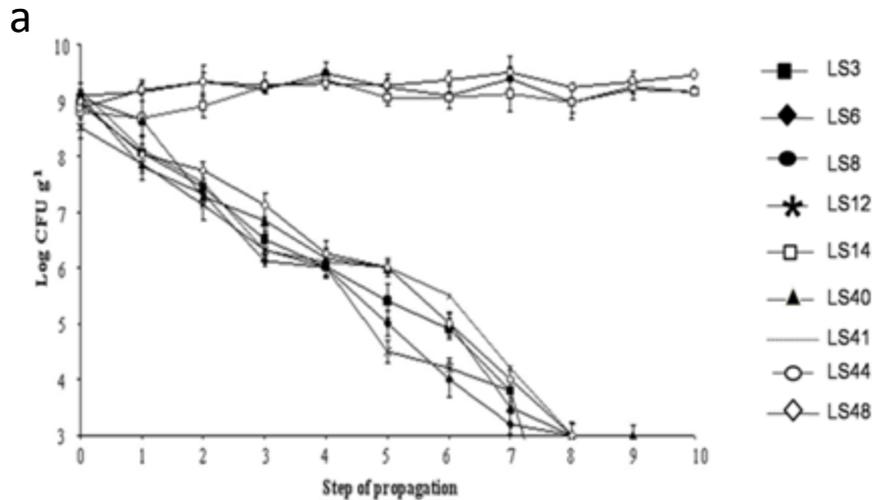
Sonya Siragusa,¹ Raffaella Di Cagno,¹ Danilo Ercolini,² Fabio Minervini,¹
 Marco Gobbetti,¹ and Maria De Angelis^{1*}

Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari, Bari, Italy,¹ and
 Dipartimento di Scienza degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli Federico II, Portici, Italy²

Robustness of *Lactobacillus plantarum* starters during daily propagation of wheat flour sourdough type I

Fabio Minervini*, Maria De Angelis, Raffaella Di Cagno, Daniela Pinto, Sonya Siragusa,
 Carlo Giuseppe Rizzello, Marco Gobbetti

Dipartimento di Protezione delle Piante e Microbiologia Applicata, Università degli Studi di Bari, via Amendola 165/a, 70126 Bari, Italy



Performance di diversi biotipi di *L. sanfranciscensis* (a) e di *L. plantarum* (b) durante 10 giorni di rinfreschi (30°C, 6 h) consecutivi.



Nuovo progetto di ricerca



**Dipartimento di Biologia e
Chimica Agro-Forestale ed Ambientale
Università degli Studi di Bari Aldo Moro**



- Building up the "Italian Sourdough Library" - part II -
The microbiota of the typical and traditional sweet baked goods