



# **Porto Conte Ricerche**

**Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.**

**Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9,  
comma 1, lettera c.**

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **PROPOSTA PER IL PROGRAMMA 2020**

### **Premessa**

La proposta illustra un piano costituito da progetti di ricerca industriale e di sviluppo sperimentale, predisposti con l'obiettivo primario di generare nuovi processi, tecnologie, prototipi e conoscenze a vantaggio del sistema scientifico e produttivo della Regione Sardegna. I diversi progetti presentati sono in linea con i) le traiettorie della Strategia Nazionale di Specializzazione Intelligente (SNSI), che individua priorità di investimento condivise con le regioni e assicura la complementarità tra le azioni previste a livello centrale e quelle a livello territoriale, ii) con la programmazione regionale 2014-2020 e iii) le Aree di Specializzazione regionale, così come descritte nel documento S3 aggiornato al 2015.

Come per le annualità precedenti, si è inteso intervenire nei settori tecnico-scientifici e produttivi per i quali Porto Conte Ricerche può garantire la massima competenza:

1. Acquacoltura
2. Sistemi diagnostici innovativi per markers biomedicali (VET e MED)
3. Biotecnologie applicate per l'alimentazione e per la salute
4. Processi alimentari
5. Packaging alimentare

La spesa complessiva prevista è pari a 1.175.911,00

**Avvio delle attività:** a partire dal 1 gennaio 2021

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## LE ATTIVITA' PREVISTE E GLI OBIETTIVI SPECIFICI

*Quadro sinottico*

<b>Laboratori coinvolti</b>	<b>Attività</b>	<b>Tipologia</b>
Processi alimentari	1. MALTOLA'	Ricerca Industriale
Acquacoltura	2. AQUA 2021	Ricerca Industriale
Processi alimentari Shelf life e Packaging	3. FER_COL 2021	Ricerca Industriale
Processi alimentari Shelf life e Packaging	4. OHM	Ricerca Industriale
Processi alimentari Shelf life e Packaging NMR e Chimica Analitica	5. PACLAB 2021	Ricerca Industriale
Proteomica e Immunodiagnostica	6. DOH	Sviluppo Sperimentale
NMR e Chimica Analitica	7. RACoMix	Ricerca Industriale
Proteomica e Immunodiagnostica NMR e Chimica Analitica Genetica Molecolare	8. CovidOmicS	Ricerca Industriale

Ciascuna scheda progettuale descrive gli **obiettivi** specifici e gli **indicatori** di risultato.

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **Nome progetto**

**Maltolà (ML)- 2020**

## **Settore tecnico-scientifico**

**PROCESSI ALIMENTARI (produzioni brassicole)**

## **Descrizione breve**

**Materie prime locali per la produzione di birre artigianali regionali.**

## **Stato dell'arte e prospettive**

Al momento in Italia esistono solamente due malterie industriali: la SAPLO a Pomezia (Lazio) e l'AgroAlimentare Sud a Melfi (PZ) in Basilicata. La produzione annuale delle due malterie italiane è insufficiente a soddisfare la domanda di malto, e di conseguenza di orzo da birra, nazionale. Negli ultimi anni c'è stata una continua crescita nella produzione e nei consumi. Questa crescita del settore ha riguardato le grandi industrie birrarie ma anche le piccole produzioni artigianali. I microbirrifici ed i brewpub contano attualmente circa un migliaio di unità che rendono il fenomeno della birra artigianale rappresentato omogeneamente in tutto il territorio nazionale. Il malto prodotto dalle due malterie sopra citate, è al servizio, quasi esclusivamente, dei produttori di birra industriale. Nel mercato del malto in Italia esiste una reale difficoltà di reperimento di materia prima per i produttori artigianali di birra, alla quale però si aggiunge una certa diffidenza legata alla mancanza di tradizione nella realizzazione di prodotti all'altezza dei paesi storicamente vocati (Germania, Belgio, Inghilterra e Stati Uniti).

Un altro aspetto da tenere presente riguarda i birrifici agricoli. Questi per la normativa vigente, devono produrre più del 50% delle materie prime per la realizzazione dei loro prodotti. In questo caso la produzione di malto locale, necessaria per poter ricadere in questa tipologia produttiva, può essere realizzata in due maniere:

- Coltivando gli orzi in loco e facendoli maltare in impianti esterni al birrificio.
- Coltivando gli orzi e trasformandoli in maltifici di proprietà.

Nel primo caso, pur all'interno delle regole stabilite per questi birrifici, risulta pressoché impossibile la tracciabilità del prodotto ed il trasporto incide, specie nella nostra isola, in maniera sostanziale sulla economicità dell'operazione. Nel secondo caso, invece, è necessario un investimento strutturale e l'acquisizione di protocolli di trasformazione che garantiscano la qualità del malto ottenuto prima e della birra in seconda battuta.

Il reperimento delle materie prime e in maniera non limitativa tra i cereali al solo orzo, è stato oggetto in passato di progetti di Ricerca che hanno messo in evidenza la potenzialità degli orzi coltivati in loco e valutato la possibilità di produrre birre con cereali appartenenti alla tradizione sarda.

## **Attività di ricerca proposte:**

A partire dagli studi pregressi, e attraverso l'acquisto di una micro-malateria verranno realizzate attività mirate alla realizzazione di protocolli di maltazione di varietà di orzo sia internazionali che appartenenti alla tradizione cerealicola della Sardegna. Le performance tecnologiche dei malti ottenuti verranno valutate attraverso produzioni su scala pilota degli stili birrari più rappresentati nel panorama brassicolo regionale e nazionale.

Le specie oggetto di indagine saranno scelte per il potenziale qualitativo e per la disponibilità durante l'anno.

Le attività permetteranno il raggiungimento del seguente obiettivo specifico:

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

### **OS1 - Realizzazione e trasferimento di protocolli di maltazione per produzioni brassicole.**

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del programma vengono definiti i seguenti indicatori

**Indicatore 1.1** - Almeno 2 diversi protocolli per la realizzazione di malti con orzi (o altri cereali) coltivati in Sardegna con piante officinali/spezie.

**Indicatore 1.2** - Report comprensivo di analisi chimiche sulle materie prime (orzi e altri cereali) e materie seconde (malti), e di analisi chimiche e sensoriali delle birre ottenute.

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **Nome progetto**

**AQUA - 2021**

## **Settore tecnico-scientifico**

**ACQUACOLTURA**

## **Descrizione breve**

**Accrescimento dell'orata (*Sparus aurata* L.) mediante diete innovative e sostenibili**

## **Stato dell'arte e prospettive**

In acquacoltura, uno degli aspetti più importanti riguarda la caratterizzazione delle materie prime da utilizzare per i mangimi e le relazioni fra queste, il valore energetico e nutrizionale dei mangimi stessi, i loro effetti sulle performance di crescita e sui molteplici aspetti che riguardano la salute ed il benessere animale. D'altra parte, i fabbisogni in farine di pesce per le diete destinate alla piscicoltura sono fortemente cresciuti negli anni '90 passando dal 10 al 50% della produzione mondiale (Tacon, 2010). Inoltre, la qualità dell'alimento somministrato ai pesci allevati è in grado di influenzare la qualità del prodotto ottenuto, determinandone l'apprezzamento da parte del consumatore.

Le farine di pesce hanno storicamente rappresentato la principale fonte di proteine nei mangimi per pesci; dal punto di vista dietetico-nutrizionale, infatti, le farine di pesce sono da considerarsi ingredienti proteici virtualmente ideali, caratterizzandosi per l'elevato titolo di proteina (>65%) di alto valore biologico, grazie a livelli e profili equilibrati in aminoacidi essenziali e per elevate digeribilità dei nutrienti e dell'energia.

Al fine di ridurre la forte dipendenza dall'ingente ammontare di proteine di origine acquatica, i ricercatori si sono indirizzati verso la parziale riduzione della farina di pesce, a favore di materie prime alternative, o verso la sostituzione degli oli di pesce con grassi di origine vegetale (Kaushik, 2008). Le recenti formulazioni di mangimi commerciali mirano prevalentemente alla massimizzazione delle performance zootecniche per ridurre il costo di produzione e, quindi, ricorrono all'impiego di materie prime valutate in primo luogo sulla base del loro profilo nutrizionale in relazione al costo. Tra gli ingredienti alternativi alle farine di pesce hanno trovato impiego la farina di soia ed i suoi derivati, farine glutinate di mais, concentrati proteici di erba medica, pisello, fava.

La sostituzione degli oli di pesce con lipidi alternativi nei mangimi per l'acquacoltura presenta aspetti ancor più critici rispetto alle fonti proteiche essendo i lipidi di origine acquatica e marina fonti cospicue di acidi grassi polinsaturi n-3 (EPA e DHA) per il pesce che, a sua volta, è fonte unica di questi acidi essenziali per l'alimentazione umana. L'impiego di oli vegetali, tra cui soia, colza e girasole, comporta un aumento della percentuale di acido linoleico (C18:2 n6) e una riduzione dell'acido eicosapentenoico (C20:5 n3) con conseguente incremento del rapporto n6/n3 (Hunter e Roberts, 2000; Bell et al., 2003; Roncarati et al., 2010). Questo acido grasso polinsaturo, è presente nell'olio di pesce per una quota del 9% mentre nell'olio di soia non supera l'1,5%. Nonostante ciò, le alte quote di grassi vegetali, rischiano di ridurre gli effetti benefici degli acidi grassi omega 3 che, come noto, riguardano la circolazione, la funzionalità cardiaca, l'efficienza del sistema immunitario agendo favorevolmente nella prevenzione di gravi malattie tra cui Alzheimer, artrite reumatoide e cancro (Lopez e Ortega, 2003; Guebre-Egziabher et al., 2008).

Occorre, quindi, cambiare approccio e individuare materie prime e formulazioni che rispondano al "principio della tutela della salute dell'ambiente e dell'uomo", e che siano perfettamente rispondenti ai fabbisogni nutrizionali delle orate allevate.

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

### **Attività di ricerca proposte:**

Nel contesto di tale scenario, viene proposto un progetto di ricerca, in collaborazione con l'Università di Camerino, volto ad approfondire le conoscenze scientifiche relativamente a materie prime innovative, alternative a quelle convenzionali, da impiegarsi nella formulazione di mangimi adatti per tutte le fasi di allevamento dell'orata. L'**obiettivo finale** della ricerca sarà la formulazione di diete bilanciate per orata, che contengano ingredienti innovativi in grado di migliorare le prestazioni zootecniche in allevamento e, al contempo, di fornire un prodotto che sia in grado di apportare elevati acidi grassi essenziali della serie omega 3.

Le attività permetteranno il raggiungimento dei seguenti obiettivi specifici:

**OS1 studiare** gli effetti della somministrazione di diete sperimentali, contenenti materie prime innovative e sostenibili, sulle prestazioni zootecniche, sul benessere delle orate, sulle qualità nutrizionali ed organolettiche delle carni e sulla qualità dell'ambiente.

### **OS2 - Realizzazione e trasferimento di protocolli per l'allevamento dell'orata attraverso l'utilizzo di diete innovative e sostenibili.**

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del programma vengono definiti i seguenti indicatori

**Indicatore 1.1** - Rilievo dei principali parametri biomorfometrici sulle orate impiegate nella prova.

**Indicatore 1.2** - Report comprensivo dei risultati riguardanti le performances zootecniche e la qualità delle carni delle orate analizzate al termine della prova.

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **Nome progetto**

**FER\_COL 2021**

## **Settore tecnico-scientifico**

### **PROCESSI ALIMENTARI**

## **Descrizione breve**

Studio delle proprietà metaboliche dei batteri lattici presenti nella collezione microbica di Porto Conte Ricerche, selezione di ceppi con proprietà metaboliche interessanti e loro impiego nei processi di fermentazione per la produzione di alimenti (pane, pasta, birra).

## **Stato dell'arte e prospettive**

Numerosi alimenti si ottengono attraverso processi di fermentazione condotti da microrganismi, quali batteri lattici e/o lieviti, i quali, con la loro attività metabolica, trasformano un substrato modificandone le caratteristiche fisico-chimiche, sensoriali e la conservabilità. L'azione microbica risulta quindi fondamentale per ottenere alcuni alimenti, si pensi al vino, alla birra, al formaggio, al pane, o altri prodotti che non potrebbero essere ottenuti senza una fermentazione microbica.

Durante un processo di fermentazione i microrganismi producono numerose sostanze, alcune sono prodotti principali del metabolismo microbico e caratterizzano il prodotto finito, si pensi all'acido lattico nello yogurt o l'alcool etilico nella birra, mentre altre sono metaboliti secondari, meno impattanti sulle caratteristiche del prodotto finito, ma con funzioni importanti, quale ad esempio quella di favorire la competizione del ceppo microbico produttore in un ecosistema ricco di microrganismi.

Tra le numerose sostanze prodotte dai microrganismi, le batteriocine sono forse quelle più studiate (Balciunas et al., 2013). La nisina, la batteriocina più studiata e conosciuta, viene prodotta dai lattococchi ed ha una azione inibente nei confronti di microrganismi patogeni, quali la *Listeria*. Attualmente può essere utilizzata in purezza come conservante ed è inoltre facilmente reperibile in commercio con la sigla E234. Altre sostanze derivanti dal metabolismo microbico vengono utilizzate attraverso l'impiego del microrganismo stesso, si pensi ai polisaccaridi prodotti da alcuni batteri lattici (Chavan & Chavan, 2011), che possono avere una funzione prebiotica, e quindi servire da nutrimento per la microflora intestinale, oppure possono migliorare la struttura e la conservabilità dei prodotti da forno.

Negli ultimi anni sono stati scoperti degli altri metaboliti, prodotti sempre dai batteri lattici, in grado di inibire lo sviluppo delle muffe. Diversi lavori scientifici hanno dimostrato che utilizzando, nei processi di fermentazione, batteri produttori di queste sostanze si riesce a impedire o rallentare lo sviluppo delle muffe nei prodotti da forno (Axel et al., 2017).

In Sardegna abbiamo due prodotti particolarmente sensibili allo sviluppo delle muffe, si tratta della pasta fresca ripiena e del pane spianata, per entrambi si cerca di ovviare a questo problema attraverso l'impiego di sistemi di confezionamento in atmosfera modificata, che sfruttano l'effetto inibente della CO<sub>2</sub> sullo sviluppo delle muffe per prolungare la shelf life dell'alimento. Questa tecnologia ha un costo non indifferente che va a gravare sull'economia aziendale. Sul pane spianata possono anche essere impiegati additivi ad azione antimicrobica, quali il propinato, che vengono aggiunti direttamente all'impasto ed hanno una efficace azione inibente nei confronti delle muffe. Anche in questo caso abbiamo degli aspetti negativi, dovuti sia al sapore e odore conferito al pane che alla percezione negativa che hanno molti consumatori sugli additivi. L'impiego di ceppi microbici, produttori di sostanze ad azione antifungina, nei processi



Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

di produzione di questi alimenti potrebbe essere una soluzione ai problemi incontrati dalle aziende che producono pasta fresca e pane spianata.

### **Attività di ricerca proposte**

Il presente progetto propone lo studio e la selezione di ceppi microbici conservati nella collezione di Porto Conte Ricerche, ed il loro utilizzo nello sviluppo di processi tecnologici innovativi di interesse per l'industria agroalimentare. Le attività proposte sono le seguenti:

1. Ricerca di ceppi di lievito (ascomiceti) di interesse per le produzioni brassicole
2. Ricerca dei ceppi di batteri lattici che producono sostanze ad azione antimuffa.
3. Messa a punto dei processi di fermentazione e prove di produzione con l'impiego dei ceppi selezionati.

Nel corso del progetto verranno sviluppate le seguenti attività e verranno raggiunti i seguenti obiettivi specifici:

**Task 1.1** – screening dei ceppi microbici appartenenti alla collezione microbica di Porto Conte Ricerche.

### **OS1.1 Identificare almeno 2 ceppi di batteri lattici produttori di sostanze antimuffa**

#### **Dettaglio delle attività**

I ceppi microbici, appartenenti alla collezione di Porto Conte Ricerche, verranno testati con dei saggi in piastra per verificare la loro attività inibente sullo sviluppo delle muffe. A tale scopo i batteri lattici, conservati a -80°C, verranno fatti sviluppare su substrato liquido e, dopo aver eliminato le cellule, il surnatante verrà sottoposto a liofilizzazione per concentrare i metaboliti prodotti durante la fermentazione. I saggi in piastra verranno effettuati su un terreno colturale adatto allo sviluppo delle muffe. Dopo aver seminato sulla superficie del terreno colturale una sospensione delle spore di muffa, si procederà con il distribuire, sullo stesso terreno, il campione ottenuto dal trattamento del surnatante, attraverso dei dischetti di carta o dei pozzetti. L'azione inibente verrà valutata attraverso la formazione di un alone di inibizione, cioè un mancato sviluppo delle muffe, attorno al dischetto o pozzetto.

**Task 1.2** Messa a punto del processo di fermentazione atto alla produzione delle sostanze interessanti.

### **OS1.2 Ottenere un prodotto fermentato con l'ausilio del ceppo microbico produttore di sostanze antimuffa**

#### **Dettaglio delle attività**

Verranno messi a punto i processi di fermentazione delle semole con l'ausilio dei ceppi selezionati. A tale scopo sarà necessario inoculare il ceppo selezionato in un impasto di semola e acqua, quindi dovranno essere effettuate delle prove per valutare la vitalità e la permanenza, nel tempo, del ceppo microbico produttore di sostanze ad azione antimuffa. Quindi si procederà ad effettuare i rinfreschi giornalieri ed i relativi controlli per verificare la vitalità del ceppo inoculato.

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

**Task 1.3** Prove di produzione di alimenti con il ceppo produttore di sostanze antimuffa

**OS1.3 Prolungare la shelf life del pane e della pasta prodotti con l'ausilio dei ceppi produttori di sostanze antimuffa.**

**Dettaglio delle attività**

Verranno effettuate prove di panificazione e pastificazione utilizzando i prodotti messi a punto in precedenza, cioè la semola fermentata e/o il lievito madre.

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del programma viene definito il seguente indicatore:

**Indicatore 1.1** – screening di almeno 200 ceppi microbici.

## Nome progetto

### Ricerca e innovazione nel settore delle produzioni alimentari

#### Settore tecnico-scientifico

#### PROCESSI ALIMENTARI

#### Stato dell'arte e prospettive

Il **riscaldamento ohmico** è un processo di trattamento termico degli alimenti, durante il quale il calore viene generato grazie al passaggio di una **corrente elettrica all'interno dell'alimento** stesso. Il calore si genera nell'alimento in maniera rapida ed omogenea, **minimizzando il decadimento delle proprietà organolettiche**, con possibilità di trattare anche un alimento liquido con solidi in sospensione.

Con la tecnologia ohmica è possibile effettuare processi di pastorizzazione e/o processi di sterilizzazione, in tempi molto brevi (5/90 secondi) preservando così le caratteristiche dell'alimento, in particolare il colore, la consistenza e il sapore. I sistemi tradizionali di trattamento termico degli alimenti, quali quelli con il vapore, hanno dei tempi di trattamento molto lunghi e ciò si ripercuote negativamente sulle caratteristiche sensoriali del prodotto. La tecnologia ohmica si ritiene però possa trovare applicazione in differenti settori della produzione alimentare sarde, come ad esempio nella produzione del ripieno delle paste fresche, nei succhi e nettari di frutta, nelle puree di frutta e verdura (es. carciofi), nelle creme di formaggio o nei formaggi a pasta filata.

Presso la piattaforma di tecnologie alimentari di Porto Conte Ricerche è presente un impianto ohmico di tipo pilota, discontinuo, in grado di lavorare *batch* di prodotto non superiori ai 20 kg. L'impianto è dotato di una confezionatrice asettica. Da diversi anni Porto Conte Ricerche conduce attività di sperimentazione con l'impiego della tecnologia ohmica, in particolare sulla purea di patate, sulla ricotta, su purea di carciofo e su mosto d'uva. Le attività svolte hanno consentito di appurare l'efficacia del trattamento ohmico nel risanamento microbico del prodotto, la capacità di preservare le caratteristiche sensoriali, la possibilità di preparare semilavorati o prodotti finiti da utilizzare nelle paste fresche.

#### Attività di ricerca proposte

La presente proposta progettuale vuole sperimentare la tecnologia ohmica sui succhi di frutta, estratti da diverse specie arboree, quali arancio, mirto, etc., e valutare le proprietà chimico-fisiche, sensoriali e la shelf life del prodotto.

Nel corso del progetto verranno sviluppate le seguenti attività e verranno raggiunti i seguenti obiettivi specifici:

#### Task 1.1 – Trattamento ohmico del succo

#### OS1.1 Definire dei protocolli di trattamento per i succhi sottoposti ad indagine

#### Dettaglio delle attività

- 1) Reperimento della frutta e preparazione dei succhi
- 2) Prove di trattamento necessarie a stabilire la temperatura più adatta al prodotto.
- 3) Confezionamento asettico del prodotto

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

**Task 1.2** Analisi per la caratterizzazione dei succhi sottoposti a trattamento termico

**OS1.2 Definire le proprietà chimico fisiche, sensoriali e la shelf life dei prodotti sottoposti ad trattamento ohmico**

**Dettaglio delle attività**

- 1) Esecuzione di analisi per stabilire le caratteristiche chimico-fisiche (acidità, proprietà nutrizionali, capacità antiossidante, etc.)
- 2) Analisi sensoriali. Il prodotto verrà confrontato con altri prodotti del commercio.
- 3) Analisi di shelf life. Verrà studiata la stabilità microbiologica ed enzimatica dei prodotti trattati e la durata nel tempo.

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del programma viene definito il seguente indicatore:

**Indicatore 1.1** – Almeno 2 succhi, provenienti da frutti diversi, sottoposti a trattamento ohmico e ad analisi.

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **Nome progetto**

**PACLAB 2021**

## **Settore tecnico-scientifico:**

**PROCESSI ALIMENTARI**

## **Descrizione breve**

Proprietà del pane a sfoglia croccante ottenuto con lievito madre che contiene germe di grano.

## **Stato dell'arte e prospettive**

Il pane Carasau viene comunemente prodotto con l'uso di sfarinati di grano duro, quali semola, semolato rimacinato, o miscele di essi. Sul mercato si trova anche pane carasau ottenuto con l'impiego di sfarinati che contengono anche parti cruscali, provenienti dalle zone più esterne della cariosside di grano. È invece più raro trovare pane carasau ottenuto con sfarinati "whole grain", ottenuti dalla macinazione completa della cariosside, che quindi contengono anche il germe di grano. La presenza del germe di grano da luogo ad odori sgradevoli dopo 20-30 giorni di conservazione, a causa dell'irrancidimento degli acidi grassi presenti nel germe.

Il germe di grano è una delle componenti della cariosside a più alto valore nutrizionale, ma nonostante ciò viene separato dalle farine durante il processo di macinazione del grano, in quanto è in grado di condizionare negativamente le proprietà del prodotto finito. Il germe di grano è ricco di  $\alpha$ -tocoferoli, vitamine del gruppo B, proteine, fibre e sali minerali, ma contiene anche circa il 10% di acidi grassi insaturi, soprattutto acido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linoleico, che sono soggetti all'azione delle lipasi e lipoossigenasi, presenti sempre nel germe, che ne provocano l'irrancidimento. Il processo di cottura ad alte temperature del pane carasau è uno dei fattori che innescano il processo di irrancidimento dei grassi.

La fermentazione microbica è un processo fondamentale nell'ottenimento di alcuni prodotti alimentari. Durante il processo di fermentazione i microrganismi trasformano il substrato nel quale sviluppano, modificando le componenti proteiche, i polisaccaridi e i grassi, producendo altri metaboliti che caratterizzano il prodotto finito.

I processi di fermentazione con l'uso del germe di grano sono stati studiati da pochi ricercatori. Rizzello et al. (2010) hanno studiato il fenomeno nella produzione di pane a mollica. Gli stessi autori (Rizzello et al. 2011) fanno riferimento, in un altro lavoro, alle proprietà antimuffa del germe di grano fermentato. Un lavoro precedente di Boros et al (2005) studiava le proprietà anticancro di un prodotto commerciale ottenuto dalla fermentazione del germe di grano. Non esistono però dei lavori scientifici sull'uso del germe di grano fermentato nei pani a sfoglia croccante.

## **Porto Conte Ricerche e le fermentazioni microbiche.**

Da diversi anni Porto Conte Ricerche si occupa di processi di fermentazione microbica ad uso alimentare. Negli anni è stato messo a punto un lievito madre liquido, preparato con l'impiego di una fermentiera e dei ceppi microbici selezionati appartenenti alla collezione microbica di Porto Conte Ricerche. Sono numerosi i progetti portati avanti e conclusi che riguardano l'uso del lievito madre per la produzione di pani tipici regionali.

La sperimentazione che si intende portare avanti è sicuramente innovativa dal punto di vista scientifico-tecnologico, ma soprattutto potrebbe contribuire ad innovare il settore agroalimentare isolano.

## **Attività di ricerca proposte**

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

Il progetto proposto vuole studiare le proprietà del pane a sfoglia croccante ottenuto con l'impiego di lievito madre che contiene germe di grano .

Nel corso del progetto verranno sviluppate le seguenti attività e verranno raggiunti i seguenti obiettivi specifici:

**Task 1.1** Produzione di pane carasau con lievito madre contenente germe di grano

**OS1.1 Mettere a punto la tecnologia di produzione del pane carasau con l'impiego di un lievito madre che contiene germe di grano.**

#### **Dettaglio delle attività**

Il lievito madre contenente il germe di grano verrà utilizzato nel processo di produzione del pane carasau. Queste attività verranno condotte nell'impianto pilota di Porto Conte Ricerche o con la collaborazione di un'azienda che produce pane carasau.

**Task 2.1** Studio delle proprietà del pane e definizione della shelf life

**OS 2.1 Definire le proprietà strutturali e quelle sensoriali del pane.**

**OS 2.2 Definire la shelf life del pane carasau.**

**OS 2.3 Definire le proprietà chimico-fisiche e nutrizionali del pane.**

#### **Dettaglio delle attività**

Il pane che contiene germe di grano verrà conservato a temperatura controllata e analizzato durante la conservazione, per circa 6 mesi. Le stesse analisi verranno eseguite sul pane prodotto con l'uso del germe di grano non sottoposto a processo di fermentazione, che fungerà da campione di controllo.

Sul pane verranno effettuate le seguenti analisi:

- analisi sensoriali, con l'ausilio di un panel di assaggiatori addestrato, per stabilire la formazione di odori e/o sapori anomali;
- analisi di struttura, per stabilire la croccantezza del pane.
- Analisi chimiche, per stabilire l'acidità del prodotto ed il contenuto in acidi organici.
- Analisi nutrizionali, per definire il profilo degli acidi grassi (GC, NMR) e amminoacidi (HPLC).
- Analisi della cinetica di irrancidimento mediante NMR

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del programma vengono definiti i seguenti indicatori:

**Indicatore 2** – Ottenimento di almeno 1 formulazione di pane a sfoglia croccante con l'uso di semola con germe di grano fermentato, con proprietà tecnologiche, sensoriali, composizionali e nutrizionali definite.

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **Nome progetto**

**DOH - Devices for One Health**

## **Settore tecnico-scientifico**

**SISTEMI DIAGNOSTICI INNOVATIVI PER MARKERS BIOMEDICALI (VET E MED)**

## **Descrizione breve**

**Sviluppo di sistemi diagnostici, basati su spettrometria di massa e Immunochimica, per la detection quali-quantitativa di potenziali marcatori di interesse biomedico/veterinario.**

## **Stato dell'arte e prospettive**

Porto Conte Ricerche svolge, da anni, numerose attività nell'ambito della ricerca di biomarcatori specifici e lo sviluppo di metodi diagnostici, attraverso approcci complementari ed integrati, che sfruttano il *know how* e le potenzialità tecnologiche presenti presso la struttura. Grazie alle competenze maturate dai laboratori afferenti (Proteomica e Immunodiagnostica, NMR e Chimica analitica, Genetica molecolare), il Settore Ricerca Biotecnologie Applicate offre la possibilità di sviluppare prodotti e servizi ad alto valore innovativo che includono saggi "targeted" quantitativi in MS (PRM, Parallel Reaction Monitoring), saggi immunodiagnostici (western immunoblotting, ELISA e lateral flow), oltre che metodi basati su imaging e genetica.

Il laboratorio di Proteomica e Immunodiagnostica, in modo particolare, ha maturato esperienza di biomarker discovery e sviluppo di sistemi diagnostici in vari ambiti, ad esempio nel campo delle mastiti di ruminanti<sup>1-8</sup> (malattie infettive causate da differenti agenti patogeni) e dell'echinococcosi cistica (EC, una zoonosi ad elevata incidenza in Sardegna), sia per la salute umana, che per quella animale<sup>9-11</sup>. Oltre a tali tematiche, numerosi sono stati gli argomenti di interesse, come lo studio dei delicati rapporti tra eubiosi e disbiosi nell'uomo e in modelli animali<sup>12-13</sup>, ma anche di patologie di animali da affezione, come le cardiomiopatie feline<sup>14</sup>.

## **Il ruolo della spettrometria di massa e dell'immunochimica nella diagnostica**

La spettrometria di massa interfacciata alla cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC-MS/MS) ha conquistato negli ultimi 10 anni un posto di rilievo nel settore chimico clinico, grazie alla elevata sensibilità, all'ampio range dinamico ed alla versatilità applicativa. Nella modalità di selezione "targeted", gli spettrometri aventi idonea geometria strumentale possono operare selettivamente nella detection e quantificazione di analiti di interesse, consentendo di raggiungere livelli di sensibilità e specificità estremamente vantaggiosi. Essendo una tecnica basata sulla selezione di analiti in base al rapporto massa/carica, non è, inoltre, soggetta a meccanismi di aspecificità ed è adattabile a qualunque tipologia di analita<sup>15</sup>. I saggi immunochimici quali WB, ELISA<sup>16</sup> e lateral flow<sup>17</sup> si basano sulla specificità del legame antigene-anticorpo che, associata alla sensibilità di marcatori/traccianti (enzimi, isotopi, sostanze fluorescenti), forniscono un valido supporto alla diagnostica, garantendo la rilevazione dell'analita in modo specifico e sensibile. La presenza dell'analita che può essere un anticorpo, una proteina o qualsiasi molecola immunogena, viene rilevata nei fluidi biologici, in modo qualitativo (presenza o assenza), semi-quantitativo o quantitativo. I saggi immunochimici sono altamente adattabili e possono essere applicati a diversi formati a seconda delle esigenze dell'utente finale. Si va, infatti, da test da laboratorio come l'ELISA, capace di analizzare in modo affidabile più campioni contemporaneamente, a "test da campo"

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

come i lateral flow, ossia sistemi POC (point of care), che rilevano in modo molto rapido l'analita e soprattutto possono essere usati facilmente anche da personale non specializzato.

### **Attività di ricerca proposte**

Le attività svolte in precedenti progetti di ricerca, come ad esempio ex art.9 LR 20/2015 annualità 2018 e 2019, hanno permesso di identificare nuovi potenziali biomarcatori per la rilevazione di condizione di patologia (EC, mastiti, dismicrobismi, cardiomiopatie ed altro), in ambito umano e veterinario (animali da allevamento e/o da affezione). Questi biomarcatori verranno utilizzati per sviluppare nuovi sistemi diagnostici, basati su spettrometria di massa e/o metodi immunochimici (western immunoblotting, lateral flow, ELISA), per generare nuove soluzioni diagnostiche, complementari o alternative a quelle già disponibili.

Il progetto si articolerà in 2 principali attività che includeranno 2 obiettivi specifici, descritti come segue:

### **OS1. Sviluppo di metodi di spettrometria di massa per la detection e la quantificazione di nuovi marcatori di condizione ed implementazione di metodi già sviluppati.**

#### **Attività**

Sfruttando putativi marcatori individuati nei vari ambiti di interesse (mastiti, dismicrobismi, cardiomiopatie) si procederà alla messa a punto di almeno un metodo in spettrometria di massa quali-quantitativa per la rilevazione di condizione di patologia, in campioni biologici ed all'implementazione e validazione di metodi precedentemente sviluppati, quale ad esempio, quello mirato alla ricerca di marcatori di mastite nel latte.

### **OS2. Sviluppo di metodi immunochimici per la detection di marcatori di condizione ed implementazione di metodi già sviluppati.**

#### **Attività**

Si proseguirà la collaborazione con l'Ospedale San Francesco di Nuoro, per la diagnostica della EC umana. Saranno raccolti campioni di siero ed altri biofluidi da soggetti donatori provenienti da zone endemiche, da pazienti conclamati e da soggetti professionalmente a rischio, per i quali si procederà alla valutazione delle performance dei test western immunoblotting, ELISA e lateral flow messi a punto a PCR. In collaborazione con l'IZS si condurrà, inoltre uno studio su campioni ovini, che, attraverso l'utilizzo di una o più preparazioni antigeniche che PCR provvederà a produrre ed a testare, consentirà lo sviluppo di un prototipo immunodiagnostico per EC ovina. Saranno inoltre svolte altre attività volte ad implementare i sistemi diagnostici sviluppati su tematiche di interesse (es.: mastiti).

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del progetto sono definiti i seguenti indicatori:

**Indicatore 1:** Sviluppo di almeno un metodo MS-based per la rilevazione di marcatori di condizione.

**Indicatore 2:** Valutazione performance del test ELISA e lateral flow multiantigen, su almeno 100 campioni di fluidi biologici umani.



## Bibliografia

1. Pisanu S, Cacciotto C, Pagnozzi D, Uzzau S, Pollera C, Penati M, Bronzo V, Addis MF. Impact of *Staphylococcus aureus* infection on the late lactation goat milk proteome: New perspectives for monitoring and understanding mastitis in dairy goats. *Journal of Proteomics*, 2020 Jun; 221:103763. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103763.
2. Pisanu S, Cacciotto C, Pagnozzi D, Puggioni GMG, Uzzau S, Ciaramella P, Guccione J, Penati M, Pollera C, Moroni P, Bronzo V, Addis MF. Proteomic changes in the milk of water buffaloes (*Bubalus bubalis*) with subclinical mastitis due to intramammary infection by *Staphylococcus aureus* and by non-aureus staphylococci. (2019) *Scientific Reports*, 2019 Nov; 9 (1):15850. DOI: 10.1038/s41598-019-52063-2.
3. Addis MF, Pisanu S, Marogna G, Cubeddu T, Pagnozzi D, Cacciotto C, Campesi F, Schianchi G, Rocca S, Uzzau S. Production and release of antimicrobial and immune defense proteins by mammary epithelial cells following *Streptococcus uberis* infection of sheep. *Infection and Immunity*, 2013 Sep; 81 (9): 3182-97. DOI: 10.1128/IAI.00291-13.
4. Addis MF, Pisanu S, Ghisaura S, Pagnozzi D, Marogna G, Tanca A, Biossa G, Cacciotto C, Alberti A, Pittau M, Roggio T, Uzzau S. Proteomics and pathway analysis of the milk fat globule in sheep naturally infected by *Mycoplasma agalactiae*: insights into the in vivo response of the mammary epithelium to bacterial infection. *Infection and Immunity*. 2011 Sep; 79(9):3833-3845. DOI: 10.1128/IAI.00040-11.
5. Puggioni GMG, Tedde V, Uzzau S, Guccione J, Ciaramella P, Pollera C, Moroni P, Bronzo V, Addis MF. Evaluation of a bovine cathelicidin ELISA for detecting mastitis in the dairy buffalo: Comparison with milk somatic cell count and bacteriological culture. *Res Vet Sci*, 2020;128:129-134.
6. Tedde V, Bronzo V, Puggioni GMG, Pollera C, Casula A, Curone G, Moroni P, Uzzau S, Addis MF. Milk cathelicidin and somatic cell counts in dairy goats along the course of lactation. *J Dairy Res*, 2019 May;86(2):217-22.
7. Addis MF, Tedde V, Puggioni GMG, Pisanu S, Casula A, Locatelli C, Rota N, Bronzo V, Moroni P, Uzzau S. Evaluation of milk cathelicidin for detection of bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 2016; 99(10):8250-8258. DOI: 10.3168/jds.2016-11407.
8. Addis MF, Tedde V, Dore S, Pisanu S, Puggioni GMG, Roggio AM, Pagnozzi D, Lollai S, Cannas EA, Uzzau S. Evaluation of milk cathelicidin for detection of dairy sheep mastitis. *Journal of Dairy Science*, 2016 Aug; 99(8):6446-6456. DOI: 10.3168/jds.2015-10293.
9. Pagnozzi D, Tamarozzi F, Roggio AM, Tedde V, Addis MF, Pisanu S, Masu G, Santucci C, Vola A, Casulli A, Masala G, Brunetti E, Uzzau S. Structural and immunodiagnostic characterization of synthetic antigen B subunits from *Echinococcus granulosus* and their evaluation as target antigens for cyst viability assessment. *Clinical Infectious Diseases*, 2018 Apr; 66(9):1342-1351. DOI: 10.1093/cid/cix1006.
10. Pagnozzi D, Addis MF, Biossa G, Roggio AM, Tedde V, Mariconti M, Tamarozzi F, Meroni V, Masu G, Masala G, Brunetti E, Uzzau S. Diagnostic Accuracy of Antigen 5-Based ELISAs for Human Cystic Echinococcosis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2016, 29;10(3):e0004585.
11. Pagnozzi D, Biossa G, Addis MF, Mastrandrea S, Masala G, Uzzau S. An easy and efficient method for native and immunoreactive *Echinococcus granulosus* antigen 5 enrichment from hydatid cyst fluid. *PLoS One*, 2014 Aug; 13;9(8):e104962.

12. Palomba A, Tanca A, Addis MF, Pagnozzi P, Uzzau S. The Sarda Sheep Host Fecal Proteome. *Proteomics*, 2018 Feb;18(3-4).
13. Tanca A, Palomba A, Pisanu S, Deligios M, Fraumene C, Manghina V, Pagnozzi P, Addis MF, Uzzau S. A straightforward and efficient analytical pipeline for metaproteome characterization. *Microbiome*, 2014 Dec 10;2(1):49.
14. Carcangiu L, Pisanu S, Tore S, Addis MF, Zini E, Uzzau S, Pagnozzi D. All Cats are Gray in the Dark: Enrichment/Depletion Approaches for Biomarker Discovery on *Felis catus* Plasma. *Proteomics* 2018 Oct, 18(20):e1800191. DOI: 10.1002/pmic.201800191.
15. Lindemann C, Thomanek N, Hundt F, Lerari T, Meyer HE, Wolters D, Marcus K. Strategies in relative and absolute quantitative mass spectrometry based proteomics. *Biol Chem*, 2017 May 1;398(5-6):687-699.
16. Sandeep K. Vashist, John H.T. Luong: Chapter 5 – Enzyme-Linked Immunoassays. *Hanhbook of Immunoassay Technologies*, 2018, pages 97 -127
17. Aart Van Amerongen, Jeroen Veen, Hugo A.Arends, Marjo Koets: Chapter 7 - Lateral Flow Immunoassays. *Hanhbook of Immunoassay Technologies*, 2018, pages 157 -182

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **Nome progetto**

**RACoMix - Rapid Analyses of Complex Mixtures**

## **Settore tecnico-scientifico**

**BIOTECNOLOGIE APPLICATE PER L'ALIMENTAZIONE E PER LA SALUTE**

## **Descrizione breve**

**Nuovi metodi analitici per la caratterizzazione chimica dei sistemi complessi**

## **Stato dell'arte e prospettive**

L'ottenimento di dettagliate informazioni composizionali e dinamiche è di fondamentale importanza nelle biotecnologie. Nel settore agrifood tale obiettivo è necessario al fine di garantire importanti caratteristiche come qualità, autenticità, conservabilità e caratteristiche sensoriali (odore, sapore, consistenza). Nel settore biomedicale permette una corretta valutazione dei processi fisiologici e metabolici mediante lo studio di tessuti e biofluidi, oltre che supportare la ricerca farmaceutica e della biologia cellulare (ad es. nella caratterizzazione di terreni di coltura sia sintetici che complessi). Esempi tipici di sistemi molecolari particolarmente complessi sono rappresentati dalle classi degli zuccheri, delle proteine, dei lipidi. Gli zuccheri, in particolare, sono rappresentati da un'ampia varietà di molecole strutturalmente molto simili fra loro e spesso coesistenti nella stessa matrice, che possono avere con il tempo numerose reazioni. Ad esempio negli alimenti subiscono reazioni di fermentazione, transizione di fase, aggregazione o disaggregazione. Le proteine interagiscono più o meno fortemente con altri componenti molecolari (zuccheri, lipidi, acqua) dipendentemente dal processo produttivo o dalla conservazione/stagionatura, spesso determinando le caratteristiche sensoriali di numerosi prodotti alimentari. I lipidi sono i responsabili di numerose proprietà degli alimenti, come le caratteristiche nutrizionali e sensoriali (colore, odore, consistenza o "sensazione in bocca") e sono anch'essi rappresentati da molecole spesso molto simili fra loro. Lo studio di queste classi molecolari, inoltre, è fondamentale per la comprensione dei fenomeni di assorbimento e metabolismo degli stessi nutrienti, che a loro volta dipendono dallo stato chimico-fisico in cui si trovano, al momento dell'ingestione, le piccole molecole, le macromolecole (proteine, polisaccaridi, etc.) e l'acqua. Per questo, l'analisi di questi componenti molecolari fondamentali è spesso *time-consuming* e complessa e talvolta diretta solo a poche molecole target. Le tecniche principalmente utilizzate sono l'HPLC, la gascromatografia e la spettrometria di massa. Quasi sempre queste tecniche prevedono l'estrazione dei componenti di interesse, la loro derivatizzazione e lunghi tempi di analisi. Le interazioni fra i componenti, invece, è spesso affrontata mediante reologia o analisi termiche. In questo contesto, si rendono necessari approcci più rapidi e che possibilmente non richiedano una lunga preparativa. In questo la Risonanza Magnetica Nucleare, nelle sue varie applicazioni, rappresenta un tecnica di elezione.

## **Metodi rapidi di analisi basati sulla Risonanza Magnetica Nucleare**

Numerosi passi avanti sono stati fatti verso l'ottimizzazione di sequenze selettive per la caratterizzazione NMR di miscele complesse. Esempi sono le sequenze REST<sup>1</sup>, le TOCSY selettive<sup>2</sup>, le CSSF-TOCSY-INEPT<sup>3</sup>, le risonanze altamente selettive (Hz) combinate allo schema di mixing TOCSY<sup>4</sup>, solo per citarne alcune. Le analisi di rilassometria NMR a basso e ad alto campo, a loro volta, permettono uno studio dettagliato delle interazioni fra componenti molecolari in miscele complesse e solidi eterogenei<sup>5-9</sup>. Tali studi basati sull'NMR, rispetto alle succitate metodiche più diffuse, delle quali comunque si produrranno dati sperimentali,

hanno i vantaggi di essere rapide, non distruttive (o addirittura non invasive in alcuni casi), richiedono al massimo semplici e veloci protocolli di preparazione (centrifugazione, filtrazione, diluizione), sono quantitative e non necessitano derivatizzazione dei campioni, né separazione dei componenti. Tuttavia, in alcuni casi richiedono una preliminare ottimizzazione dei parametri di acquisizione, un corretto settaggio strumentale e personale esperto e specializzato nelle applicazioni NMR più avanzate.

### **Attività di ricerca proposte**

1. Integrazione dell'offerta analitica presso il Laboratorio di NMR e Chimica Analitica di Porto Conte Ricerche tramite l'implementazione di nuove metodiche NMR e ottimizzazione dei rispettivi parametri strumentali tramite lo studio di sistemi modello.
2. Caratterizzazione di sistemi reali selezionati e di interesse per le biotecnologie applicate sia all'agroalimentare che alla biomedicina.
3. Studio mediante metodi rapidi NMR delle alterazioni causate da specifiche condizioni (di processo per gli alimenti e metaboliche per organismi viventi) su sistemi selezionati.
4. Comparazione dei risultati con dati cromatografici

Sebbene il Laboratorio NMR e Chimica Analitica vanti una lunga esperienza nell'analisi di piccole molecole, l'implementazione di sequenze NMR specifiche sviluppate negli ultimi anni per lo studio di miscele complesse renderebbe ancora più competitivo il Laboratorio stesso nelle partnership con enti di ricerca ed aziende e completerebbe l'offerta di servizi tecnologici. Le metodiche ottimizzate avrebbero una rilevanza a prescindere dalla matrice studiata e quindi dal campo specifico di applicazione. Infatti si prevede che le stesse possano essere applicate, una volta ottimizzate, a qualsiasi matrice.

Le attività di cui sopra permetteranno il raggiungimento dei seguenti obiettivi specifici:

### **OS1. Ottimizzazione di nuove metodiche NMR quantitative e rapide per l'analisi di zuccheri (del tipo REST, selTOCSY, CSSF) su sistemi modello.**

#### **Attività:**

- Analisi NMR della frazione glucidica in miscele "modello" preparate ad hoc per la validazione del metodo

### **OS2. Applicazione delle metodiche NMR di cui all'OS1 e di metodiche rilassometriche NMR per l'analisi di zuccheri su sistemi reali.**

#### **Attività:**

- Analisi HR-NMR di succhi di frutta, bevande fermentate (vino/birra) e mediante rilassometria NMR di prodotti da forno (pane/dolci) e comparazione con tecniche cromatografiche.
- Analisi di biofluidi (urine/sieri di sangue) .

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del progetto vengono definiti i seguenti indicatori:

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

**Indicatore 1** – Analisi quali-quantitativa NMR di una miscela complessa di zuccheri a concentrazione nota.

**Indicatore 2** – Almeno 1 prodotto alimentare caratterizzato e almeno 1 biofluido caratterizzato.

### **Bibliografia**

1. Dal Poggetto et al. Chem. Commun. 2017, 53:7461-7464
2. Scano, Anedda et al., Journal of the American Oil Chemists' Society 2011, 88 (9), 1305-1316),
3. Yang, L., Magn. Reson. Chem. 2015, 53, 304-308
4. Schievano et al. Anal. Chem. 2017, 89, 24, 13405–13414
5. Korb, Bryant, J Chem. Phys. 2001, 115(23)10964-10974
6. Hills et al. Food Chem, 1990, 95-111;
7. Mulas et al. J. Dairy Sci. 96 (12), 7393-7403
8. E Curti et al., Int. Dairy J, 2019, 90, 95-97
9. Hills, Remigereau, Int. J. Food. Sci. Tech. 1997, 32(1), 51-61

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

## **Nome progetto**

**CovidOmics - Studio con tecnologie "OMICS" di estratti biologici da pazienti con infezione da SARS-CoV-2**

## **Settore tecnico-scientifico**

**BIOTECNOLOGIE APPLICATE PER LA SALUTE**

## **Descrizione breve**

**Approccio multidisciplinare per la comprensione delle implicazioni metaboliche e fisiologiche del virus SARS-CoV-2 a livello sistemico.**

## **Stato dell'arte e prospettive**

SARS-CoV-2 è un ceppo virale appartenente al genere *Betacoronavirus*, della famiglia dei coronavirus (*Coronaviridae*), responsabili di patologie che vanno dal raffreddore comune a malattie più gravi come la sindrome respiratoria mediorientale (MERS) e la sindrome respiratoria acuta grave (SARS). Questo virus è responsabile della *Severe acute respiratory syndrome* ora denominata COVID-19, che sta causando l'attuale epidemia di coronavirus nel mondo<sup>1</sup> e che presenta caratteri di unicità anche rispetto alle più recenti epidemie dovute ad altri coronavirus (SARS-CoV e MERS-CoV). Il grande sforzo iniziale principalmente diretto alla rapida diagnosi della patologia con metodiche molecolari consolidate in virologia, quali l'identificazione diretta di acidi nucleici su tamponi rino-faringei tramite RT-PCR, non ha consentito ancora lo sviluppo degli approcci tesi alla definizione dell'alterazione dei metabolismi e dei processi biologici in atto nel paziente e le possibili implicazioni della patologia COVID-19 a livello sistemico. Sono inoltre evidenti importanti lacune nella conoscenza dell'origine, dell'epidemiologia, della durata della trasmissione umana e dello spettro clinico. Queste lacune potrebbero essere almeno in parte colmate mediante l'utilizzo di un approccio multidisciplinare, che includa le tecnologie "OMICS", ovvero le tecnologie genomiche, proteomiche e metabolomiche per effettuare una caratterizzazione esaustiva delle molecole biologiche (geni, proteine e metaboliti) implicate nella struttura, nella funzione e nella dinamica di un organismo in uno specifico momento<sup>2</sup>. In particolare, la genomica è la scienza che studia la struttura e la funzione del genoma e provvede alla caratterizzazione ed alla quantificazione dei geni del genoma di un determinato organismo. La proteomica è la scienza che studia l'insieme delle proteine espresse da una cellula, da un tessuto o da un fluido biologico di un organismo in un determinato momento fisiologico e/o patologico. Alterazioni dell'abbondanza, funzione e struttura di determinate proteine possono fornire importanti informazioni sullo stato di salute o di una particolare patologia e dei processi ad essa correlati che avvengono all'interno dell'organismo<sup>3</sup>. Infine, l'indagine metabolomica permette una caratterizzazione dell'insieme di metaboliti presenti in un campione biologico, detto appunto metaboloma. Il metaboloma, inteso come l'effetto prodotto da variazioni nell'espressione genica, nella trascrizione, o da modificazioni post-traduzionali delle proteine, è notoriamente influenzato da vari fattori esogeni all'organismo stesso, come quelli ambientali, la nutrizione, l'assunzione di farmaci, la presenza di patologie, lo stile di vita e l'età. Tutto questo negli anni è stato reso possibile grazie all'evoluzione di tecnologie e allo sviluppo di nuove metodologie come la Next Generation Sequencing (NGS), la Spettrometria di Massa (MS), e la spettroscopia di Risonanza Magnetica Nucleare (NMR). Il sangue e i suoi componenti (siero, plasma e cellule), per anni hanno giocato un ruolo di primaria importanza nel campo della biomarker discovery, ed è ben noto che i biomarcatori del sangue sono lo specchio dello stato fisiologico o patologico di un individuo. In particolare, il siero ematico è un fluido biologico contenente

migliaia di diverse proteine, peptidi e metaboliti, la cui presenza e/o abbondanza generalmente varia in associazione a differenti stati patologici. Questa tipologia di campione, oltre ad essere una ricca fonte di preziose informazioni, possiede l'ulteriore vantaggio di essere un campione facilmente reperibile con procedure poco invasive e di comune impiego nella pratica clinica<sup>4,5</sup>. Per tutti questi motivi le analisi del sangue e dei suoi componenti rappresentano ad oggi una delle procedure diagnostiche più diffuse nel campo della medicina. Pertanto, secondo un recente report, l'analisi proteomica e metabolomica del siero ematico sembra essere molto informativa nello studio del COVID-19, soprattutto per la classificazione della triage (gravità). Questo approccio si è mostrato in grado di evidenziare la presenza di biomarker molecolari associati alle fasi più gravi della patologia COVID-19<sup>6</sup>. Lo stesso lavoro, pubblicato prima del processo peer review per una sua più tempestiva diffusione, ha identificato diversi biomarker proteici (fra cui le apolipoproteine APOA1, APOA2, APOH, APOL1, APOD e APOM, le acute phase proteins APPs) e metabolici (ormoni steroidei, fosfolipidi e derivati come fosfocolina e acidi grassi liberi, amminoacidi fra cui quelli implicati nel ciclo dell'arginina) associati a pathway metabolici perturbati dal decorso della malattia, quali quello di attivazione del complemento, del metabolismo dei macrofagi e di degranulazione delle piastrine. Due biomarker proteici, quali la pro-platelet basic protein (PPBP) e la platelet factor-4 (PF-4), sono stati considerati particolarmente interessanti. Precedenti studi hanno infatti mostrato come le PF-4 mostrino le stesse evidenze metabolomiche del COVID-19 in altre patologie ragionevolmente correlate al COVID-19, quali l'HIV<sup>7</sup> e la SARS<sup>8</sup>. Alcuni marker metabolici identificati dai già citati studi preliminari, inoltre, rendono particolarmente interessanti gli approcci di caratterizzazione del siero ematico anche mediante NMR. Fra questi si citano l'acido arachidonico (AA) e l'acido docosapentaenoico (DPA), che in COVID-19 sono ragionevolmente associati ad una diminuzione della conta piastrinica nei pazienti affetti dalle forme più acute. Queste osservazioni sul metabolismo ben si giustificano se si prendono in considerazione alcune recentissime evidenze di ipercoagulabilità del sangue tromboembolismo venoso in pazienti COVID-19 positivi, a loro volta legate al processo infiammatorio innescato dal virus. Tali processi coagulativi, spesso associati al decorso del COVID-19 nei casi più gravi, portano spesso al decesso del paziente. Alcuni studi clinici preliminari dimostrano come la profilassi tromboembolitica stia raggiungendo risultati sulla cura in alcuni pazienti. In questo senso, risulterà di particolare importanza una classificazione dei campioni in gruppi (ad es. soggetti sani, pazienti asintomatici, debolmente sintomatici, fortemente sintomatici e guariti), poiché ci si attende una risposta metabolica associata allo stato di salute e alla sintomaticità del paziente.

Insieme al siero ematico altri campioni biologici possono dare importanti informazioni sull'evoluzione di una patologia. Nel caso specifico della pandemia COVID-19, diverse evidenze sperimentali dimostrano che SARS-CoV-2 può essere trovato anche nel materiale fecale (in alcuni casi anche quando non è più rilevabile nel tratto respiratorio, suggerendo la via oro-fecale come ulteriore mezzo di trasmissione dell'infezione). A questo riguardo va ricordato che nell'intestino di ogni individuo esiste un ecosistema complesso, il microbiota intestinale costituito da numerosi microrganismi, sia benefici che nocivi, che in condizioni fisiologiche vengono mantenuti in costante equilibrio tra loro. Diversi fattori possono alterare questo equilibrio tra cui lo sviluppo di condizioni patologiche, l'avanzare dell'età<sup>9,10</sup>, l'alimentazione scorretta<sup>11,12</sup>, l'assunzione di farmaci (soprattutto di antibiotici). Il microbiota in condizioni fisiologiche svolge una serie di azioni positive<sup>13-17</sup> tra cui una delle principali è appunto prevenire la colonizzazione da parte di agenti patogeni, che trovano più difficile "instaurarsi" in un ambiente già occupato. Di conseguenza è ragionevole pensare possa

esistere una qualche correlazione tra microbiota intestinale e l'emergenza COVID-19 che stiamo vivendo attualmente. Questo sarà affrontato mediante un'analisi di metagenomica e di metaproteomica. La metagenomica e la metaproteomica costituiscono una scienza emergente, che studia l'insieme dei diversi materiali genetici (detto metagenoma) e dei diversi materiali proteici che li caratterizzano (detto metaproteoma), complessivamente derivanti dalle diverse specie presenti in un determinato ambiente. Il metagenoma e metaproteoma umano sarà rappresentato dal materiale genetico e proteico dell'uomo e da quello derivante dal suo microbiota (detto microbioma). Pertanto, il metagenoma e il metaproteoma sono costituiti da una componente statica, rappresentata dal genoma e dalle proteine dell'uomo, e da una parte dinamica condizionata dalle modifiche a cui vanno incontro le diverse specie microbiche con cui esso è in simbiosi<sup>17</sup>. Studiare l'inquadramento tassonomico e funzionale della componente microbica consentirà di mettere in relazione le informazioni provenienti da questo ecosistema con la sintomatologia al momento del prelievo e con il decorso della patologia. Lo studio di gruppi di persone positive ma con sintomatologia differente potrà aiutare a capire quale ruolo possa giocare il microbiota nello sviluppo dei sintomi stessi.

Anche l'analisi metabolomica dei campioni fecali è una metodica analitica di comprovata utilità, come dimostrato da numerosi ed importanti studi<sup>18-20</sup>. Uno studio metabolomico NMR di diversi biofluidi ed estratti fecali ha consentito di ottenere le impronte metaboliche di un virus influenzale (A/Puerto Rico/8/34) in topi, consentendo una discriminazione dello stato di infezione, nello stadio precoce dell'influenza, in individui magri rispetto a quelli obesi, dimostrando quindi le implicazioni prognostiche e diagnostiche di questa metodologia<sup>21</sup>. Rispetto alla ricerca su COVID-19, si richiama un recente report riferito ad un caso di infezione gastrointestinale da SARS-CoV-2. E' stato evidenziato come questo virus, indipendentemente da altre patologie concomitanti, possa aver causato una colite emorragica acuta con lesione del colon confermata da analisi endoscopiche. Un numero crescente di prove<sup>22,23</sup> suggerisce che il SARS-CoV-2 può infettare l'epitelio del tratto digestivo inferiore, dove i target del virus stesso, i recettori ACE2, sono abbondanti. Questi ed altri nuovi risultati preliminari confermano che il virus SARS-CoV-2 può infettare la mucosa dello stomaco e l'intestino tenue e crasso, dove si moltiplicano e producono virioni infettivi.

Infine, un altro importante ecosistema che può giocare un ruolo importante nell'attività di SARS-CoV-2 è anche il microbiota orale cioè l'insieme di batteri che popolano la bocca e che prevede una struttura ancor più complessa di quella della flora intestinale. La cavità orale è un punto di accesso quotidiano per più di un trilione di microbi (introdotti con l'alimentazione e con la respirazione), che potrebbero causare pericolose patologie<sup>24-26</sup>. Una piccola parte dei microrganismi introdotti, infatti, sopravvive ai succhi gastrici e prospera nell'intestino creando, in alcuni casi, un'alterazione dell'equilibrio qualitativo e quantitativo del microbiota intestinale. Inoltre, come è noto da diversi anni, il microbiota orale è in grado di influenzare anche il microbiota polmonare cioè la componente microbica presente nei polmoni (principale organo bersaglio di SARS-CoV-2) di tutte le persone<sup>27</sup>. Un microbiota orale eubiotico riduce il rischio che un viroma aggressivo possa manifestarsi in forma patologica nell'ospite (come dimostrato per la faringite virale e per le riniti<sup>28</sup>). Studiare l'inquadramento tassonomico e funzionale della componente microbica orale (correlato a quello polmonare) al momento del contagio con SARS-CoV-2 potrebbe permettere di identificare ulteriori microrganismi con un qualche coinvolgimento (positivo o negativo) nell'infezione, fornendo altre opzioni per contrastare la diffusione del virus stesso.

Le suddette evidenze sperimentali, seppur preliminari, confermano l'importanza che uno studio combinato di tecnologie "OMICS" (genomico-metabolomico-proteomico) su campioni di siero ematici, di estratti fecali, e di tamponi rino-faringei potrebbe avere relativamente alla



Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

comprensione delle implicazioni metaboliche e fisiologiche del coronavirus SARS-CoV-2 a livello sistemico.

### **Attività di ricerca proposte:**

Le attività del progetto di ricerca saranno costituite da una fase pre-analitica, che comprende le fasi di raccolta, processamento preliminare, trasporto e conservazione del campione, e da una fase analitica, che comprende la preparazione del campione e quindi l'acquisizione del dato con le differenti tecnologie OMICS proposte. La fase pre-analitica sarà una fase comune per il progetto riguardante la collezione del maggior numero possibile di campioni da pazienti affetti da COVID-19. In base alla disponibilità, tali campioni saranno suddivisi in gruppi; si classificheranno quindi in: soggetti sani (healthy, H), pazienti asintomatici (asymptomatic, A), debolmente sintomatici (slightly symptomatic, SS), fortemente sintomatici (highly symptomatic, HS), guariti (recovered, R), per i quali sia stato in ogni caso esaminato il tampone oro-faringeo e risultato negativo (H, R) o positivo (A, SS, HS).

Riassumendo, i campioni idealmente da acquisire sono:

- H: soggetti sani
- A: soggetti asintomatici
- SS: soggetti debolmente sintomatici
- HS: soggetti fortemente sintomatici
- R: soggetti guariti

Le attività analitiche saranno strettamente associate a questa fase pre-analitica, pertanto verranno svolte in funzione della raccolta dei campioni in collaborazione con AOUSS.

Il progetto si articolerà in 2 principali attività analitiche che includeranno 2 obiettivi specifici, descritti come segue:

### **OS1. Analisi proteomica, metaproteomica e metagenomica di campioni da pazienti con COVID-19.**

#### **Attività:**

*Sviluppo del protocollo di trattamento dei campioni.* Questa fase prevede l'individuazione del trattamento più adatto per inattivare il virus nel campione (in modo da rendere più sicura la sua gestione) e la messa a punto del protocollo di trattamento del campione per ottenere l'analisi migliore possibile (nel caso del siero, per esempio, potrebbe essere necessario eliminare, o ridurre, le componenti proteiche più abbondanti, che potrebbero limitare la detection di quelle meno abbondanti)<sup>5,23</sup>. Attraverso prove di elettroforesi monodimensionale su gel sarà possibile effettuare una caratterizzazione qualitativa iniziale ed un confronto tra le varie tipologie di campioni, evidenziandone profili elettroforetici comuni, simili o differenti.

*Analisi proteomica, metaproteomica e metagenomica.* Le proteine estratte andranno analizzate in spettrometria di massa ad alta risoluzione utilizzando gli spettrometri di massa LTQ Orbitrap Velos o Q-Exactive, entrambi interfacciati con un sistema nano-UHPLC (Thermo Fisher). Il DNA estratto andrà invece analizzato al MiSeq (Illumina) per ottenere il sequenziamento del gene 16S rRNA e del DNA totale.

*Analisi dati.* Questa fase comprende: l'identificazione proteica e l'allineamento delle sequenze nucleiche su banche dati umana e microbica; l'analisi differenziale tra gruppi di pazienti con sintomatologia differente; la ricerca di uno o più biomarcatori (microbici o dell'ospite) per l'infezione da SARS-CoV-2. Qualora fosse possibile reperire un adeguato numero di campioni, lo studio sarà rivolto, oltre che alla ricerca di proteine dell'ospite e del virus, anche a quella di

Porto Conte Ricerche. Programma 2020 per la realizzazione di attività di ricerca, servizi alle imprese e trasferimento tecnologico.

Contributo della Regione Sardegna ai sensi della LR 20/2015, art. 9, comma 1, lettera c.

tassonomie o funzioni microbiche del microbiota intestinale e orale correlate ai diversi gruppi indagati (A, SS, HS).

*Validazione dei biomarcatori.* Seguirà poi la fase fondamentale di validazione dei marcatori trovati, mediante tecniche western immunoblotting (WB) e/o ELISA, valutandone quindi le caratteristiche in termini di sensibilità e specificità per un impiego nei protocolli diagnostici.

## **OS2. Analisi metabolomica di biofluidi da pazienti COVID-19.**

### **Attività:**

Il tipico flusso di lavoro nell'indagine metabolomica è costituito dalla fase pre-analitica, comprese le fasi di raccolta, processamento preliminare, trasporto e conservazione del campione e la fase analitica, compresa la preparazione del campione e quindi l'acquisizione del dato spettroscopico. Il primo obiettivo operativo è rappresentato dall'ottimizzazione dei protocolli di preparativa. L'ottimizzazione dei protocolli analitici per lo studio del COVID-19-positivi rappresenta un passaggio analitico fondamentale poiché determina la corrispondenza fra il campione reale e il campione analitico, quindi influenza e determina la rappresentatività del campione analitico stesso. Il secondo obiettivo operativo è la definizione di protocolli di acquisizione NMR che permettano l'utilizzo degli spettri derivanti da questo passaggio analitico sfruttabili per l'analisi statistica multivariata. Il terzo step operativo è appunto l'analisi multivariata dei dati spettroscopici, l'interpretazione dei risultati e la generazione dei report tecnico-scientifici.

*Raccolta e classificazione del campione.* I campioni verranno consegnati dal Laboratorio di Virologia e Biologia Molecolare dell'AOUSS. Si definirà con lo stesso laboratorio la modalità di trasferimento, la tipologia di contenitori e la quantità di campione necessaria. I campioni verranno classificati sulla base della sintomatologia del paziente e di eventuali altre informazioni condivise da AOUSS.

*Ottimizzazione dei protocolli di preparativa.* Per l'ottimizzazione dei passaggi di chimica preparativa si partirà dai protocolli pubblicati su ciascun tipo di materiale biologico. I protocolli esistenti, tuttavia, dovranno essere adeguati alla strumentazione esistente nei laboratori di Porto Conte Ricerche, sia per la preparazione dei campioni analitici che per l'acquisizione dei dati spettroscopici.

*Acquisizione degli esperimenti NMR.* Si procederà, su ciascuna matrice, a definire i migliori parametri di acquisizione (sequenze, impulsi, temperature, soppressione segnali, delay per misure quantitative, solventi). Successivamente si acquisiranno, in modo da massimizzare la risposta strumentale (SNR, tempi di acquisizione, misure quantitative o qualitative, adozione di filtri di rilassamento o diffusione, etc.) in maniera sequenziale i campioni. In questa fase la chimica preparativa verrà portata avanti simultaneamente all'acquisizione degli spettri. A supporto delle analisi NMR, su un subset di campioni e su biomarcatori selezionati, verranno eseguite analisi cromatografiche dedicate.

*Analisi statistica multivariata.* I dati sperimentali grezzi saranno trasferiti su piattaforme di analisi mono- e multivariata e si otterranno dati processati pronti per l'interpretazione. Presso il Laboratorio di NMR e Chimica Analitica di Porto Conte Ricerche è stato generato, negli anni, un protocollo di analisi dei dati NMR che prevede il post-processing degli spettri (allineamento, binning/bucketing, integrazione, processamento dei dati mediante software, piattaforme online o script dedicati su Matlab e R per lo studio della variabilità statistica, l'individuazione dei pathway metabolici alterati, gli studi di correlazione fra parametri analitici, etc.).

*Interpretazione dei risultati.* I dati verranno interpretati mediante due principali approcci. Il primo prevede il confronto con la letteratura esistente su COVID-19 e altre patologie analoghe. Il secondo riguarda il confronto con i dati ottenuti, sugli stessi sistemi, mediante approcci cromatografici nonché di proteomica presso il Laboratorio Di Proteomica e Immunodiagnostica e il Laboratorio di Genetica Molecolare di Porto Conte Ricerche.

Per il monitoraggio e il controllo dell'esecuzione del progetto vengono definiti i seguenti indicatori:

**Indicatore 1** – Implementazione di almeno 1 protocollo per la preparazione all'analisi proteomica, metagenomica, metaproteomica e metabolomica di campioni provenienti da persone positive a SARS-CoV-2;

**Indicatore 2** – Individuazione di almeno 1 panel di proteine differenziali in pazienti positivi a SARS-CoV-2;

**Indicatore 3** – Inquadramento tassonomico del microbiota orale e/o intestinale di pazienti positivi a SARS-CoV-2;

**Indicatore 4** – Acquisizione di dati metabolomici NMR e interpretazione dei risultati su almeno 1 tipologia di campione clinico.

## Bibliografia

1. WHO. Blueprint for R&D preparedness and response to public health emergencies due to highly infectious pathogens. <https://www.who.int/medicines/ebola-treatment/WHO-list-of-top-emerging-diseases/en/>
2. Anjum Gahlaut, et al. Proteomics & metabolomics: Mapping biochemical regulations. *Drug Invention Today*, 5(4): 321-326 (2013).
3. Geyer, P. E., Holdt, L. M., Teupser, D. & Mann, M. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics. *Mol. Syst. Biol.* 13, 942 (2017).
4. Biosa, G. et al. Comparison of blood serum peptide enrichment methods by Tricine SDS-PAGE and mass spectrometry. *J. Proteomics* 75, 93-99 (2011).
5. Filip, S. et al. Comparison of depletion strategies for the enrichment of low-Abundance proteins in urine. *PLoS One* 10, 1-20 (2015).
6. Bo Shen et al. 2020, Proteomic and Metabolomic Characterization of COVID-19 Patient Sera, medRxiv 2020.04.07.20054585; doi: 10.1101/2020.04.07.20054585.
7. Auerbach, D.J., Lin, Y., Miao, H., Cimbro, R., DiFiore, M.J., Gianolini, M.E., Furci, L., Biswas, P., Fauci, A.S., Lusso P. Identification of the platelet-derived chemokine CXCL4/PF-4 as a broad-spectrum HIV-1 inhibitor, , *Proceedings of the National Academy of Science USA* 2012, 109, 9569-9574.
8. Poon, T.C., Pang, R.T., Chan, K.C., Lee, N.L., Chiu, R.W., Tong, Y.K., Chim, S.S., Ngai, S.M., Sung, J.J., Lo, Y.M. Proteomic analysis reveals platelet factor 4 and beta-thromboglobulin as prognostic markers in severe acute respiratory syndrome. *Electrophoresis*. 2012, 33, 1894-1900.
9. Kim, S. & Jazwinski, S. M. The Gut Microbiota and Healthy Aging: A Mini-Review. *Gerontology* 64, 513-520 (2018).

10. Ticinesi, A. et al. Gut microbiota, cognitive frailty and dementia in older individuals: A systematic review. *Clin. Interv. Aging* 13, 1497–1511 (2018).
11. Zhu, Y., Michelle Luo, T., Jobin, C. & Young, H. A. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett.* 309, 119–127 (2011).
12. Cotillard, A. et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* 500, 585–588 (2013).
13. Clemente, J. C., Manasson, J. & Scher, J. U. The role of the gut microbiome in systemic inflammatory disease. *Bmj* j5145 (2018) doi:10.1136/bmj.j5145.
14. Boleij, A. & Tjalsma, H. Gut bacteria in health and disease: A survey on the interface between intestinal microbiology and colorectal cancer. *Biol. Rev.* 87, 701–730 (2012).
15. Thaiss, C. A., Zmora, N., Levy, M. & Elinav, E. The microbiome and innate immunity. *Nature* 535, 65–74 (2016).
16. Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N. & Núñez, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol.* 14, 685–690 (2013).
17. Tremaroli, V. & Bäckhed, F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 489, 242–249 (2012).
18. Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S. *Science* **336**, 1262–1267
19. Gratton, J., Phetcharaburanin, J., Mullish, B.H., Williams, H.R.T., Thursz, M., Nicholson, J.K., Holmes, E., Marchesi, J.R., Li, J. *Analytical Chemistry* 2016, **88**, 4661–4668
20. Kim H.K., Kostidis S., Choi Y.H. (2018) NMR Analysis of Fecal Samples. In: Giera M. (eds) *Clinical Metabolomics. Methods in Molecular Biology*, vol 1730. Humana Press, New York, NY
21. Milner, J.J., Wang, J., Sheridan, P.A., Ebbels, T., Beck, M.A., Saric, J. <sup>1</sup>H NMR-Based Profiling Reveals Differential Immune-Metabolic Networks during Influenza Virus Infection in Obese Mice. *PLoS ONE* 2014, 9(5), e97238.
22. Xiao, F., Tang, M., Zheng, X., Liu, Y., Li, X., Shan H., *Gastroenterology*, 2020, in press, doi 10.1053/j.gastro.2020.02.055
23. Uno, Y., Why does SARS-CoV-2 invade the gastrointestinal epithelium, *Gastroenterology* (2020), doi: 10.1053/j.gastro.2020.04.006
24. Yamashita, Y. & Takeshita, T. The oral microbiome and human health. *J. Oral Sci.* 59, 201–206 (2017).
25. Baker, J. L., Bor, B., Agnello, M., Shi, W. & He, X. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends Microbiol.* 25, 362–374 (2017).
26. Takahashi, N. Oral microbiome metabolism: From ‘who are they?’ to ‘what are they doing?’ *J. Dent. Res.* 94, 1628–1637 (2015).
27. Dickson, R. P. & Huffnagle, G. B. The Lung Microbiome: New Principles for Respiratory Bacteriology in Health and Disease. *PLoS Pathog.* 11, 1–5 (2015).
28. Di Pierro, F. et al. Use of a probiotic mixture containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 and *Enterococcus faecium* L3 in atopic children. *Minerva Pediatr.* 70, 418–424 (2018).