

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE



DIPARTIMENTO AGRICOLTURA, AMBIENTE E  
ALIMENTI

---

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E  
TECNOLOGIE ALIMENTARI

Tesi di laurea in  
BIOTECNOLOGIE MICROBICHE PER L'INDUSTRIA  
AGROALIMENTARE

## **SVILUPPO DI COLTURE PROTETTIVE PER L'INDUSTRIA ALIMENTARE**

Relatori

Chiar.ma Prof.ssa

**Elena SORRENTINO**

Chiar.mo Prof.

**Patrizio TREMONTE**

Correlatore

Dott.ssa

**Silvia Jane LOMBARDI**

Candidato:

**Jeison Joan CABANILLAS VASQUEZ**

Matr. 160343

---

ANNO ACCADEMICO 2018-2019



*Alla mia famiglia, ai professori, agli amici e a tutte le persone che hanno contribuito, moralmente e personalmente, al conseguimento di questo importante traguardo nella formazione universitaria.*

## Sommario

INTRODUZIONE .....	6
CAPITOLO I.....	8
BIOCONSERVAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE .....	8
1.1. Bioconservazione .....	8
1.2. Colture protettive negli alimenti .....	9
1.3. Antimicrobici naturali per la bioconservazione degli alimenti .....	10
1.3.1. Antimicrobici di origine vegetale .....	11
1.3.2. Antimicrobici di origine animale .....	11
1.3.3. Antimicrobici di origine batterico.....	12
1.3.3.1. Metaboliti dei LAB con attività antimicrobica .....	12
Batteriocine .....	12
Acidi organici.....	13
Perossido di idrogeno .....	14
Diacetile, acetaldeide e acetoino .....	14
Reuterina.....	14
Acido 3-fenil lattico (PLA).....	14
CAPITOLO II .....	15
<i>Lactobacillus plantarum</i> .....	15
2.1. Batteri lattici .....	15
2.2. <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	16
2.3. Attività antimicrobica di <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	17
2.3.1. Attività antibatterica di <i>Lb. plantarum</i> .....	18
2.3.2. Attività antifungina di <i>Lb. plantarum</i> .....	19
2.3.3. <i>Lactobacillus plantarum</i> nei sistemi alimentari tradizionali .....	20
<i>Lactobacillus plantarum</i> nelle paste acide.....	20
<i>Lactobacillus plantarum</i> nei prodotti vegetali .....	21
<i>Lactobacillus plantarum</i> nei prodotti carnei fermentati.....	22
<i>Lactobacillus plantarum</i> e la fermentazione malolattica .....	23
<i>Lactobacillus plantarum</i> nei prodotti lattiero-caseari.....	24
CAPITOLO III.....	26
PROBLEMATICHE.....	26
3.1. Alimenti Free From.....	26

<b>3.2. Problematiche microbiologiche inerenti alla qualità e sicurezza nei prodotti lattiero-caseari</b> .....	27
<b>3.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i></b> .....	27
<i>L. monocytogenes</i> nei prodotti lattiero caseari.....	28
<b>3.2.2. <i>Clostridium</i> spp.</b> .....	29
<b>3.2.3. <i>Pseudomonas</i> spp.</b> .....	31
<b>3.2.4. <i>Brochothrix thermosphacta</i></b> .....	32
<b>3.2.5. <i>Penicillium</i> spp.</b> .....	32
<b>CAPITOLO IV</b> .....	34
<b>SCOPO</b> .....	34
<b>CAPITOLO V</b> .....	35
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	35
<b>5.1. Individuazione di ceppi di <i>Lactobacillus plantarum</i> ad attività protettiva</b> .....	35
<b>5.1.1. Ceppi produttori e ceppi indicatori oggetto dello studio</b> .....	35
<b>5.1.2. Determinazione dell'attività antimicrobica espressa dalle cellule dei ceppi produttori</b> .....	36
<b>5.1.3. Determinazione dell'attività antimicrobica espressa dal surnatante privo di cellule</b> .....	37
<b>5.2 Screening dell'acido fenil-lattico (PLA) prodotto dai ceppi di <i>Lb. plantarum</i></b> .....	38
<b>5.2.1. Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della minima concentrazione battericida (MBC) di PLA</b> .....	39
<b>5.3. Curva di crescita e curva di acidificazione del ceppo Lpla_100</b> .....	39
<b>5.4. Effetto della combinazione dello stadio di crescita e del pH sull'attività antimicrobica espressa dal ceppo Lpla_100</b> .....	40
<b>5.4.1. Determinazione dell'attività antimicrobica espressa dal surnatante privo di cellule</b> .....	41
<b>CAPITOLO VI</b> .....	43
<b>RISULTATI</b> .....	43
<b>6.1. Screening</b> .....	43
<b>6.2. Inibizione espressa dai metaboliti extracellulari</b> .....	44
<b>6.3. Effetto della fase di crescita e del pH di coltivazione sull'accumulo di sostanze antimicrobiche</b> .....	49
<b>6.4. Effetto della fase di crescita e del pH di coltivazione sull'espressione dell'attività antagonista</b> .....	51
<b>CONCLUSIONI</b> .....	53
<b>RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</b> .....	54

## INTRODUZIONE

Uno dei sistemi attuali per la conservazione degli alimenti è la bioconservazione, cioè l'impiego di microrganismi o dei loro metaboliti con attività antimicrobica nei confronti di microrganismi alteranti e patogeni che possono contaminare le matrici alimentare. Negli ultimi anni l'utilizzo di microrganismi come colture protettive si presenta come una alternativa biologica all'utilizzo di additivi chimici tradizionalmente impiegati nella conservazione degli alimenti. Tra i microrganismi utilizzati nella bioconservazione i batteri lattici (LAB) sono quelli diffusamente impiegati e più promettenti per la loro attività protecnologica e antimicrobica nei confronti di microrganismi non desiderati. I LAB sono riconosciuti come microrganismi sicuri (GRAS e QPS) ad essere impiegati nella produzione degli alimenti, quindi candidati potenziali ad essere utilizzati nella bioconservazione. Una delle specie LAB che ad oggi viene ampiamente studiata per la sua attività antimicrobica e la sua versatilità di crescere in diverse condizioni, è *Lactobacillus plantarum*.

In base alle precedenti considerazioni, in questo lavoro di tesi si è inteso studiare le caratteristiche bioprotettive di ceppi di *Lactobacillus plantarum* isolati da diverse matrici alimentari da impiegare come colture protettive nella bioconservazione. Per studiare le caratteristiche bioprotettive dei ceppi oggetto di studio si è valutata l'attività antimicrobica in differenti condizioni nei confronti di microrganismi indesiderati, quali *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, così come nei confronti di microrganismi alteranti come *Clostridium butyricum* e *Pseudomonas* spp.

I risultati ottenuti hanno evidenziato che, tra gli isolati riferibili a *Lb. plantarum*, differenti ceppi sono in grado di esplicare attività antagoniste di particolare interesse. Nello specifico, i ceppi isolati da ambienti caratterizzati da caratteristiche ecologiche maggiormente ostili (pH, aw, etc) mostrano una più spiccata attività antagonista. Azione che, sulla base dei risultati acquisiti, può essere attribuita alla capacità da parte dei ceppi di produrre sostanze antimicrobiche riconducibili all'acido fenil-lattico e all'acido fenil-acetico. Inoltre, è stato evidenziato che l'azione antimicrobica espressa dal ceppo varia in funzione del pH e della fase di crescita del ceppo. Nello specifico l'azione assume caratteri di particolare interesse nella fase avanzata di crescita (al termine della fase esponenziale) ed in corrispondenza di livelli di pH inferiori a 5.

Dunque, le conoscenze acquisite attraverso il presente lavoro offrono informazioni in merito a quelli che potrebbero essere gli ambienti alimentari che, in virtù delle loro caratteristiche, possono essere compatibili con l'utilizzo dei ceppi oggetto dello studio.

## CAPITOLO I

### BIOCONSERVAZIONE NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

---

#### 1.1. Bioconservazione

Molti prodotti alimentari sono deperibili per natura e richiedono protezione dal deterioramento durante la loro preparazione, conservazione e distribuzione per dare loro la durata di conservazione desiderata. I prodotti alimentari possono essere contaminati da batteri e funghi, alcuni dei quali possono causare reazioni indesiderate che deteriorano le proprietà sensoriali e strutturali degli alimenti. Inoltre, alcuni microrganismi possono causare malattie di origine alimentare. I principali patogeni presenti negli alimenti, sono *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. I microrganismi alteranti e patogeni possono provocare perdite economiche e problemi sanitari. Le malattie di origine alimentare sono tra le preoccupazioni più gravi e costose per la salute pubblica in tutto il mondo, essendo una delle principali cause di morbilità. Secondo la World Health Organization (2015), gli alimenti insalubri sono legati alla morte di circa 2 milioni di persone all'anno, principalmente bambini. Gli alimenti possono essere contaminati da batteri, virus, parassiti o sostanze chimiche dannose che provocano più di 200 malattie, che vanno dalla diarrea al cancro.

I metodi di conservazione classici, come trattamenti chimici (nitrati, nitriti, solfiti, ecc.), e fisici (pastorizzazione, UHT, congelamento, essiccamento), sono comunemente applicati sia per tutelare la qualità dei cibi sia per aumentarne la shelf-life. Anche se questi metodi sono efficaci nel garantire la sicurezza dei prodotti alimentari, spesso ne compromettono le caratteristiche sensoriali e le proprietà nutritive.

Negli ultimi decenni, il concetto di qualità alimentare si è evoluto, e le tendenze dei consumatori negli acquisti e nei consumi, si orientano verso alimenti sicuri e con elevate proprietà nutrizionali ma minimamente processati e senza additivi, cioè alimenti con caratteristiche “naturali” (Ananou, 2007). L'uso di metodi di conservazione classici, in particolare conservanti chimici, non è compatibile con le caratteristiche di “naturalità” del prodotto alimentare.

La domanda sempre crescente da parte del consumatore di prodotti sicuri, a elevato valore nutrizionale e salutistico, senza additivi ed economicamente convenienti ha determinato negli anni lo sviluppo di nuove tecnologie, processi o approcci alla conservazione degli

alimenti. Tra le tecnologie alternative di conservazione degli alimenti, è stata prestata particolare attenzione alla bioconservazione. Questa tecnica permette di estendere la shelf life e migliorare la qualità igienica dei prodotti alimentari, riducendo al minimo l'impatto sulle loro proprietà nutritive e organolettiche (García et al., 2010).

La bioconservazione può essere definita come l'estensione della shelf life e della sicurezza alimentare mediante l'uso di composti naturali o microflora controllate e/o dei loro prodotti antimicrobici (Stiles, 1996).

La fermentazione è un tipico esempio di questo tipo di conservazione, in cui i microrganismi, naturalmente presenti o addizionati come colture starter, svolgono numerose attività benefiche tra le quali anche un'attività inibente nei confronti dei microrganismi indesiderati sia alteranti sia patogeni (Singh, 2018).

I microrganismi usati nella produzione di alimenti possono essere classificati come colture di starter e colture protettive. Le colture di starter sono microrganismi che vengono utilizzati per avviare e condurre la fermentazione, sono, quindi, i responsabili delle caratteristiche sensoriali dei prodotti fermentati; mentre le colture protettive vengono utilizzate principalmente per la loro attività inibente nei confronti dei microrganismi indesiderati, patogeni e alteranti (Singh, 2018).

I principali organismi utilizzati nella bioconservazione sono i batteri lattici (LAB) e/o i loro metaboliti che sono in grado di esercitare proprietà antimicrobiche e conferiscono sapore e consistenza unici ai prodotti alimentari (Lucera et al., 2012).

## **1.2. Colture protettive negli alimenti**

Da oltre un secolo è noto il ruolo essenziale dei microrganismi nella protezione biologica e nell'incremento della conservabilità degli alimenti, soprattutto, ma non solo, di prodotti fermentati quali latticini, vegetali fermentati, salumi e impasti acidi. La protezione avviene attraverso i molteplici metabolismi che accompagnano la crescita microbica e che, oltre a contribuire alla definizione delle caratteristiche nutrizionali e sensoriali del prodotto finito, svolgono un'importante azione inibente nei confronti dei microrganismi indesiderati.

I batteri lattici (LAB) rappresentano il gruppo di microrganismi più usato come colture protettive, in quanto sono presenti in numerosissimi alimenti fermentati e hanno una lunga storia per quanto riguarda la sicurezza d'uso (Franz et al., 2010). Inoltre, in molti alimenti non fermentati è stata evidenziata l'attività protettiva dei LAB (Sorrentino et al., 2013).

La sicurezza igienica è un aspetto molto importante per gli alimenti, per le colture protettive va dimostrata l'assenza di patogenicità (Maragkoudakis et al., 2009). Nel caso di impiego di colture protettive costituite da LAB la loro sicurezza d'uso è garantita dallo status QPS. Inoltre, le colture protettive non devono determinare deterioramento negli alimenti nei quali vengono impiegate, poiché i LAB possono contribuire al deterioramento di diversi tipi di alimenti, è essenziale studiarne preventivamente l'effetto sulle caratteristiche sensoriali e nutrizionali dell'alimento nel quale si vogliono impiegare (Castellano et al., 2010).

Sulla base delle evidenze dei loro effetti positivi sugli alimenti e della loro capacità di produrre una notevole varietà di composti antimicrobici, i LAB sono considerati buoni candidati per la bioconservazione di differenti prodotti alimentari, siano fermentati siano freschi, quali tra i fermentati: i formaggi (Cosentino et al., 2018), lo yogurt (Li et al., 2013), i prodotti fermentati a base di carne per il controllo di *L. monocytogenes* con uso ridotto di nitriti (Nikodinoska et al., 2019), e tra i prodotti non fermentati: carne, frutta, verdure e prodotti della pesca (Gaggia et al., 2011).

L'abbassamento del pH e l'attività antibatterica degli acidi organici prodotti dai LAB sono tra i principali meccanismi di bioconservazione degli alimenti fermentati. Particolari ceppi di LAB possono produrre altre sostanze inibitorie (come diacetile, reuterina, reuterociclina), sostanze antifungine (come il propionato, acido fenil-lattico, idrossifenil-lattato, dipeptidi ciclici, e acidi grassi 3-idrossi), batteriocine e sostanze con attività inibitoria simile alle batteriocine (BLIS) che possono essere usati contro i microrganismi patogeni e alterativi che si moltiplicano negli alimenti (Sorrentino et al., 2018).

### **1.3. Antimicrobici naturali per la bioconservazione degli alimenti**

L'uso improprio e la cattiva gestione degli antibiotici ha provocato il drammatico aumento di un gruppo di microrganismi tra cui agenti patogeni di origine alimentare non solo resistenti agli antibiotici ma anche più tolleranti a numerosi metodi di lavorazione e conservazione degli alimenti; e l'aumento della consapevolezza dei consumatori sul potenziale impatto negativo dei conservanti chimici sulla salute rispetto ai benefici degli additivi naturali, hanno spinto i ricercatori e l'industria alimentare a ricercare e studiare conservanti naturali in grado di migliorare la sicurezza e la qualità degli alimenti (Gyawali & Ibrahim, 2014).

I composti derivati da fonti naturali quali vegetale, animale e microbico, hanno il potenziale per essere utilizzati per la sicurezza alimentare a causa delle loro proprietà

antimicrobiche contro una vasta gamma di agenti patogeni. Ad oggi quelli più studiati sono stati gli estratti naturali ad attività antimicrobica derivanti dal mondo vegetale (Burt, 2004; Patrignani et al., 2008; Tremonte et al., 2016).

### **1.3.1. Antimicrobici di origine vegetale**

Per quanto riguarda i composti vegetali, che in genere derivano da spezie ed erbe, sono stati impiegati fin dai tempi antichi per aromatizzare il cibo, come medicina tradizionale e come conservanti, oltre a queste funzioni hanno proprietà nutrizionali, farmaceutiche antiossidanti e antimicrobici. Gli estratti naturali derivanti da differenti matrici vegetali principalmente costituiti da oli essenziali, estratti idroalcolici e altri derivati, contengono, infatti, un'ampia serie di metaboliti secondari in grado di rallentare o inibire completamente la crescita di batteri, lieviti e muffe (Burt et al., 2003; Chorianopoulos et al., 2008; Tremonte et al., 2016). I principali costituenti degli oli essenziali e degli estratti naturali di origine vegetale a dimostrata attività antimicrobica sono rappresentati da composti fenolici, alcol alifatici, aldeidi, chetoni, acidi, chinoni, saponine, flavonoidi, tannini, cumarine, terpenoidi e alcaloidi (Gyawali & Ibrahim, 2014).

Anche i sottoprodotti della lavorazione di prodotti di origine vegetale, come le bucce, e i semi, rappresentano un'ottima fonte a basso costo di composti ad attività antimicrobica, in particolare composti fenolici (polifenoli, tannini e flavonoidi).

### **1.3.2. Antimicrobici di origine animale**

I composti di origine animale che sono stati ritenuti esplicare un'azione antimicrobica sono diversi, tra questi troviamo lattoferrina, chitosano, lipidi, defensine, lattoperossidasi, ovotransferrina, lisozima, protamina e peptidi bioattivi derivanti dalla caseina e dal siero di latte.

Ad esempio la lattoferrina, glicoproteina presente nel latte, possiede attività antimicrobica contro batteri e virus, come *Carnobacterium*, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *Klebsiella* (Al-Nabulsi & Holley, 2005; Murdock et al., 2007), e viene impiegata in alcuni paesi per la conservazione di carne bovina.

Il chitosano, un biopolimero ottenuto dalla deacetilazione della chitina, è il polisaccaride più diffuso in natura dopo la cellulosa. È il principale costituente degli esoscheletri di crostacei e artropodi, ed è stato dimostrato essere uno dei migliori rivestimenti conservativi e biologicamente sicuri per diversi tipi di alimenti a causa delle sue proprietà filmogene, azioni antimicrobiche, mancanza di tossicità, biodegradabilità e proprietà biochimiche. I rivestimenti commestibili al chitosano prolungano la durata di conservazione dei frutti e delle verdure riducendo al minimo il tasso di respirazione e

riducendo la perdita di acqua tramite la creazione di un film semi-permeabile sulla superficie dei vegetali (Shiekh et al., 2013).

Il lisozima è un enzima presente naturalmente nelle uova di uccelli e nel latte di mammifero ed è generalmente riconosciuto come sicuro (GRAS) per l'aggiunta diretta agli alimenti (FDA, 1998); principalmente attivo su batteri Gram-positivi, il lisozima ottenuto dalle uova viene principalmente usato come conservante per carne, prodotti a base di carne, pesce, prodotti della pesca, latte e prodotti lattiero-caseari, frutta e verdura. Ad esempio, il lisozima è impiegato per inibire *Clostridium tyrobutyricum* per il controllo del gonfiore tardivo nella produzione di alcuni formaggi tipo Grana Padano.

Per quanto riguarda i composti bioattivi derivati dal latte come caseina e proteine del siero di latte si è evidenziato che hanno proprietà antimicrobiche contro una vasta gamma di microrganismi patogeni come *E. coli*, *Helicobacter*, *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, lieviti e funghi filamentosi (Fadaei, 2012).

### **1.3.3. Antimicrobici di origine batterico**

#### **1.3.3.1. Metaboliti dei LAB con attività antimicrobica**

##### **Batteriocine**

Le batteriocine sono molecole di natura proteica, solitamente sono costituite da polipeptidi singoli o organizzati in complessi, sintetizzate ribosomicamente e con attività antimicrobica. Attualmente, il termine batteriocina viene utilizzato principalmente per descrivere i piccoli peptidi cationici termostabili sintetizzati dai batteri Gram positivi, tra i quali i LAB, che mostrano un ampio spettro di inibizione (Cotter, Hill e Ross, 2005). Poiché i LAB sono stati tradizionalmente associati agli alimenti e sono considerati sicuri, la bioconservazione degli alimenti si è concentrata principalmente sulle batteriocine dei LAB.

Le batteriocine comprendono un gruppo molto eterogeneo per quanto riguarda la loro struttura primaria, composizione e proprietà fisico-chimiche, comunque vengono classificati in quattro classi principali: Classe I o lantibiotici includono peptidi post-traduzionali modificati caratterizzati dagli anelli intramolecolari distintivi a base di tioetere di lantionina e  $\beta$ -metil-lantionina; la classe II comprende peptidi non modificati termicamente stabili ed è di gran lunga la classe più grande tra le batteriocine Gram positive (in genere, sono peptidi cationici corti con alti punti isoelettrici); la classe III comprende grandi proteine termolabili con prospettive modeste come biopreservanti

alimentari ed infine, i peptidi circolari caratterizzati da un legame peptidico tra il terminale C e N sono raggruppati in classe IV (García et al., 2010).

In virtù della loro natura cationica e idrofobica, la maggior parte di questi peptidi agisce come permeabilizzante della membrana, dove la formazione dei pori porta alla dissipazione totale o parziale del potenziale di membrana, causando infine la morte cellulare.

La nisina prodotta da *Lactococcus lactis* è la batteriocina che ha applicazioni più ampie nell'industria alimentare, il suo uso è consentito in vari tipi di formaggio fuso, latticini e cibi in scatola, in quanto si è visto che la nisina è efficace contro i microrganismi alteranti Gram-positivi e alcuni patogeni Gram positivi come *L. monocytogenes* (Pal Singh, 2018). Le batteriocine possono essere applicate fondamentalmente con tre modalità differenti: i) produzione *in situ* mediante colture starter o protettive, ii) come ingrediente (fermentato di un ceppo batteriocinogenico) o iii) come additivo in un preparato semi o purificato (García et al., 2010). Quando vengono usate negli alimenti, le batteriocine possono trovare condizioni negative che alterano la loro efficacia.

### **Acidi organici**

L'acido lattico è il principale metabolita del LAB, provoca un abbassamento del pH a valori tali da inibire lo sviluppo di molti microrganismi. La forma non dissociata, si diffonde attraverso la membrana cellulare e si dissocia all'interno della cellula, rilasciando ioni  $H^+$  che acidificano il citoplasma. Inoltre, l'effetto combinato del basso pH e dell'acido indissociato causa batteriostasi e infine la morte dei batteri sensibili (Schnürer & Magnusson, 2005).

I LAB eterofermentanti producono anche acido acetico in presenza di accettori di elettroni esterni in quantità relativamente elevate, mentre l'acido propionico viene prodotto solo in tracce. Entrambi questi acidi hanno valori di pKa più elevati dell'acido lattico e quindi hanno una proporzione più elevata di acido non dissociato a un determinato pH. Simile all'acido lattico, gli acidi acetico e propionico interagiscono con le membrane cellulari, ma l'effetto dell'acido acetico e propionico dipende spesso dalla diminuzione del pH causata dall'acido lattico. L'acido propionico riduce la crescita fungina, specialmente a pH più basso e influenza le membrane fungine a valori di pH inferiori a 4,5.

### **Perossido di idrogeno**

L'attività antimicrobica del perossido di idrogeno è attribuita al suo forte effetto ossidante sulla cellula batterica che porta alla denaturazione delle proteine cellulari (Lindgren e Dobrogosz, 1990). Nel latte crudo, il perossido di idrogeno prodotto dai LAB può, dopo essere stato catalizzato dalla lattoperossidasi, ossidare il tiocianato endogeno. I prodotti intermedi ossidati sono tossici per diversi batteri (Daechel, 1989).

### **Diacetile, acetaldeide e acetoino**

Alcuni LAB producono acetaldeide diacetile e acetoino tutte molecole con attività antimicrobica (Collins et al., 2009; Jyoti et al., 2003). Il diacetile (2,3-butanedione) è conosciuto per l'aroma burroso che impartisce ai latticini fermentati, ma questa proprietà e l'alta concentrazione necessarie per esercitare la sua attività antimicrobica negli alimenti ne limita l'uso come conservante alimentare. Allo stesso modo, l'acetaldeide solitamente è presente nei prodotti lattiero-caseari fermentati in concentrazioni inferiori a quelle necessarie per l'inibizione di microrganismi indesiderati (Vanderbergh, 1993).

### **Reuterina**

La reuterina è una sostanza antimicrobica ad ampio spettro originariamente descritta come prodotta da *Lactobacillus reuteri*. Prodotta dal metabolismo del glicerolo, come unica fonte di carbonio, in condizioni anaerobiche e la sua forma attiva è una miscela di forme monomeriche, idrate monomeriche e dimeriche cicliche di 3-idrossipropionaldeide (3-HPA) (Talarico et al., 1988). La reuterina è attiva contro diversi tipi di microrganismi, tra cui batteri Gram-positivi e Gram-negativi, lieviti e funghi. L'attività antifungina è stata dimostrata contro le specie di *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* e *Fusarium* (Chung et al., 1989). Secondo la letteratura, l'unica via per la degradazione del glicerolo presente in LAB passa attraverso lo stato intermedio della 3-HPA (reuterina). La maggior parte dei LAB non possiedono la via ossidativa della degradazione del glicerolo, quindi il glicerolo non può essere metabolizzato come unica fonte di carbonio.

### **Acido 3-fenil lattico (PLA)**

L'acido 3-fenil lattico (acido 2-idrossi-3-fenilpropanoico o acido  $\beta$ -fenil lattico, PLA) è un acido organico con un'efficace attività antibatterica ad ampio spettro ed è prodotto da molte specie batteriche di LAB (Mu et al., 2012). Il meccanismo antibatterico del PLA contro alcuni ceppi batterici, tra cui *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Enterococcus faecalis* ed *Enterobacter cloacae*, è stato studiato, dimostrando così che il PLA può provocare danni alla membrana cellulare e perdite dei componenti intracellulari (Ning et al., 2017; Wang et al., 2018; Liu et al., 2018).

## CAPITOLO II

### *Lactobacillus plantarum*

---

#### 2.1. Batteri lattici

I batteri lattici (*Lactic Acid Bacteria* - LAB), sono un gruppo eterogeneo di microrganismi che rivestono un ruolo cruciale nelle biotecnologie e in molteplici processi industriali del settore alimentare, in quanto protagonisti di un ampio numero di fermentazioni dall'ingente valore economico. Il nome di questo gruppo microbico fa riferimento all'acido lattico, metabolita che producono prevalentemente. Sono ascrivibili al gruppo dei LAB numerosi generi tra i quali: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Aerococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weisella*. Sono organismi Gram-positivi, catalasi negativi, resistenti agli acidi, anaerobici aerotolleranti, temperatura ottimale di crescita è 30 °C (mesofilo) o 42 °C (termofilo), non mobili, non sporigeni, a forma di bastoncino e di cocco e in grado di fermentare i carboidrati. Il prodotto principale ottenuto dalla fermentazione degli zuccheri è l'acido lattico (Singh, 2018).

I batteri lattici sono generalmente riconosciuti come microrganismi sicuri, poiché la "Food and Drug Administration negli USA" ha dato a essi la definizione di GRAS (Generally Recognize as Safe); mentre nell'UE l'EFSA ha attribuito alla maggior parte delle specie lo status QPS cioè la "Presunzione Qualificata di Sicurezza".

I LAB possono essere utilizzati nella produzione di vari alimenti fermentati, nei quali svolgono molte attività positive quali: salvaguardare le qualità nutrizionali delle materie prime, prolungare la *shelf life* proteggendo gli alimenti dal deterioramento, garantire la sicurezza inibendo i patogeni (Singh, 2018).

I batteri LAB sono stati usati per migliaia di anni per proteggere una vasta gamma di alimenti, tra cui salumi, vegetali fermentati, prodotti lattiero-caseari dagli organismi nocivi e negli ultimi anni è cresciuto l'interesse nell'individuazione di nuovi ceppi con attività antimicrobica per la bioprotezione degli alimenti.

L'attività antimicrobica di LAB è stata attribuita alla produzione di diverse sostanze antimicrobiche come già riportato in precedenza. I composti con attività antimicrobica vanno dai semplici acidi organici e prodotti metabolici primari a composti molto complessi derivati da bioconversioni o sintesi di peptidi e scissione proteica. Gli

antimicrobici più importanti e meglio caratterizzati prodotti dai LAB sono l'acido lattico e acetico, che sono bioattivi nella loro forma protonata a basso pH e possono agire in sinergia. Mentre la maggior parte degli acidi organici è prodotta attraverso il metabolismo centrale del carbonio, altri composti inibitori sono prodotti tramite metabolismo secondario o bioconversione. I meccanismi alla base dell'inibizione di alcuni singoli composti comprendono la destabilizzazione della membrana, interferenza del gradiente protonico, inibizione enzimatica, processi di ossidazione (Siedler et al., 2019).

## **2.2. *Lactobacillus plantarum***

*Lactobacillus plantarum* è un batterio lattico appartenente al genere *Lactobacillus*. È una delle specie più studiate, ampiamente utilizzata nell'industria alimentare come starter.

Tassonomicamente, secondo la classificazione più aggiornata riportata nell'ultima edizione del Bergey's Manual (Garrity et al., 2005) appartiene a: Dominio, batteri; Phylum, Firmicutes; Classe, Bacilli; Ordine, Lactobacillales; Famiglia, Lactobacillaceae; Genere, *Lactobacillus*; Specie, *L. plantarum*.

Il Gruppo *Lactobacillus plantarum* (GPL) è costituito da cinque specie tassonomiche strettamente correlate: *L. paraplantarum*, *L. pentosus*, *L. fabifermentans*, *L. xiangfangensis* e *L. plantarum* (subsp. *plantarum* e subsp. *argentoratensis*).

*L. plantarum* è un lattobacillo del II gruppo eterofermentante facoltativo, che fermenta i pentosi attraverso la via della fosfochetolasi (PKP); con la formazione di piruvato e acetil-P e la loro successiva conversione in lattato e acetato; mentre fermenta gli esosi attraverso la glicolisi con formazione quasi esclusivamente di lattato. Quindi, il suo genoma codifica per tutti gli enzimi necessari per entrambe le vie glicolitica e dei pentoso-fosfati (Kleerebezem et al., 2003).

La molteplicità delle nicchie ambientali nelle quali è possibile ritrovare batteri ascrivibili ai lattobacilli si riflette nella diversità e nella filogenesi eterogenea del genere. Molte delle specie appartenenti a questo genere sono altamente specializzate e si trovano in un ristretto numero di nicchie ecologiche. *L. plantarum* a differenza di altri lattobacilli è in grado di colonizzare differenti nicchie ecologiche come il tratto gastrointestinale dei mammiferi, la saliva umana e diversi alimenti fermentati.

Il carattere ubiquitario di tale specie può essere attribuito sia allo spiccato vigore fermentativo, sia alla sua capacità di fermentare un'ampia varietà di carboidrati (Kleerebezem, 2003); sia ad altre caratteristiche quali, il numero relativamente elevato di

funzioni regolatorie, implica che *L. plantarum* può adattarsi a molte condizioni ambientali rispondendo efficacemente a molti stress ambientali.

*L. plantarum* viene frequentemente utilizzato come starter in molte industrie alimentari che si occupano di prodotti da forno, prodotti lattiero caseari, vegetali fermentati e bevande fermentate.

Lo sfruttamento di questa specie con la loro lunga storia nella fermentazione degli alimenti formano un campo emergente e progettano alimenti a valore aggiunto, ecco perché sono stati utilizzati ceppi di *L. plantarum* per produrre nuovi alimenti e bevande funzionali (tradizionali/nuovi) con caratteristiche nutrizionali e tecnologiche migliorate (Behera, Ray & Zdolec 2018).

Molti studi hanno dimostrato effetti probiotici di alcuni ceppi di *Lb. plantarum* e per questo vengono impiegati per lo sviluppo di alimenti terapeutici, funzionali e potenziali vaccini (de Vries et al., 2006; Paolillo et al., 2009, Son et al., 2009, Wang et al., 2009; Carminati et al., 2010).

### **2.3. Attività antimicrobica di *Lactobacillus plantarum***

*L. plantarum* è considerato uno dei batteri probiotici con il più ampio spettro di attività antibatterica, e di conseguenza utile nell'industria veterinaria, nella medicina umana e nell'industria alimentare. Una delle caratteristiche che deve avere un probiotico, è la capacità di inibire la crescita di molti microrganismi patogeni. È stato segnalato che i ceppi di *L. plantarum* hanno una capacità unica di produrre sostanze antimicrobiche (Lee et al., 2016), molti ceppi di questa specie hanno dimostrato di produrre diversi agenti antimicrobici come acidi organici, perossido d'idrogeno, diacetile, batteriocine e peptidi antimicrobici (Kavitha et al., 2019). Inoltre, è stato dimostrato che *L. plantarum* ha attività antagonista contro microrganismi patogeni e deterioranti. Tale effetto antimicrobico è stato spesso attribuito alla produzione di acidi organici, compreso l'acido lattico e fenil-lattico (Tharmaraj and Shah, 2009; Neal-McKinney et al., 2012; Tejero-Sarinena et al., 2012; Rodríguez-Pazo et al., 2013).

*L. plantarum* esercita attività inibitoria contro molti batteri Gram-positivi e Gram-negativi come *Escherichia coli* (incluso *E. coli* 0157: H7), *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp.; nonché diversi

eumiceti, muffe e lieviti, quali, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Candida* spp. (Dinev et al., 2017).

In virtù dell'elevata attività antifungina e batterica che esplicano numerosi ceppi di *L. plantarum* contro microrganismi patogeni e deterioranti negli alimenti, potrebbero essere utilizzati come biopreservanti nell'industria alimentare.

### **2.3.1. Attività antibatterica di *Lb. plantarum***

Secondo diversi studi, *Lb. plantarum* ha mostrato attività antimicrobica contro molti patogeni Gram negativi e microrganismi del deterioramento degli alimenti come *E. coli* (compresi enteropatogeni, enterotossigeni, enteroinvasivi, enteroaggregativi ed *E. coli* 0157:H7), *P. aeruginosa*, *Y. enterocolitica*, *C. jejuni*, *H. pylori*, *Klebsiella*, *Salmonella* e *Shigella* spp.; ceppi di *L. plantarum* possono esercitare attività inibitoria contro una varietà di batteri Gram-positivi potenzialmente dannosi come *L. monocytogenes*, *S. aureus* e alcuni membri dei generi *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* (Dinev et al., 2017). Si deve considerare che l'attività antimicrobica di *L. plantarum*, come degli altri LAB, è ceppo specifica (Tremonte et al., 2017).

Esistono tre meccanismi che potrebbero spiegare l'attività antimicrobica dei LAB e in particolare di *L. plantarum*: la produzione di batteriocine; la produzione di acidi organici e altre sostanze inibenti come etanolo, anidride carbonica e acqua ossigenata; e la competizione per i nutrienti (Dinev et al., 2017).

Per quanto riguarda la produzione di batteriocine, i ceppi di *Lb. plantarum* producono una serie di batteriocine come la plantaricina, con una modalità di azione battericida e uno spettro di attività antimicrobica diversificato. Di solito hanno uno spettro ristretto di attività contro i batteri Gram-positivi strettamente correlati alle Lactobacillaceae. È noto che i batteri Gram-negativi sono naturalmente resistenti alle batteriocine prodotte dai LAB a causa della presenza della membrana esterna, che costituisce una barriera fisica al passaggio e al legame delle batteriocine alla membrana citoplasmatica (Pehrson et al., 2015). Si è scoperto che l'acido lattico funge da permeabilizzante della membrana esterna dei batteri Gram-negativi, aumentando così la loro suscettibilità agli antimicrobici (comprese le batteriocine), permettendo alle loro molecole di penetrare nei batteri (Alakomi et al., 2000), questo conferma gli studi che indicano che la destabilizzazione della membrana esterna, tramite l'utilizzo di detergenti o altre sostanze, può rendere i batteri Gram-negativi sensibili anche alle batteriocine.

Alcuni ceppi di *Lb. plantarum* producono batteriocine che hanno una vasta gamma di inibizione contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi, compresi i patogeni presenti

negli alimenti come *L. monocytogenes*, *E. coli*, *S. aureus*, *C. perfringens*, e la resistenza antimicrobica non è probabilmente indotta dopo la loro applicazione (Gong, Meng & Wang, 2010; Todorov, Ho, Vaz-Velho & Dicks, 2010); i ceppi che mostrano queste caratteristiche possono essere considerati potenziali colture protettive.

Ci sono altri composti con effetto antibatterico prodotte da *Lb. plantarum* come i dipeptidi ciclici, di natura idrofobica, che potrebbe interferire con la membrana esterna (Gram-negativo) e con le funzioni della membrana citoplasmatica (Gram-positivo). Per quanto riguarda gli acidi organici prodotti dal LAB, in particolare acido lattico e acetico, si ritiene che esercitino un forte effetto inibitorio sui batteri Gram-negativi. Alcuni studi hanno evidenziato un effetto di inibizione, di alcuni probiotici su *E. coli* e *S. enteritidis*, direttamente proporzionale alla concentrazione di acido organico nel mezzo, hanno anche ipotizzato che il basso pH del mezzo non sarebbe l'unica causa de gli effetti di inibizione osservati, potrebbe tuttavia essere una condizione importante per il passaggio degli acidi organici attraverso la membrana nell'ambiente intracellulare, dove si accumulano ed esercitano attività inibitoria (Fooks & Gibson, 2002). Composti antimicrobici come acido fenil-lattico e acido lattico sono risultati efficaci contro molti batteri patogeni Gram-negativi e Gram-positivi quali *Citrobacter freundii*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* (Dinev et al., 2017).

### **2.3.2. Attività antifungina di *Lb. plantarum***

*Lb. plantarum* ha un'attività inibitoria contro diverse muffe e lieviti, inclusi ceppi patogeni e micotossigenici delle specie *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Candida*, ecc. Gli acidi organici sono considerati tra i principali composti che esercitano effetti antifungini (Russo et al., 2017).

Mun et al. (2019), hanno identificato l'acido 3-idrossi-5-dodecenoico come composto attivo di *L. plantarum* EM che causa effetti battericidi e fungicidi contro *B. cereus* e *A. fumigatus*. Inoltre, hanno verificato che gli effetti antimicrobici di acido 3-idrossi-5-dodecenoico, ac. lattico e ac. acetico erano maggiori con l'uso combinato.

In uno studio Sangmanee e Hongpattarakere (2014), hanno riscontrato che il surnatante di *Lb. plantarum* K35 ha causato una significativa riduzione della crescita fungina e della produzione di aflatossina, osservando che l'attività antifungina, del surnatante era dipendente dal pH aumentando in condizioni acide. Le sostanze antifungine erano resistenti alla sterilizzazione e agli enzimi proteolitici tra cui tripsina e proteinasi K. I componenti principali identificati in questo studio, oltre l'acido lattico, erano 2-butil-4-

eossloctaidro-1H-indene (19,55%), acido oleico (10,52%) e acido palmitico (7,27%). Il surnatante di *Lb. plantarum* K35 causava gravi danni alla parete cellulare e alla membrana citoplasmatica portando a una elevata perdita di contenuto citoplasmatico, alla formazione di vescicole legate alla membrana e alla completa distruzione di organelli membranosi tra cui mitocondri e nucleo.

Diversi studi hanno dimostrato che *Lb. plantarum* è uno dei microrganismi appartenenti ai LAB con maggiore attività antifungina. In uno studio fatto da Cheong et al. (2014) da 36 ceppi LAB con attività antifungina, 12 di essi hanno dimostrato una forte attività inibente contro *Penicillium solitum*, *Aspergillus versicolor* e *Cladosporium herbarum*.

Ahmad Rather et al. (2013) hanno valutato l'attività biopreservativa di *L. plantarum* YML007 in semi di soia essiccati come matrice alimentare. Tra i funghi testati, l'inibizione era massima nei confronti di *A. niger* seguito da *A. flavus*, *A. oryzae* e *Fusarium oxysporum*.

### **2.3.3. *Lactobacillus plantarum* nei sistemi alimentari tradizionali**

*Lb. plantarum* è un batterio lattico ubiquitario e versatile. Rappresenta parte del microbiota di molti alimenti e mangimi, inclusi latticini, carne, pesce, prodotti fermentati vegetali (ad es. mosto, crauti, verdure in salamoia, lievito madre) e insilati; è anche un abitante naturale del microbiota umano e animale (cavità orale, tratto gastrointestinale, vagina, ecc.).

*Lb. plantarum*, componente del microbiota autoctono o di colture starter, è generalmente associato a proprietà desiderabili in molti alimenti fermentati e viene frequentemente aggiunto a una varietà di essi al fine di migliorare la loro qualità o i benefici per la salute.

#### ***Lactobacillus plantarum* nelle paste acide**

*Lb. plantarum* è frequentemente isolato dal microbiota lattico delle paste acide e può influenzare il valore nutrizionale, la qualità e la stabilità dei prodotti da forno. Pepe et al. (2004) hanno isolato 30 ceppi di *Lb. plantarum* da 14 campioni di pasta acida ottenuti da piccoli forni artigianali nel sud Italia e si hanno osservato che i ceppi hanno proprietà tecnologiche diverse. I ceppi di *Lb. plantarum* sono in grado di influenzare in modo differenziato la qualità dell'impasto se impiegati come starter.

La fermentazione della farina di segale indotta tramite l'impiego di lievito naturale, oppure con starter selezionato presenta numerosi effetti positivi: infatti gli acidi prodotti dall'attività fermentativa dei batteri lattici (frequentemente *Lb. plantarum*) determinano una notevole riduzione del pH, la quale, a sua volta, evita lo sviluppo di eventuali fermentazioni indesiderate (es. *Enterobacteriaceae*), inibisce o rallenta nel pane la

crescita di muffe e specie di *Bacillus* (responsabili del cosiddetto “pane filante”), favorisce lo sviluppo di lieviti acido-resistenti, migliora le proprietà strutturali e la shelf-life del prodotto finito (Messen & De Vuyst, 2002; Katina et al., 2002).

Abedfar et al. (2019) hanno estratto e impiegato gli esopolisaccaridi (EPS) prodotti dalla fermentazione controllata di un impasto acido di crusca di frumento (Wheat Bran Sourdough -WBS) con *Lb. plantarum* (NR\_104573.1), al fine di migliorare le caratteristiche qualitative di un determinato tipo di pane (*pan bread*) durante la sua *shelf life*. La presenza di EPS insieme a WBS ha comportato la formazione di legami chimici tra i granuli di amido e la rete di glutine, stabilendo una rete omogenea. I risultati dello studio hanno confermato l'impatto positivo dell'applicazione dell'1% di EPS estratto da *Lb. plantarum* che è stato isolato da WBS durante la fermentazione controllata, insieme al 20% di WBS, sulla qualità del pane come composto funzionale, mantenendo le caratteristiche di freschezza durante 96 ore. Quindi gli EPS estratti dalla fermentazione di *Lb. plantarum* dimostrano avere potenziali proprietà antiossidanti nella produzione di prodotti lievitati da forno (Abedfar et al., 2018; Abedfar et al., 2019).

Ceppi di *Lb. plantarum* (ST31), possono produrre batteriocine (plantaricina) durante la fermentazione dell'impasto, inibendo la crescita di altri ceppi dei generi *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e alcuni patogeni di origine alimentare tra cui *S. aureus*; la produzione di batteriocine è dipendente da pH e temperatura di fermentazione (Todorov et al., 1999).

### ***Lactobacillus plantarum* nei prodotti vegetali**

Tra le diverse specie identificate nelle verdure fermentate con processi artigianali (fermentazione spontanea) *Lb. plantarum* rappresenta la principale, probabilmente, grazie alla sua capacità di resistere all'alto contenuto salino e di acidità delle verdure fermentate (cetrioli, crauti e olive). Spesso, ceppi di *Lb. plantarum* sono stati impiegati come colture starter nella produzione di una ampia gamma di prodotti vegetali fermentati (Behera et al., 2018).

Il kimchi è una verdura fermentata tradizionale coreana prodotta con cavolo o ravanella in salamoia mescolati con varie spezie e fermentata principalmente da differenti specie lattiche. *Leuconostoc mesenteroides* è l'organismo più importante e principale durante le fasi iniziali e intermedie della fermentazione del kimchi. Durante le fasi intermedie e quelle finali della fermentazione, i lattobacilli tra i quali *Lb. plantarum* diventano dominanti, producendo più acidi e provocando l'acidificazione del kimchi. *Lb. plantarum* oltre alla sua attività acidificante, mostra una elevata sopravvivenza a condizioni di basso

pH e alla presenza di sali biliari, quindi potrebbe essere impiegato come coltura starter e probiotica nella produzione di kimchi (Lee et al., 2016).

Goswami et al. (2018) hanno utilizzato due ceppi di *Lb. plantarum* nella fermentazione di legumi consumati in India (horse gram sprouts) e hanno evidenziato che la fermentazione di questi legumi migliora la composizione volatile e il sapore, e produce degli acidi grassi a corta catena, con potenziali benefici per la salute del consumatore.

*Lb. plantarum* è stato il primo LAB associato alla fermentazione del cetriolo. Pérez-Díaz et al. (2017) ha condotto la fermentazione del cetriolo usando *Lb. plantarum* (8 log ufc/mL) ottenendo ottimi risultati; inoltre, *Lb. plantarum* è stato isolato da salamoia dove era in grado di produrre acido lattico 0,6-1,2%.

Hamid et al. (2018), hanno studiato l'effetto della fermentazione di *Lb. plantarum* ATCC 8014 sulla stabilità ossidativa dell'olio d'oliva, e suggeriscono la fermentazione delle olive come metodo appropriato per preservare la qualità e la stabilità dell'olio d'oliva durante la conservazione.

### ***Lactobacillus plantarum* nei prodotti carnei fermentati**

La qualità delle materie prime della carne e di altri ingredienti, le condizioni di lavorazione e l'ecologia microbica presente in una carne fermentata definiscono le caratteristiche del prodotto finale. Il microbiota coinvolto in queste fermentazioni è estremamente vario, con presenza di batteri, lieviti e muffe in un complesso ecosistema microbico (Franciosa et al., 2018). I microrganismi presenti trasformano la materia prima conferendole diverse proprietà fisico-chimiche, sensoriali e microbiologiche, i batteri lattici i principali sono tra i principali attori di questi processi (Di Luccia et al., 2016; Tremonte et al., 2017). Inoltre, alcuni LAB sono in grado di produrre batteriocine, modulando in questo modo parte del microbiota endogeno della matrice alimentare, aumentando la shelf life dei prodotti carnei fermentati e la diversità microbica, fornendo così proprietà sensoriali uniche (Benito et al., 2007).

*L. sakei*, *L. curvatus* e *Lb. plantarum* sono le principali specie di LAB che si trovano generalmente nei prodotti fermentati a base di carne. *L. sakei* è spesso isolato con la frequenza più alta rispetto a *L. curvatus*, anche se a volte si verifica il contrario, oppure si trovano a livelli simili; *Lb. plantarum* è generalmente isolato con meno frequenza, ma anche in questo caso si riscontrano eccezioni, probabilmente a causa di particolari condizioni di lavorazione (Franciosa, 2018).

Uno studio su una salsiccia fermentata spagnola (*Asturian chorizo*) ha evidenziato la presenza maggioritaria del genere *Lactobacillus* (78%) sul totale dei LAB isolati, mentre a livello di specie *Lb. plantarum* rappresentava il 36% del totale (Prado et al., 2019).

Altri studi hanno dimostrato la prevalenza di *Lb. plantarum* in determinati tipi di alimenti carnei fermentati, come nel caso del *nem chua*, un prodotto carneo fermentato del Vietnam che presenta una prevalenza *Lb. plantarum* (67,6%) su altri LAB isolati come *Pediococcus pentosaceus* (21,6%), *L. brevis* (9,5%) e *L. farciminis* (1,3%) (Tran et al., 2011).

### ***Lactobacillus plantarum* e la fermentazione malolattica**

Il vino rappresenta un mezzo nutritivo idoneo allo sviluppo dei batteri lattici per la presenza di amminoacidi, vitamine e composti fermentescibili quali acido malico, acido tartarico e, talvolta, zuccheri. Tuttavia, le basse temperature di conservazione e i bassi valori di pH del prodotto, non consentono lo sviluppo di tutte le specie termofile e di quelle non sufficientemente acidofile. L'industria enologica è interessata all'impiego di batteri lattici in quanto costituiscono il punto di partenza per un importante miglioramento ed affinamento della qualità di produzione del vino rosso, destinato all'invecchiamento, grazie alla fermentazione malolattica. Questa via fermentativa consente la trasformazione dell'acido malico in acido lattico e anidride carbonica. I batteri lattici utilizzano come fonte di energia gli zuccheri residui, spesso pentosi, non utilizzati durante la fermentazione alcolica. La fermentazione malo-lattica provoca una disacidificazione del vino che prende un carattere pastoso e morbido, tipico di un vino a bassa acidità. Il batterio lattico tipico dei vini è *Oenococcus oeni* che, fra tutti, è il più acido-tollerante, anche se nella popolazione di batteri lattici nel mosto d'uva ed all'inizio della fermentazione alcolica sono prevalenti ceppi di *Lactobacillus* (Succi et al., 2017).

Durante la fermentazione l'aumento della concentrazione alcolica inibisce le specie e i ceppi di batteri lattici sensibili all'etanolo favorendo la crescita dei ceppi appartenenti alla specie *O. oeni*. Negli ultimi anni le ricerche hanno dimostrato che alcune specie di *Lb. plantarum* possono crescere nei vini ed essere in grado di sopravvivere alle dure condizioni del vino (alte concentrazioni di etanolo, basso pH e temperature e anidride solforosa) (Sun et al., 2016; Testa et al., 2014).

Sun et al. (2016), hanno isolato un ceppo di *Lb. plantarum* (SGJ-24) autoctono dai vini di ciliegia con fermentazione malolattica spontanea, e ha valutato gli effetti del suo utilizzo come coltura starter nella fermentazione malolattica controllata di vini di ciliegia. I risultati hanno dimostrato che sui parametri analitici non ha avuto effetti negativi, mentre

dall'analisi sensoriale è emerso che l'intensità aromatica globale è stata potenziata dall'introduzione di SGJ-24. Tutti i dati ottenuti suggeriscono che l'applicazione del ceppo *Lb. plantarum* SGJ-24 come specie alternativa LAB utile per la vinificazione di ciliegie.

### ***Lactobacillus plantarum* nei prodotti lattiero-caseari**

Ceppi di *Lb. plantarum* possono essere impiegati indirettamente nel processo di produzione dello yogurt, per migliorare la conservabilità e caratteristiche sensoriali del prodotto finito (Zhu et al., 2019; Sidira et al., 2017), oppure come coltura probiotica aggiuntiva conferendo benefici alla salute del consumatore come immunoregolatore, attività ipocolesterolemica e prevenzione dell'invecchiamento ossidativo (Li et al., 2017; Nami et al., 2019; Zhu et al., 2019; Zhao et al., 2019;).

*Lb. plantarum* nella produzione di formaggi, interviene soprattutto nelle fasi di maturazione. Ad esempio, l'ecosistema microbico del formaggio Cheddar è costituito principalmente da lattococchi mesofili, come il *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* e *Lc. lactis* subsp. *lactis*, usati come starter primario, mentre durante la maturazione del formaggio si sviluppano LAB non starter (NSLAB) appartenenti al genere *Lactobacillus* in particolare sono eterofermentanti facoltativi, come *Lb. plantarum*, *L. casei*, *L. amylovorus* e *L. rhamnosus*. *Lb. plantarum* è una delle principali specie NSLAB nella maturazione di formaggi stagionati dove esiste scarsa disponibilità di zuccheri fermentescibili, poiché si è evidenziato che ceppi di *Lb. plantarum* possono utilizzare altre fonti di energia per crescere, come aminoacidi liberi e peptidi. Il metabolismo del NSLAB risulta influenzato dal rilascio e catabolismo degli aminoacidi liberi della coltura starter principale (Bergamini et al., 2013).

Altri studi dimostrano che l'utilizzo di ceppi di *Lb. plantarum* nella produzione di formaggi, può dare dei risultati promettenti in ulteriori produzioni industriali, avendo effetti sulla consistenza e sul sapore del formaggio, nonché potenziali benefici sulla salute, poiché questi ceppi possono dimostrarsi anche probiotici. Wang et al., (2018), hanno impiegato *Lb. plantarum* SKT109 (isolato dai grani di kefir del Tibet) produttore di esopolisaccaridi, come coltura aggiuntiva nella produzione di formaggio Cheddar, e hanno valutato il formaggio durante la maturazione. Il formaggio sperimentale prodotto con SKT109 aveva un contenuto di umidità maggiore rispetto ai controlli. SKT109 è sopravvissuto bene nel formaggio Cheddar, con cariche di 7,89 log ufc/g alla fine del periodo di maturazione. L'aggiunta della coltura aggiuntiva non ha avuto effetti negativi rilevabili sui formaggi in termini di proteolisi e consistenza. SKT109 ha migliorato il

profilo aromatico del formaggio Cheddar aumentando i livelli di composti a basso valore soglia tra cui acetato di etile, 3-metil-1-butanolo, 3-idrossi-2-butanone e butanone. Risultati simili sono stati ottenuti con l'utilizzo di un ceppo di *Lb. plantarum* JLK0142 isolato da tofu tradizionale della Mongolia interna cinese, produttore di EPS e con attività probiotica, utilizzato nella produzione di formaggio Cheddar magro (Wang et al., 2019). Altri studi hanno evidenziato la capacità di ceppi di *Lb. plantarum* di convertire l'acido linoleico in acido linoleico coniugato (CLA), e la possibilità di essere usato come coltura aggiuntiva per aumentare leggermente le concentrazioni di CLA nei formaggi a latte vaccino a maturazione breve (Ares-Yebra et al., 2019), inoltre si sono ottenuti risultati promettenti quando sono stati valutati come probiotici in grado arricchire gli alimenti con CLA (Ribeiro et al., 2018). I CLA hanno attirato grande interesse negli ultimi anni a causa delle loro proprietà funzionali e salutari attribuite, tra cui effetti anticarcinogeni, antiaterogenici, antiobesità, antinfiammatori e antidiabetici.

Come precedentemente esposto, *Lb. plantarum* è considerato uno dei batteri probiotici con il più ampio spettro di attività antibatterica, e di conseguenza utile nell'industria veterinaria, nella medicina umana e nell'industria alimentare.

*Lb. plantarum* potrebbe essere impiegato nella industria lattiero-casearia come coltura protettiva, rappresentando una alternativa biologica nella conservazione dei prodotti nei confronti dei microrganismi alteranti e patogeni.

## CAPITOLO III

### PROBLEMATICHE

---

#### 3.1. Alimenti Free From

Negli ultimi decenni, le dinamiche globali nella produzione e nel consumo di alimenti si sono evolute rapidamente verso alimenti più salutari, che abbiano benefici sulla salute del consumatore, come gli alimenti probiotici e quelli funzionali, ma che al contempo garantiscano la sicurezza del prodotto. Un'altra delle tendenze attuali corrisponde alla crescente domanda dei consumatori verso prodotti privi di elementi presenti naturalmente nella composizione degli alimenti come il grasso, il lattosio, il glutine, ecc.; ma anche privi di elementi che tradizionalmente sono stati aggiunti nella formulazione degli alimenti per mantenerli stabili, organoletticamente gradevoli e sicuri al consumatore quali antiossidanti, coloranti, zuccheri, edulcoranti e conservanti, tutti generalmente ottenuti per sintesi chimica. Da queste esigenze nasce il concetto di alimenti *free from* (*free from food*) o alimenti senza qualcosa.

La contaminazione del cibo con microrganismi alteranti o patogeni è una delle maggiori preoccupazioni della sanità pubblica e dell'industria alimentare. L'uso di conservanti chimici sintetici è aumentato negli ultimi decenni e sono emersi anche dati scientifici considerevoli sull'intolleranza agli additivi alimentari con vari problemi di salute (Sweis & Cressey, 2018). L'iperattività e altri problemi neurofisiologici sono stati segnalati nei bambini a causa del consumo di conservanti chimici; alcuni di questi conservanti sono cancerogeni mentre altri sono noti per causare vari effetti collaterali, tra cui difficoltà respiratorie, danni cardiaci e altre implicazioni per la salute (Skariyachan & Govindarajan, 2019) quando sono consumate in determinate dosi.

Dalla crescente consapevolezza dei consumatori sui possibili effetti sulla salute dei conservanti chimici comunemente impiegati negli alimenti e l'aumento della domanda di prodotti meno trasformati e con meno additivi chimici, nasce la preoccupazione dell'industria alimentare di trovare opzioni naturali nella conservazione degli alimenti, cioè nella protezione degli alimenti dalla contaminazione di microrganismi alteranti e patogeni. La bioconservazione si presenta come una opportunità ai metodi di conservazione tradizionali degli alimenti. Questo approccio prevede l'uso dei microrganismi o dei loro prodotti antimicrobici per prolungare la durata di conservazione e migliorare la sicurezza alimentare. I microrganismi utilizzati per la bioconservazione

dei prodotti alimentari comprendono i LAB a causa della loro versatilità, natura probiotica e sicurezza (denominazione GRAS e QPS).

### **3.2. Problematiche microbiologiche inerenti alla qualità e sicurezza nei prodotti lattiero-caseari**

#### **3.2.1. *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* è un batterio patogeno Gram-positivo, non sporigeno, mobile, aerobico o facoltativo anaerobico, a forma di bastoncino; è attivamente mobile, attraverso il flagello peritrico, a temperatura ambiente (20-25 °C), mentre che a 37 °C il flagello non viene sintetizzato; la temperatura di crescita ottimale è di 30–37 °C; tuttavia, è stata riportata una crescita tra le temperature di -0,4 e 45 °C (Hiett, 2010).

*L. monocytogenes* è diffusa nell'ambiente e spesso contamina gli alimenti crudi o trasformati attraverso il contatto accidentale con superfici contaminate. Inoltre, poiché *L. monocytogenes* può crescere alle temperature di refrigerazione, l'organismo può moltiplicarsi nella maggior parte degli ambienti alimentari.

*L. monocytogenes*, è l'agente causale della listeriosi nell'uomo e negli animali, che nell'uomo colpisce il cervello e il midollo spinale causando ascessi cerebrali, meningoencefalite o meningite, fu isolata per la prima volta dai ricercatori britannici dell'Università di Cambridge nel 1924 dal sangue di conigli infetti. Sebbene ampiamente riconosciuto come causa di aborto spontaneo nelle donne in gravidanza e meningite, encefalite e setticemia nei neonati e negli adulti immuno-compromessi, questo organismo non è stato riconosciuto come grave patogeno di origine alimentare fino al 1985. L'infezione può presentare un tasso di mortalità di circa il 20%. Durante gli anni 80 del '900, tre importanti focolai di listeriosi correlati ai latticini, due negli Stati Uniti e uno in Svizzera, sono stati collegati al consumo di latte pastorizzato, formaggio fresco e formaggio a pasta molle che hanno provocato oltre 100 morti (Ryser, 2011).

Desai et al., (2019) hanno analizzato i rapporti del ProMED (*International Society for Infectious Diseases*) dal 1996 al 2018, identificando 123 eventi di Listeriosi alimentare, in 30 paesi. Dei 123 eventi, 94 (76%) sono stati associati a casi umani, mentre 29 (24%) sono stati classificati come richiamo alimentare precauzionale a causa della presenza di contaminazione batterica senza caso umano associato. I tassi di mortalità associati all'infezione da *Listeria* dai rapporti ProMED sono stati del 20%.

### ***L. monocytogenes* nei prodotti lattiero caseari**

Il latte fresco e i prodotti lattiero-caseari, insieme ai prodotti carnei e prodotti della pesca, rappresentano i principali veicoli della trasmissione di *L. monocytogenes*. Questo batterio può arrivare ai prodotti lattiero-caseari, oltre la contaminazione post-pastorizzazione, tramite il latte di partenza, dove i bovini da latte infetti con questo patogeno, possono rilasciare cellule di *Listeria* nel loro latte a livelli di  $10^4$  ufc/mL.

Come già indicato precedentemente le temperature ottimali di crescita per *Listeria* sono fra 30 e 37 °C, tuttavia, i ceppi di *L. monocytogenes* possono crescere a temperature fino a -0,1 °C nel latte pastorizzato durante una conservazione prolungata. A 4 °C, la crescita di *Listeria* è leggermente più veloce con tempi di generazione di 30–40 h. Tuttavia, il tasso di crescita si riduce notevolmente (tempi di generazione di 10-13 ore) quando il latte viene tenuto a temperature oltre gli 8°C. Di particolare preoccupazione per l'industria lattiero-casearia è la capacità di *L. monocytogenes* di tollerare gli stress ambientali che incontra negli impianti di lavorazione del latte, quali: pH 4,3-10,0, presenza di NaCl fino al 10% (aw 0,92), inoltre, è in grado di sopravvivere per diversi mesi in salamoie al 25,5% di NaCl (Ryser, 2011).

La capacità di resistere a differenti stress di questo agente patogeno alimentare ubiquitario e psicrotrofico, insieme alla sua capacità di colonizzare, moltiplicarsi e persistere negli impianti di produzione alimentare per mesi o anni, rende *L. monocytogenes* una grave minaccia per i produttori lattiero-caseari. Essendo incapace di sopravvivere alla pastorizzazione, questo agente patogeno spesso entra nei prodotti lattiero-caseari e in altri cibi pronti come contaminante post-pastorizzazione.

I risultati di ampie indagini suggeriscono che circa l'1-5% dei formaggi prodotti in Europa, principalmente varietà a pasta molle e semidure maturate in superficie da muffe o batteri, possono contenere *L. monocytogenes*, mentre che raramente si trova nei formaggi stagionati a pasta dura (ad es. Cheddar) o formaggi che subiscono severi trattamenti termici durante la produzione (ad esempio Cottage, Mozzarella, Parmigiano, Svizzero, formaggio fuso) (Ryser, 2011).

Vista la diffusione di *Listeria* nell'ambiente, il suo controllo nell'industria alimentare deve iniziare a livello dell'azienda agricola con particolare attenzione alle buone pratiche di allevamento degli animali, uso di mangimi/insilati di alta qualità, pratiche igieniche di mungitura e refrigerazione adeguata a ridurre al minimo la crescita dell'agente patogeno durante lo stoccaggio in grandi quantità di latte. Le attuali pratiche di pastorizzazione ad alta temperatura e di breve durata sono gli unici mezzi tecnologicamente efficaci per la

distruzione di *L. monocytogenes* nel latte crudo. Pertanto, i prodotti lattiero-caseari opportunamente pastorizzati sono privi di *Listeria*, salvo una eventuale contaminazione post-pastorizzazione. Programmi di risanamento ben progettati che includono il campionamento settimanale per *Listeria* nelle aree problematiche all'interno della fabbrica sono essenziali se si vuole ridurre al minimo l'incidenza di questo patogeno nell'impianto di produzione e nel prodotto finito. La contaminazione post-pastorizzazione si verifica più frequentemente durante le operazioni di estrusione, riempimento e confezionamento quando il prodotto è esposto a contaminazione nell'aria e superfici a contatto con alimenti difficili da pulire.

Attualmente numerosi studi dimostrano l'attività anti-*Listeria* di diverse specie di LAB, rappresentando una opportunità biologica nel controllo e prevenzione di contaminazione di questo patogeno nell'industria lattiero-casearia. La contaminazione di *Listeria* sulle superficie dei formaggi potrebbe essere controllata tramite l'utilizzo di una miscela di diversi ceppi LAB per assicurare la corretta inibizione, poiché si è verificato che l'attività inibente nei confronti di *Listeria* può variare a seconda delle condizioni di produzione e ceppi starter utilizzati nella produzione dei formaggi (Morandi et al., 2019). Altro studio dimostra una potenziale attività sinergica nell'uso combinato di *Lactococcus lactis* e *Pediococcus acidilactici* contro *L. monocytogenes* nel latte crudo (Aljasir et al., 2020). Questi studi suggeriscono che l'uso delle colture protettive (PC) è una strategia promettente per migliorare la sicurezza alimentare, compresa la sicurezza dei prodotti a base di latte crudo come il formaggio.

### **3.2.2. *Clostridium* spp.**

Il genere *Clostridium* è costituito da un gruppo diversificato di microrganismi anaerobici obbligatori, Gram-positivi, sporigeni, ubiquitari cioè distribuiti in tutti i tipi di ambienti come suolo, acqua, piante e tratti intestinali di animali e umani. Diverse specie possono crescere in una vasta gamma di alimenti, tra cui prodotti lattiero-caseari, carne e pollame, e frutta e verdura fresca (o in scatola), causando deterioramento e/o intossicazione alimentare negli esseri umani.

Nei formaggi semiduri e duri, la fermentazione dell'acido butirrico responsabile del difetto del gonfiore tardivo è una delle principali cause di deterioramento, con conseguenti difetti di consistenza e sapore con un impatto economico sfavorevole. Questo difetto è stato attribuito alla crescita nel formaggio di ceppi appartenenti a *Clostridium tyrobutyricum* in grado di fermentare l'acido lattico con produzione di acido butirrico, acido acetico, anidride carbonica e idrogeno (Klijn et al., 1995). Tuttavia, anche altre

specie come *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* e *C. butyricum* hanno dimostrato di contribuire in modo significativo alla comparsa del gonfiore tardivo nel formaggio (Bassi et al., 2015; Ávila et al., 2014).

La contaminazione di *C. tyrobutyricum* nei formaggi a pasta dura o semidura possono causare oltre alla gonfiatura, alterazione del colore, pH, accumulo di composti volatili come gli acidi butirrico, propionico e pentanoico e alcune aldeidi, alcoli ed esteri associati al formaggio rancido e agli odori pungenti; nel caso di contaminazioni con *C. sporogenes* e *C. beijerinckii* i sintomi dell'alterazione sono più lievi e tardivi e con un profilo volatile diverso; nonostante i formaggi contaminati da *C. butyricum* presentano un leggero gonfiore alla fine della maturazione, con caratteristiche fisico-chimiche e un profilo volatile simile ai formaggi senza alterazioni (Gómez-Torres et al., 2015).

Ad oggi per ridurre al minimo la contaminazione da *Clostridium* e lo sviluppo del gonfiore tardivo, è possibile agire a livello preventivo presso l'azienda lattiero-casearia, riducendo al minimo la contaminazione del latte (ovvero controllando la qualità dell'insilato, modificando l'alimentazione, migliorando l'igiene durante la mungitura e lo stoccaggio) oppure a livello dell'industria casearia mediante procedure tecnologiche (bactofugazione o microfiltrazione del latte, aggiunta di nitrato o lisozima). Tuttavia, si possono trovare dei limiti o problematiche nell'uso delle strategie ad oggi permesse, ad esempio la riduzione del numero di spore raggiunta dalla bactofugazione può essere insufficiente per impedire il gonfiore tardivo, la microfiltrazione può essere applicata solo al latte scremato perché i globuli di grasso del latte sono troppo grandi per passare attraverso i pori della membrana e l'uso di sostanze chimiche è precluso dall'attuale aumento della domanda di alimenti privi di additivi o per motivi sanitari (Garde et al., 2013).

Nel caso dell'uso di additivi come il nitrato o il lisozima, la maggior parte di queste sostanze non è consentita o è esplicitamente vietata nella produzione di formaggi DOP, come riportato nei disciplinari di produzione. Attualmente il lisozima è l'unico agente batteriostatico ammesso nella produzione del Grana Padano.

Una alternativa al controllo delle cellule vegetative e delle spore di *Clostridium* viene rappresentata dalla scrematura naturale del latte che per affioramento dei globuli di grasso, tramite interazioni molecolare e per intrappolamento fisico, portano le cellule e le spore sulla superficie del latte. Si è verificato che tramite questa procedura, le cellule e le spore possono essere eliminate fino al 90%, ma mancano ancora studi per chiarire i

meccanismi di interazione dei globuli di grasso con le cellule in modo tale da potenziare l'efficacia di questa alternativa (D'Incecco et al., 2015).

Altra alternativa proposta è l'impiego di colture microbiche NSLAB per il controllo dello sviluppo di *Clostridium*, come il caso dell'utilizzo di *L. reuteri* come produttore di reuterina in presenza di glicerolo che si presenta come un nuovo sistema di biopreservazione per inibire la crescita di questo batterio e prevenire il gonfiore tardivo mediante produzione della sostanza antimicrobica *in situ* (Ávila et al., 2014; 2017). Comunque, l'impiego di colture microbiche protettive potrebbe essere limitato dalle specifiche di produzione di alcuni formaggi DOP oppure ammesso quando siano definiti con precisione gli effetti di esse sulle caratteristiche del prodotto.

### **3.2.3. *Pseudomonas* spp.**

Il genere *Pseudomonas* comprende un gruppo eterogeneo di microrganismi appartenenti alle Pseudomonadaceae. Sono batteri ubiquitari Gram negativi, aerobi, non fermentanti, catalasi e ossidasi positivi, mesofili e psicotolleranti, e non sporigeni. I membri di questo genere si sono adattati a varie condizioni e quindi si trovano in una vasta gamma di nicchie ecologiche quali: suolo, acqua, piante, tessuti animali, alimenti, ecc. grazie ai loro complessi sistemi enzimatici (Caldera et al., 2016).

I membri di questo genere sono spesso coinvolti nella degradazione e nel deterioramento di una vasta gamma di alimenti. Molti enzimi prodotti dagli *Pseudomonas*, in particolare le proteasi, sono resistenti al calore; ciò si traduce in un proseguimento dell'attività enzimatica anche dopo i processi di trattamento termico utilizzati per eliminare i microrganismi in determinate matrici. Questo fenomeno è molto importante nel latte UHT e nei prodotti lattiero-caseari in cui la proteasi, liberata con la lisi delle cellule dopo i trattamenti termici, può causare rispettivamente fenomeni di coagulazione e instabilità (Datta & Deeth, 2001).

*Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa* e *P. putida* sono le principali specie di *Pseudomonas* presenti nella catena lattiero-casearia e sono responsabili della produzione di enzimi proteolitici resistenti alle alte temperature e che causano deterioramento, anche nei prodotti lattiero-caseari trasformati.

Alcuni ceppi di *P. fluorescens* hanno dimostrato di essere potenziali agenti di una colorazione anomala blu nel formaggio e nei latticini, causando importanti perdite economiche per l'industria. Producono il pigmento blu in particolari condizioni di conservazione, come l'abuso di temperatura durante lo stoccaggio e dopo l'acquisto (Rossi et al., 2018). Le segnalazioni sul difetto della colorazione blu in diversi tipi di formaggi

freschi e molli sono aumentate nell'attuale decennio e la mozzarella è stata il formaggio più frequentemente coinvolto (del Olmo et al., 2018).

Oltre alla produzione di enzimi idrolitici e di pigmenti blu, gli *Pseudomonas* sono anche capaci di aderire e formare biofilm su varie superfici quali le pareti dei serbatoi del latte e in altri impianti di produzione dei formaggi (pastorizzatori, tubi, polivalenti, vasche, ecc.). La capacità di produrre biofilm consente agli *Pseudomonas* di resistere ad alcune pratiche di pulizia e sanificazione degli impianti. Infatti, il biofilm aiuta i microrganismi a persistere nell'ambiente e a migliorare la capacità di resistere all'essiccamento, alla luce UV e ai trattamenti con disinfettanti e antimicrobici (Rossi et al., 2018).

Il controllo di *Pseudomonas* spp. nei prodotti lattiero-caseari riguarda soprattutto un approccio preventivo, con il contenimento della contaminazione durante la raccolta e lo stoccaggio del latte per non avere problemi di rilascio di enzimi durante i trattamenti termici; ma sono necessarie anche attività che prevengano la contaminazione post-pastorizzazione. L'impiego di colture protettive per il controllo di *Pseudomonas* spp. nell'industria lattiero-casearia si presenta come un'alternativa biologica all'uso di additivi chimici convenzionali.

#### **3.2.4. *Brochothrix thermosphacta***

È un batterio Gram-positivo non sporigeno, bastoncino pleomorfo, catalasi positivo, anaerobio facoltativo in grado di svilupparsi a basse temperature (0-30°C). È considerato uno dei principali microrganismi alterativi di carne e dei prodotti derivati, può crescere in atmosfere con un basso livello di ossigeno e/o un'alta concentrazione di anidride carbonica e quindi può causare problemi nei prodotti a base di carne confezionati sottovuoto o in atmosfera modificata. Viene isolato anche da pesce, verdure surgelate e prodotti lattiero-caseari.

L'alterazione è imputabile alla produzione di diacetile e di acidi grassi dalla utilizzazione aerobica del glucosio, che conferiscono agli alimenti odori e sapori di acido e burro. Sebbene *B. thermosphacta* possa non essere l'organismo più dominante, questi difetti sensoriali possono essere osservati una volta che questo organismo ha raggiunto  $10^5$  ufc/g.

#### **3.2.5. *Penicillium* spp.**

*Penicillium* è uno tra i generi fungini più diffusi in natura e le sue molte specie riescono a svilupparsi negli habitat più diversi, considerate nel loro complesso ubiquitarie esse generalmente si comportano in modo saprofitario. Alcune sono in grado di causare

marciumi su diversi ospiti vegetali, sia in campo sia durante la conservazione. Altre hanno importanti impieghi nel campo della micologia industriale, per la produzione di antibiotici (penicillina, griseofulvina) e di enzimi (ribonucleasi). In campo alimentare è noto il loro ruolo nella maturazione di formaggi, come il gorgonzola ed il roquefort. Rispetto ad altri raggruppamenti sistematici (come ad esempio *Aspergillus*), il genere *Penicillium* è caratterizzato da una xerofilia meno spiccata e da un minore adattamento ad elevate temperature. Alcune specie sono psicrofile e quindi in grado di contaminare derrate conservate a basse temperature, poichè possono crescere sia pure lentamente a temperature vicine o pari a 0 °C. Alcune specie di *Penicillium* possono crescere sulle matrici alimentari, come i prodotti vegetali, e produrre micotossine.

## CAPITOLO IV

### SCOPO

---

Uno dei sistemi attuali per la conservazione degli alimenti è la bioconservazione, cioè l'impiego di microrganismi o dei loro metaboliti con attività antimicrobica nei confronti di microrganismi alteranti e patogeni che possono contaminare le matrici alimentare. Negli ultimi anni l'utilizzo di microrganismi come colture protettive si presenta come una alternativa biologica all'utilizzo di additivi chimici tradizionalmente impiegati nella conservazione degli alimenti. Tra i microrganismi utilizzati nella bioconservazione i batteri lattici (LAB) sono quelli diffusamente impiegati e più promettenti per la loro attività protecnologica e antimicrobica nei confronti di microrganismi non desiderati. I LAB sono riconosciuti come microrganismi sicuri (GRAS e QPS) ad essere impiegati nella produzione degli alimenti, quindi candidati potenziali ad essere utilizzati nella bioconservazione. Una delle specie LAB che ad oggi viene ampiamente studiata per la sua attività antimicrobica e la sua versatilità di crescere in diverse condizioni, è *Lactobacillus plantarum*.

In base alle precedenti considerazioni, in questo lavoro di tesi si è inteso studiare le caratteristiche bioprotettive di ceppi di *Lactobacillus plantarum* isolati da diverse matrici alimentari da impiegare come colture protettive nella bioconservazione.

Per studiare le caratteristiche bioprotettive dei ceppi oggetto di studio si è valutata l'attività antimicrobica in differenti condizioni nei confronti di microrganismi indesiderati.

## CAPITOLO V

### MATERIALI E METODI

---

#### 5.1. Individuazione di ceppi di *Lactobacillus plantarum* ad attività protettiva

##### 5.1.1. Ceppi produttori e ceppi indicatori oggetto dello studio

Cinquantadue ceppi riferibili a *Lb. plantarum* appartenenti al Dipartimento Agricoltura, Ambiente e Alimenti (DiAAA) e preventivamente isolati da diversi alimenti fermentati, quali impasti acidi, vini, formaggi, salumi e pane d'api, sono stati impiegati come ceppi produttori. Le caratteristiche principali delle matrici alimentari, nonché il numero di ceppi di *Lb. plantarum* isolati da ciascuna fonte sono riportati nella Tabella 5.1.

Tutti i ceppi di *Lb. plantarum* sono stati testati per la loro attività antimicrobica contro 6 ceppi microbici indesiderati (indicatori), elencati di seguito:

- *Brochotrix thermosphacta* DSM 20171<sup>T</sup>, scelto in quanto ceppo tipo di una specie ritenuta indesiderata nella conservazione delle carni;
- *Pseudomonas fluorescens* DSM 50090<sup>T</sup>, ceppo tipo di una specie responsabile di processi di deterioramento di differenti alimenti;
- *Clostridium butyricum* CS21, ceppo appartenente alla collezione dipartimentale (DIAAA) e associato a processi deterioranti in prodotti lattiero caseari;
- *Clostridium sporogenes* DSM 795<sup>T</sup>, ceppo tipo di una specie che oltre ad avere una azione degradativa e putrefattiva nei prodotti carnei e anche ritenuta la specie non patogena ecologicamente vicina *Clostridium botulinum* e pertanto indicata come suo surrogato nelle indagini laboratoriali;
- *Listeria innocua* ATCC 33090, ceppo riferibile ad una specie impiegata come surrogato della specie patogena *L. monocytogenes*;
- *Penicillium* spp. P7, ceppo appartenente alla collezione dipartimentale (DIAAA) e associato a processi di deterioramento di alimenti freschi.

**Tabella 5.1.** Elenco dei ceppi di *Lactobacillus plantarum* utilizzati come produttori e delle caratteristiche relative alle matrici alimentari di isolamento

Numero ceppi	Sigla ceppi	Matrice isolamento	Caratteristiche della matrice				Riferimenti
			pH	a <sub>w</sub>	Alcohol (%vol)	NaCl (%)	
27	Lrhm55; Lrhm16; Lrhm52; Lrhm84; Lrhm11; Lrhm50; LpE_meb; Lrhm112; Lrhm67; Lrhm7; Lrhm12; Lrhm28; LpA_meb; Lrhm_meb; LpF_meb; Lrhm34; Lrhm44; Lrhm24; Lrhm51; Lrhm40; Lrhm18; Lrhm93; Lrhm64; Lrhm39; Lpls30; Lpls32; Lpls26	Formaggio	5,55 - 5,75	0,96 - 0,97	n.d.	1,9 - 2,2	Coppola et al., 2003
1	Lpls18	Salami	5,75 - 5,8	0,94 - 0,97	n.d.	2,8 - 3,1	Coppola et al., 1998
3	Lpls1; Lpls21; Lpls47	Salami	5,15 - 5,18	0,93 - 0,94	n.d.	3,0 - 3,5	Tremonte et al., 2007; Pannella, 2010
4	LplaP1; LpTSC11H; LplaM2; Lpw9	Vino rosso	3,71 - 3,88	n.d.	13,6	n.d.	Testa et al., 2014
3	LplaTM3; LplaT1; LplaM6	Vino rosso	3,60 - 3,80	n.d.	11,8 - 13,5	n.d.	Testa et al., 2014
5	LplaM10; Lplw94; LpPCQB1; Lplw10; Lp3D5	Vino rosso	3,62 - 3,65	n.d.	12,4 - 12,8	n.d.	Testa et al., 2014
2	TSC11T; TSC11S	Vino rosso	3,66 - 3,77	n.d.	11,3 - 11,6	n.d.	Testa et al., 2014
7	Lpla_100; Lpla_92; Lpla_87; Lpla_86; Lpla_27; Lpla_26; Lpla_88	Pane d'api	3,50 - 3,80	0,57	n.d.	n.d.	collezione DiAAA

I ceppi produttori e indicatori sono stati rivitalizzati, mediante doppio passaggio, nei terreni di crescita appropriati e incubati per 16 ore a 28 °C, prima di essere utilizzati.

### 5.1.2. Determinazione dell'attività antimicrobica espressa dalle cellule dei ceppi produttori

La tecnica *spot-on-the-lawn* è stata utilizzata per valutare l'attività antimicrobica espressa dalle cellule dei ceppi produttori nei confronti dei 6 ceppi indicatori valutati, impiegando il metodo descritto da Tremonte et al., (2007). In dettaglio, da brodocolture over night in MRS broth (Oxoid) di ogni ceppo di *Lb. plantarum* testato, sono stati prelevati 75 µL e inoculati sulla superficie delle piastre di agar MRS, incubate per 24 ore a 28 °C. Ogni ceppo indicatore, inoculato (2% v/v) in 7 mL del terreno appropriato (contenente lo 0,7% agar) ad una concentrazione finale di circa 6 log ufc/mL, è stato versato nelle piastre dopo che il terreno inoculato si è solidificato su di esso sono stati eseguiti spot dei ceppi di *Lb. plantarum* (5 per piastra). Dopo un'incubazione a 28 °C per 24–48 ore, è stata valutata la presenza di un alone di inibizione, considerato come indice di un effetto antagonistico positivo. Il grado di inibizione è stato definito: basso (5 mm < Ø < 15 mm), moderato (15

mm  $\leq \varnothing < 25$  mm), forte (25 mm  $\leq \varnothing < 35$  mm) e molto forte (35 mm  $\leq \varnothing < 45$  mm). Un densitometro calibrato (GS-800, Bio-Rad, Hercules CA, USA) è stato utilizzato per l'acquisizione di immagini e il software *Adobe Photoshop CS6 Extended* per la misurazione dell'alone d'inibizione. Ogni esperimento è stato condotto in triplo.

### **5.1.3. Determinazione dell'attività antimicrobica espressa dal surnatante privo di cellule**

L'attività antimicrobica dei surnatanti privi di cellule (CFS) è stata determinata mediante la tecnica dell'*agar well diffusion*, descritta da Moraes et al. (2010) con modifiche di Tremonte et al. (2007; 2010). In dettaglio, 20 mL del substrato colturale opportuno semiagarizzato (0,8% agar), sono stati inoculati con il ceppo indicatore da testare, prelevato da una coltura over night ad una concentrazione di circa 6 log ufc/mL. I surnatanti privi di cellule, ottenuti da colture over night in MRS per ogni ceppo produttore, centrifugati a 12000 rpm per 10 minuti a 4 °C (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Amburgo, Germania) e sterilizzati mediante filtrazione (pori di 0,22  $\mu$ m dimensioni, Schleider & Schuell, Dassel, Germania), sono stati posizionati (75  $\mu$ L) in uno dei pozzetti creati nel terreno in piastra e incubati per 48 h a 28 °C. Gli aloni di inibizione misurati sono stati normalizzati utilizzando la seguente formula:

$$\text{Grado di inibizione (GI)} = \frac{\text{diametro del alone di inibizione (mm)}}{\text{diametro del pozzetto (mm)}}$$

Su questa base, l'effetto antimicrobico è stato considerato: basso (1 < GI <3), moderato (3  $\leq$  GI <5), forte (5  $\leq$  GI <7) e molto forte (7  $\leq$  GI <9).

Sono stati usati come controllo le piastre inoculate con ciascun ceppo indicatore e senza CFS. Per individuare se l'effetto inibitorio prodotto da *Lb. plantarum* era ascrivibile ad acidi e/o proteine, è stato eseguito anche la prova di *agar-well diffusion* aggiungendo due ulteriori test:

1) CFSn: CFS di ogni ceppo di *Lb. plantarum*, sterilizzato mediante filtrazione, neutralizzato con NaOH 1N (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) fino a pH 7;

2) CFSp: CFS di ogni ceppo di *Lb. plantarum*, sterilizzato mediante filtrazione, aggiunto con  $\alpha$ -chimotripsina, proteinasi K e tripsina (Moraes et al., 2010) ad una concentrazione finale di 1 mg/mL ciascuno.

Le proteasi sono state acquistate da Sigma-Aldrich. Ogni esperimento è stato condotto in triplo.

#### 5.1.4 Effetto del pH

Al fine di valutare l'effetto del CFS dei produttori sulla crescita microbica degli indicatori, sono state allestite delle prove sperimentali aggiungendo 3 mL di CFS a 3 mL di brodocoltura di ciascun ceppo indicatore. Inoltre, è stato valutato l'effetto del pH sulla crescita microbica eseguendo lo stesso esperimento con CFS neutralizzato (CFSn). Come controllo, è stata eseguita una prova aggiungendo 3 mL di MRS a 3 mL della brodocoltura di ciascun indicatore.

Le brodoculture sono state incubate per 50 h alla temperatura ottimale di crescita degli indicatori e ad intervalli di tempo regolari, un'aliquota di ciascuna brodocoltura è stata prelevata al fine di determinarne la crescita. A tale scopo è stata eseguita la lettura dell'assorbanza (OD) a 620 nm mediante un lettore di micropiastre (Multiskan FC, Thermo Scientific).

L'attività inibente è stata espressa con il seguente rapporto:

$$rCFS = \frac{OD t_{50}^{(CFS)} - OD t_0^{(CFS)}}{OD t_{50}^{(MRS)} - OD t_0^{(MRS)}} ; rCFSn = \frac{OD t_{50}^{(CFSn)} - OD t_0^{(CFSn)}}{OD t_{50}^{(MRS)} - OD t_0^{(MRS)}} ;$$

Dove  $OD_{t_{50}}$  e  $OD_{t_0}$  rappresentano i valori di assorbanza a 50 ore e a 0 ore di incubazione.

#### 5.2 Screening dell'acido fenil-lattico (PLA) prodotto dai ceppi di *Lb. plantarum*

Il PLA è stato determinato mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC). In dettaglio, le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema HPLC Thermo Scientific dotato di una pompa quaternaria e un Diode Array della serie Ultimate 3000. La separazione cromatografica è stata realizzata lavorando in isocratica con un flusso di 1 mL/min, utilizzando come fase mobile un tampone sodio fosfato 50mM (pH 6,5) e

acetonitrile (90:10), utilizzando una colonna Kinetex 5u Phenyl-hexyl 100A (250 x 4,60 mm) (Phenomenex, USA). La rivelazione è stata effettuata a 210 nm. La concentrazione di PLA nel campione è stata quantificata attraverso una curva di calibrazione, precedentemente creata mettendo in relazione le aree e le diverse concentrazioni di uno standard (L-3-Phenyllactic acid, 113069-5g) (Sigma-Aldrich Co, St.Luis, MO, USA). Tutti i campioni sono stati conservati in congelatore fino al momento dell'analisi. Prima dell'analisi, il campione è stato scongelato a temperatura ambiente e filtrato su trottolina da 0,45 µm prima di essere iniettato in colonna.

### **5.2.1. Determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) e della minima concentrazione battericida (MBC) di PLA**

Sono stati valutati i valori di MIC e MBC di PLA su cellule di *Listeria innocua*. A tale scopo, l'effetto di un intervallo di concentrazioni (tra 0,35 e 30,00 mg/mL) del composto fenolico è stato testato su *Listeria innocua* DSM20649 utilizzando il metodo *macrobroth dilution*. Nel dettaglio, l'effetto è stato valutato su cellule inoculate alla concentrazione finale di circa 5 log ufc/mL in brodo Mueller–Hinton (MHB) e incubate alla temperatura di crescita ottimale (37 °C). Come controllo è stato utilizzato un tubo di MHB senza composto fenolico e inoculato con cellule di *L. innocua* come sopra descritto. Dopo 24 ore, è stata valutata la torbidità di ciascuna coltura ad una lunghezza d'onda di 600 nm utilizzando uno spettrofotometro (Bio-spettometro di base, Eppendorf-Italia). La MIC è stata considerata la dose più bassa in cui non è stato osservato alcun aumento della densità ottica (600 nm) (CLSI, 2012). 100 µL di ogni coltura sono stati inoculati su piastre di Mueller-Hinton agar (MHA). L'MBC è stato definito come la più bassa concentrazione in grado di provocare la morte di più del 99.9% di un dato microrganismo. Gli studi sono stati condotti in triplicato.

### **5.3. Curva di crescita e curva di acidificazione del ceppo Lpla\_100**

Il ceppo *Lb. plantarum* Lpla\_100, selezionato tra i 52 ceppi produttori per la sua elevata attività antimicrobica, è stato coltivato in MRS in condizioni di pH non controllato. I campioni di brodocoltura, raccolti durante la fermentazione, sono stati utilizzati per valutare la cinetica di crescita di *Lb. plantarum* Lpla\_100. A tal proposito è stata utilizzata sia la tecnica del conteggio vitale in piastra sia la tecnica gravimetrica al fine di determinare la quantità di biomassa secca (CDW). La tecnica del conteggio vitale in

piastra, 1 mL di campione è stato diluito in soluzione fisiologica (9 g/L) e inoculato, per inclusione, in piastre Petri contenenti MRS agar (Oxoid). Le piastre sono state incubate per 48 h a 28 °C. L'analisi gravimetrica, invece, è stata effettuata mediante determinazione del peso della biomassa cellulare ottenuto dalla centrifugazione (8000 rpm per 10 min) di 10 mL di brodocoltura essiccati in stufa a 105 °C per 24h. I dati ottenuti sono stati modellati al fine di determinare i parametri cinetici della curva di crescita microbica. A tal proposito la velocità specifica di crescita massima ( $\mu_{max}$ ), la fase *lag*, i valori di crescita iniziali ( $y_0$ ) e i valori di crescita finali ( $y_{end}$ ), sono stati stimati con il D-model di Baranyi e Roberts (1994) utilizzando il software DMFit.

#### **5.4. Effetto della combinazione dello stadio di crescita e del pH sull'attività antimicrobica espressa dal ceppo Lpla\_100**

*Lb. plantarum* Lpla\_100 prima di essere impiegato è stato riattivato due volte in terreno di coltura MRS broth per 16 ore a 30°C. I ceppi indicatori impiegati nella prova di inibizione sono:

- *Clostridium butyricum* CS21, ceppo appartenente alla collezione dipartimentale (DIAAA) e associato a processi deterioranti in prodotti lattiero caseari, è stato riattivato due volte in RCM medium per 16 ore a 37°C.
- *Listeria innocua* ATCC 33090, ceppo riferibile ad una specie impiegata come surrogato della specie patogena *L. monocytogenes*, è stato riattivato due volte in terreno di coltura BHI broth per 16 ore a 37°C;
- *Pseudomonas fluorescens* DMS 50090, *Pseudomonas fragi* e *Pseudomonas putida*, ceppi appartenenti alla collezione dipartimentale (DIAAA) e associati a processi deterioranti in prodotti lattiero caseari e altri diversi alimenti, sono stati riattivati due volte in terreno di coltura BHI broth per 16 ore a 30°C.

Quattro beute con 500 mL di MRS broth a diversi valori di pH iniziale (6,00; 5,00; 4,00 e 3,50) sono state inoculate, rispettivamente, con una coltura over night del ceppo Lpla\_100. I valori di pH considerati, fanno riferimento ai valori medi riscontrabili in diverse matrici alimentari.

Sono stati valutati, in base alla cinetica di crescita di Lpla\_100 valutata in precedenza, specifici tempi di determinazione del grado d'inibizione nei confronti dei ceppi indicatori.

Tempi e pH impostati sono riportati in Tabella 5.2. Una aliquota (9 mL) di brodo per ogni tempo di campionamento è stata centrifugata a 10000 rpm per 10 minuti a 4°C in modo tale da ottenere il surnatante privo di cellule (CFS). Al surnatante diviso in tre aliquote (3mL ognuna) è stato modificato il pH, come riportato dallo schema in Tabella 5.2.

**Tabella 5.2.** Combinazione di tempi e pH di crescita di *Lb. plantarum* impostati.

pH iniziale	Tempo (ore)	pH valutato	pH iniziale	Tempo (ore)	pH valutato
6	0	tq	4	0	tq
		6			4
		4.5			4.5
	8	tq		24	tq
		6			4
		4.5			4.5
	30	tq		52	tq
		6			4
		4.5			4.5
5	0	tq	3.5	0	tq
		5			3.5
		4.5			4.5
	10	tq		30	tq
		5			3.5
		4.5			4.5
	32	tq		57	tq
		5			3.5
		4.5			4.5

#### 5.4.1. Determinazione dell'attività antimicrobica espressa dal surnatante privo di cellule

L'attività antimicrobica dei surnatanti privi di cellule (CFS) è stata determinata mediante l'agar *well diffusion assay*, come descritto in precedenza. Dopo 24-48 ore di incubazione a 28 °C, sono stati misurati gli aloni di inibizione presente sulle piastre. Gli aloni di inibizione sono stati normalizzati utilizzando la seguente formula:

$$\text{Grado di inibizione (GI)} = \frac{\text{diametro del alone di inibizione (mm)}}{\text{diametro del pozzetto (mm)}}$$

Su questa base, l'effetto antimicrobico è stato considerato basso ( $1 < \text{GI} < 3$ ), moderato ( $3 \leq \text{GI} < 5$ ), forte ( $5 \leq \text{GI} < 7$ ) e molto forte ( $7 \leq \text{GI} < 9$ ).

Sono stati usati come controllo le piastre inoculate con ciascun ceppo indicatore e senza CFS.

### **5.5. Analisi statistica**

I valori medi e le deviazioni standard sono stati determinati con il software OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Il calcolo delle somiglianze nei profili dell'attività antimicrobica dei ceppi produttori, nonché della suscettibilità antimicrobica dei ceppi indicatori, sono stati ottenuti con il software Genesis attraverso un'analisi dei cluster gerarchici basata sulla metrica della distanza euclidea e sul metodo del gruppo di coppie non ponderate utilizzando la media aritmetica (UPGMA) algoritmo di clustering. I dati sono stati mostrati in una mappa pseudo-calore con i ceppi produttori nelle righe e i ceppi indicatori nelle colonne.

## CAPITOLO VI

### RISULTATI

---

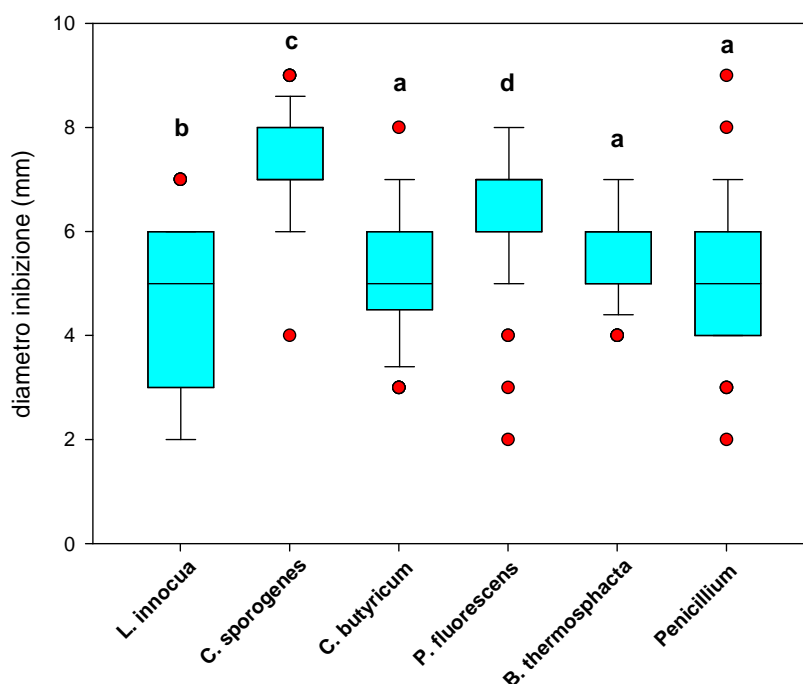
#### 6.1. Screening

Il processo di screening ha previsto l'applicazione di un approccio tale da ottimizzare il rapporto tra efficacia e dispendio in termini di sia economici sia di tempi. A tal proposito, sulla base della preliminare disamina della letteratura scientifica in merito all'importanza della scelta dei ceppi da sottoporre al processo di screening (Tremonte et al., 2017; Reis et al. 2012; Ricciardi et al., 2014; Ricciardi et al., 2012, Rumjuankiat et al., 2015), sono stati individuati ceppi di *Lb plantarum* isolati da matrici caratterizzate da proprietà chimico-fisiche nettamente differenti che spaziano da pH debolmente acidi a pH decisamente acidi quali quelli caratterizzanti il vino e il pane d'api. In aggiunta le matrici d'origine rappresentate da formaggi, vino e pane d'api si differenziano per ulteriori fattori di stress ambientale, quali il contenuto di etanolo e la presenza di soluti (bassa aw). Prendendo in considerazione tutte le variabili emerge che il pane d'api ed il vino risultano le matrici caratterizzate da una maggiore ostilità ambientale.

Viste le marcate differenze delle matrici di isolamento si è ipotizzato che i ceppi selezionati esibissero un comportamento antagonista nei confronti dei ceppi indicatori abbastanza eterogeneo. Invece, dall'analisi dei dati emerge un comportamento abbastanza omogeneo relativamente a ciascun ceppo indicatore. Indipendentemente dall'origine, la totalità dei ceppi ha fatto apprezzare una azione inibente medio alta nei confronti della totalità dei ceppi indicatori.

In figura 6.1 è riportata, per ciascun ceppo indicatore la distribuzione dei ceppi produttori in funzione della loro capacità antagonista. I ceppi riferibili alle specie *Clostridium sporogenes* e *Pseudomonas fluorescens* hanno fatto apprezzare la maggiore sensibilità e dall'analisi, mediante box plot, della distribuzione dei ceppi produttori (figura 6.1) emerge un posizionamento abbastanza ravvicinato a testimonianza di una elevata omogeneità nel comportamento. Una situazione pressoché simile è stata esibita anche nei confronti dei ceppi riferibili a *B. thermosphacta* a *C. butyricum* e a *Penicillium* spp. Appare differente solo il comportamento nei confronti di *L. innocua* nei confronti del

quale i ceppi produttori hanno fatto apprezzare una maggiore variabilità nella distribuzione.



**Figura 6.1** Distribuzione dei ceppi produttori in relazione all'attività inibente esibita nei confronti di ciascun ceppo indicatore.

## 6.2. Inibizione espressa dai metaboliti extracellulari

La situazione appena descritta appare completamente diversa se si prende in esame l'azione esplicata dal surnatante privo di cellule, sia tal quale sia sottoposto a controllo del pH fino a raggiungere 6.0. Infatti, in tal caso i ceppi produttori hanno fatto apprezzare comportamenti differenti.

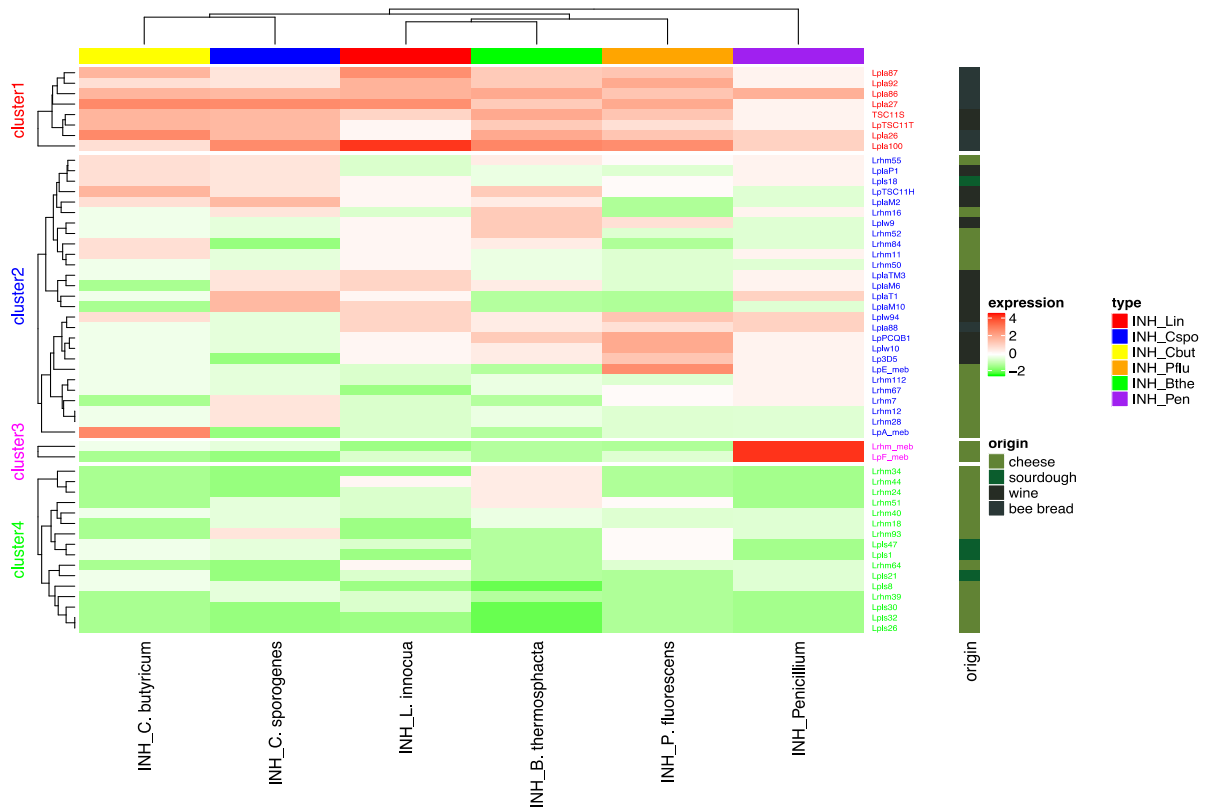
In figura 6.2, è riportata l'analisi dei dati dei clusters relativi all'azione antagonista espressa dai 52 ceppi produttori nei confronti dei sei ceppi indicatori.

Dall'analisi dei dati emerge che i ceppi produttori possono essere raggruppati in 4 differenti cluster. In dettaglio, rientrano nel cluster 1 tutti i ceppi riferibili alla specie *Lb. plantarum* e che sono stati isolati dagli ambienti ritenuti maggiormente ostili per quanto riguarda le caratteristiche ecologiche (Lee et al., 2010; Butler et al., 2013; Arena et al., 2016). L'analisi visiva della *heat-map* delinea in maniera chiara che proprio i ceppi rientranti nel cluster 1 mostrano una maggiore attività antagonista sia per quanto concerne l'attività sia per lo spettro di azione. Di particolare interesse è l'azione esplicata dal ceppo

Lpla\_100 che oltre ad esibire un ampio spettro di azione ha mostrato una intensa attività inibente nei confronti del ceppo indicatore *L. innocua*. Risultato di particolare interesse se si considera che l'inibizione di *Listeria* attraverso approcci bioprotettivi è uno dei principali obiettivi a cui tendono le aziende biotecnologiche.

La maggior parte dei ceppi isolati da formaggio rientrano, nel cluster 3 e nel cluster 4 caratterizzati dai colori che evidenziano una bassa o nulla attività inibente. Tuttavia, i due ceppi che compongono il cluster 3 si contraddistinguono per una buona azione antagonista nei confronti del ceppo indicatore riferibile alla specie *Penicillium spp.*

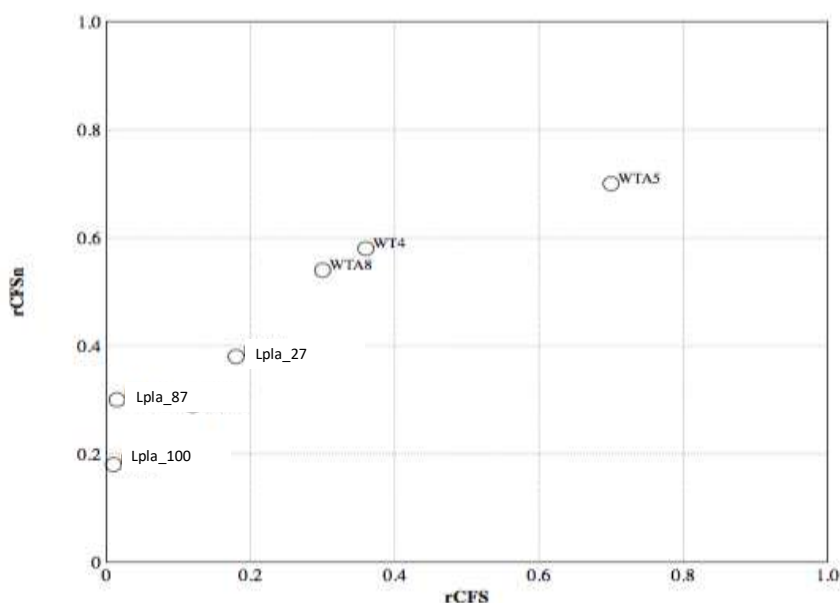
**Figura 6.2** *Pseudo heat-map* relativa all'analisi dei clusters dell'attività inibente espressa da 52 ceppi produttori nei confronti di 6 ceppi indicatori.



Il cluster 2 raggruppa ceppi di differente origine, i ceppi raggruppati in tale cluster si contraddistinguono per l'espletamento di una azione inibente di medio bassa intensità ma comunque caratterizzata da specificità di maggiore interesse nei confronti di alcuni ceppi. È il caso dei ceppi LpA\_meb ed LpE\_meb protagonisti di una buona azione inibente nei confronti dei ceppi *C. butyricum* e *P. fluorescens*. L'azione antimicrobica di maggiore

interesse permane anche qualora il surnatante privo di cellule sia stato neutralizzato con NaOH nonché addizionato di catalasi.

Nella figura 6.3 sono riportati i dati relativi all'azione inibente espressa dal surnatante neutralizzato rispetto a quello neutralizzato addizionato di catalasi e sottoposto al trattamento termico. Il posizionamento dei punti, relativi ai differenti ceppi, in prossimità della diagonale del quadrante dimostra che l'effetto permane, questo risultato evidenzia che l'azione inibente non è legata al pH del mezzo, né è dovuta ad un metabolita termolabile di natura proteica (ad esempio batteriocine) o al perossido di idrogeno. Ma, come riportato da alcuni autori, l'azione antimicrobica espressa da ceppi di lattobacilli potrebbe essere imputata ad uno o più metaboliti di natura non proteica.

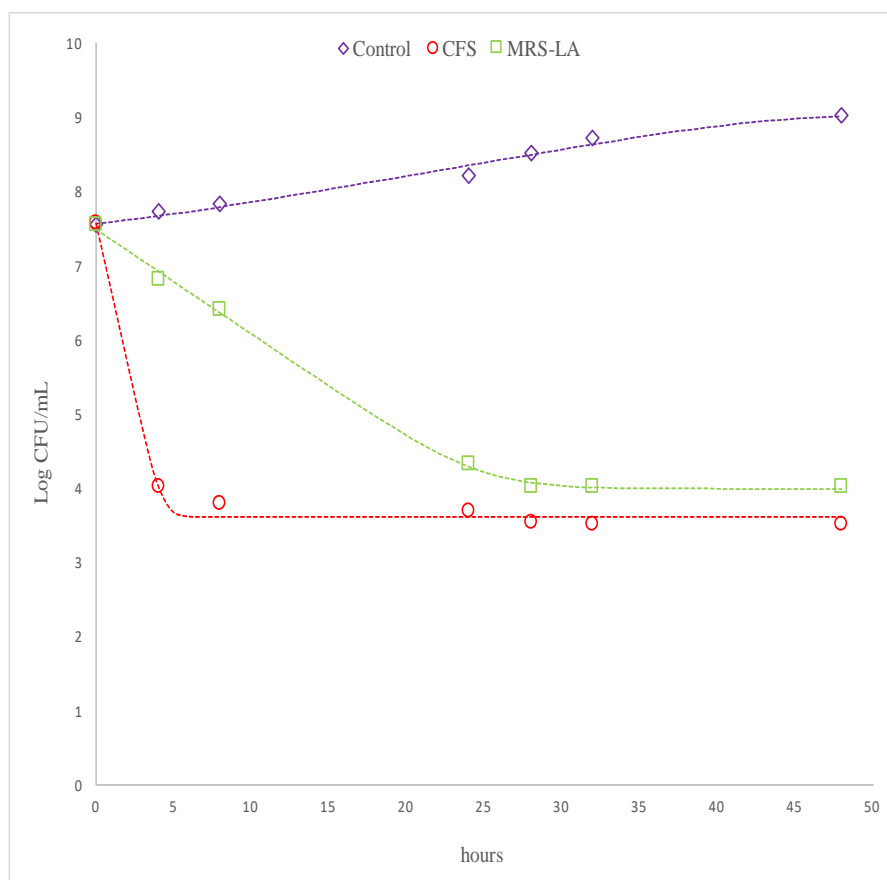


**Figura 6.3** Effetto del CFS e del CFSn sulla crescita microbica di ceppi di *Lb. plantarum*

L'acido fenil lattico potrebbe essere la sostanza ad attività antimicrobica presente nel surnatante dei ceppi produttori. Per verificare tale ipotesi, tale composto è stato ricercato, mediante analisi HPLC, nel surnatante di otto ceppi produttori, due per cluster. I risultati ottenuti hanno evidenziato una relazione tra l'intensità dell'attività antimicrobica ed il livello di acido fenil lattico.

La figura 6.4 mostra la sopravvivenza di *L. innocua* in presenza di CFS (surnatante filtrato) di brodocolture di *Lb. plantarum* Lpla\_100 e di acido lattico. Come previsto, *L.*

*innocua* ha mostrato nella tesi di controllo (Control) uno sviluppo costante nel tempo con un tasso di crescita specifico massimo di  $0,04 \text{ h}^{-1}$  (Tabella 6.1). Mentre, è stata osservata una forte riduzione quando il CFS o l'acido lattico sono stati aggiunti alla brodocoltura di *L. innocua*. Tuttavia, sono state osservate differenze significative anche tra queste due tesi. Il CFS da *Lb. plantarum* Lpla\_100 ha prodotto una riduzione di *L. innocua* di circa  $4,0 \text{ Log ufc/ mL}$  già dopo 4 ore di incubazione con un tasso di mortalità specifico di  $-0,93 \text{ h}^{-1}$ . In presenza di acido lattico (tesi MRS-LA), *L. innocua* ha subito una riduzione di  $3,5 \text{ Log ufc/mL}$  solo dopo 24 ore di incubazione con valori molto bassi di mortalità specifica massima ( $\mu_{\text{max}}$  di circa  $-0,14 \text{ h}^{-1}$ ).



**Figura 6.4** Sopravvivenza di *L. innocua* in presenza di surnatante privo di cellule (CFS) da *Lb. plantarum* Lpla\_100, in presenza di MRS acidificato con acido lattico (MRS-LA) e in presenza di MRS (controllo). I simboli rappresentano i dati sperimentali e le curve rappresentano il modello D-Model.

Questo valore era significativamente inferiore a quello registrato in presenza di CFS ( $-0,93 \text{ h}^{-1}$ ). Questi dati hanno evidenziato che l'effetto inibitorio del CFS di *Lb. plantarum* Lpla\_100 contro *L. innocua* era dovuto alla presenza sinergica di più di una sostanza inibitoria e non solo all'acido lattico che era presente anche nella tesi MRS-LA.

Probabilmente l'acido lattico prodotto da *Lb. plantarum* Lpla\_100 interagisce sinergicamente con altri composti del metabolismo del LAB aumentando così l'attività inibente espressa da questo ceppo nei confronti di *L. innocua*.

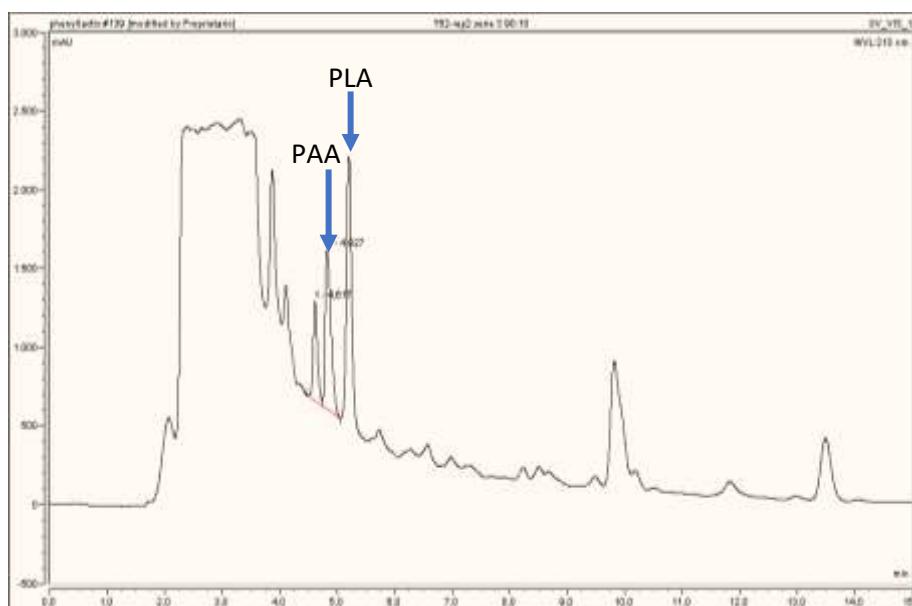
**Tabella 6.1** Parametri cinetici di sopravvivenza di *L. innocua* in presenza CFS da *Lb. plantarum* Lpla\_100, in presenza di MRS acidificato con acido lattico (MRS-LA) e in presenza di MRS (controllo).

	<b>y<sub>0</sub></b> (Log CFU/mL)	<b>y<sub>end</sub></b> (Log CFU/mL)	$\infty_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	<b>R-square</b>	<b>SE of Fit</b>
<b>Control</b>	7.6 ± 0.1a	9.1 ± 0.2a	0.04 ± 0.01a	0.968	0.099
<b>CFS</b>	7.6 ± 0.1a	3.6 ± 0.1b	0.93 ± 0.06b	0.993	0.121
<b>MRS-LA</b>	7.5 ± 0.1a	4.0 ± 0.1b	0.14 ± 0.01c	0.998	0.077

Nelle tesi CFS e MRS-LA è stato determinato l'acido lattico. Anche se CFS e MRS-LA erano caratterizzati dagli stessi valori di pH, i risultati hanno evidenziato che la concentrazione di lattico era superiore in MRS-LA. Pertanto, oltre all'acido lattico, nella tesi CFS erano presenti altri composti di natura acida.

Si è ipotizzato quindi, che l'attività antimicrobica espressa dal CFS di *Lb. plantarum* Lpla\_100 fosse attribuibile principalmente al PLA. L'acido fenilattico (PLA) è un acido fenolico, generalmente prodotto dal fenilpiruvato attraverso l'azione della lattato-deidrogenasi, che, negli ultimi anni, ha destato grande attenzione da parte dei ricercatori grazie alle sue proprietà antimicrobiche. Infatti, il PLA ha mostrato un'attività antimicrobica con un ampio spettro sia contro i lieviti, *Candida* spp. e *Rhodotorula* spp., sia contro le muffe *Aspergillus* e *Penicillium* (Valerio et al., 2004; Prema et al., 2010); sia nei confronti dei batteri (Ning et al., 2017; Sorrentino et al., 2018).

L'analisi all'HPLC (figura 6.5) del CFS *Lb. plantarum* H\_BB1 ha evidenziato non solo la presenza di livelli significativi di PLA pari a 129.93 mg/mL, ma anche la presenza di acido fenil acetico (PAA) con livelli nettamente inferiori. La quantità di PAA riscontrata nel CFS di *Lb. plantarum* Lpla\_100 è risultata di 62.43 mg/mL.



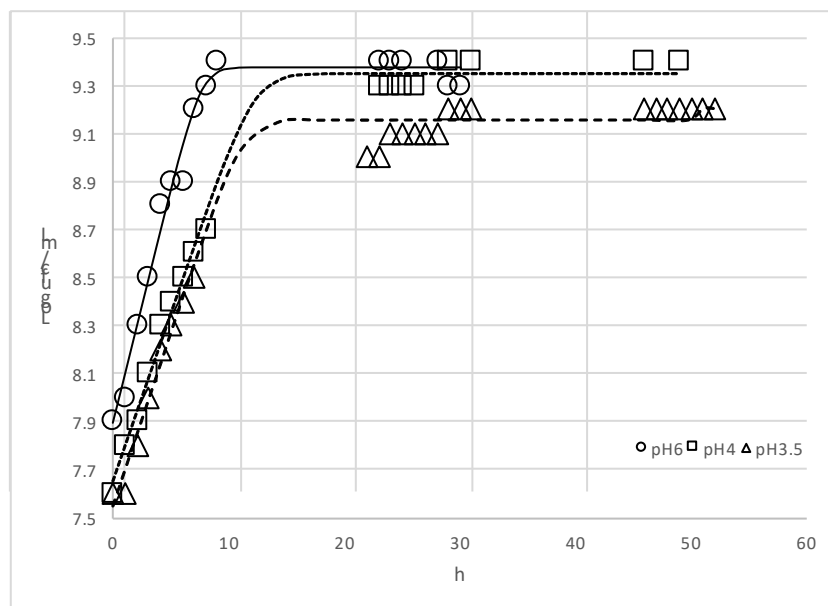
**Figura 6.5** Cromatogramma ottenuto dall'analisi all'HPLC del CFS (surnatante filtrato di brodocoltura *Lb. plantarum* Lpla\_100).

Quindi attraverso il presente lavoro di tesi è emerso che il ceppo *Lb. plantarum* Lpla\_100 non solo ha prodotto PLA ma anche un altro acido fenolico: l'acido fenil-acetico (PAA), metabolita di cui ancora non è noto il meccanismo di azione e poco si conosce anche relativamente alla sua attività antimicrobica.

### **6.3. Effetto della fase di crescita e del pH di coltivazione sull'accumulo di sostanze antimicrobiche**

Sono stati allestiti tre esperimenti al fine di coltivare il ceppo *Lb. plantarum* Lpla\_100 in MRS broth alla temperatura di 28°C a pH 6,0; 4,0 e 3,5.

Nella figura 6.6 sono riportate le cinetiche di crescita di *Lb. plantarum* Lpla\_100 coltivato in MRS broth ai differenti pH e in Tabella 6.2 i relativi parametri cinetici di crescita. La coltivazione a pH 6 ha fatto apprezzare la più elevata velocità di crescita con un accumulo finale di cellule pari a circa 9,4 log ufc/mL. Le coltivazioni a pH 4,0 e 3,5 sono state caratterizzate da velocità di crescita inferiori. Tuttavia, il livello di accumulo finale di cellule registrato nelle condizioni di pH 4,0 appariva sostanzialmente simile rispetto a quello registrato in condizioni di pH 6,0.

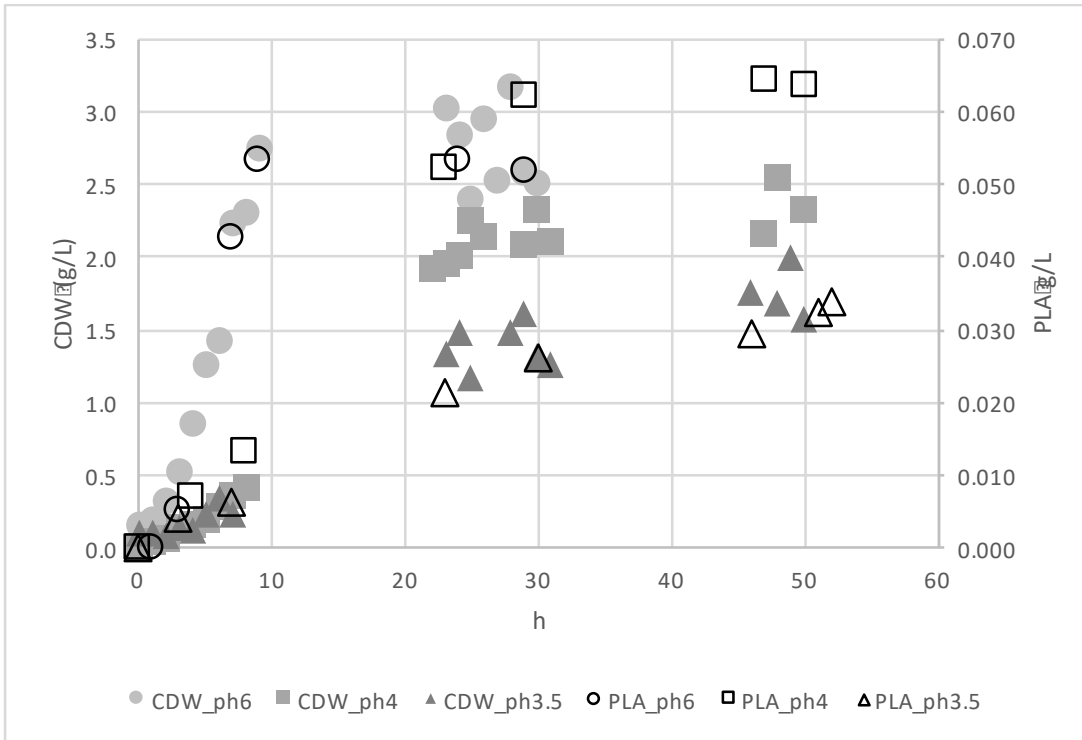


**Figura 6.6** Cinetiche di crescita di *Lb. plantarum* Lpla\_100 coltivato in MRS broth a pH 6.0, pH 4.0 o pH 3.5. I simboli rappresentano i dati sperimentali e le linee rappresentano il D-Model.

**Tabella 6.2.** Parametri cinetici relativi alle curve di crescita di *Lb. plantarum* Lpla\_100 coltivato in MRS broth a pH6, pH 4 o pH 3.5.

curve	rate	lag	y0	yEnd	se(fit)	R <sup>2</sup> _stat
PH6	0.19	nd	7.9	9.4	0.070	0.982
PH4	0.14	nd	7.7	9.3	0.053	0.993
PH3.5	0.14	nd	7.5	9.2	0.068	0.985

Differenze di interesse, in funzioni del pH di coltivazione, sono state registrate relativamente all'accumulo di acido fenil lattico (Figura 6.7). In particolare, la condizione di coltivazione a pH 4.0 ha fatto registrare il maggior livello di accumulo. Proprio dall'analisi della cinetica di accumulo è possibile ritenere che la produzione di acido fenil lattico (implicato nei fenomeni di antagonismo da parte del ceppo di interesse) sia legato al metabolismo energetico e la sua produzione aumenta in risposta a condizioni di pH sub-ottimali.



**Figura 6.7.** Evoluzione della biomassa (CDW) cellulare secca (simboli pieni) di *Lb. plantarum* Lpla\_100 e del PLA (simboli vuoti) durante la fermentazione in batch in MRS broth a pH 6, pH 4 o pH 3.5.

#### 6.4. Effetto della fase di crescita e del pH di coltivazione sull'espressione dell'attività antagonista

Il ceppo di interesse per la sua attività antagonista è stato coltivato in differenti condizioni di pH e, ad intervalli di tempo differenti nel corso della sua crescita, il suo surnatante libero di cellule (tal quale o dopo correzione di pH) è stato valutato per la sua attività antimicrobica. Dai dati ottenuti emerge che il surnatante ottenuto dalla coltivazione del ceppo esplica una attività antagonista nei confronti sia di *Listeria innocua* sia delle specie riferibili a *Pseudomonas*.

**Tabella 6.3.** Effetto della combinazione tra fase di crescita, pH di coltivazione e pH di utilizzo sull'attività inibente espressa da Lpla\_100 nei confronti di *Listeria innocua*

tempo	pH					
	6	5,5	5	4,5	4	3,5
0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	2	2	3
36	0	0	0	2	3	4
56	0	0	0	3	3	5

**Tabella 6.4.** Effetto della combinazione tra fase di crescita, pH di coltivazione e pH di utilizzo sull'attività inibente espressa da Lpla\_100 nei confronti di *Pseudomonas spp.*

tempo	pH					
	6	5,5	5	4,5	4	3,5
0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	1	2	2
36	0	0	0	2	3	4
56	0	0	0	3	3	5

Dall'esame dei dati riportati nelle tabelle 6.3 e 6.4 è possibile apprezzare che l'attività antimicrobica è direttamente collegata al tempo della coltura e dipendente dal pH.

Dunque, l'attività antimicrobica assume livelli di interesse al raggiungimento della fase stazionaria da parte delle colture e la sua azione è significativa in un range di pH compreso tra 3,5 e 4,5.

## CAPITOLO VII

### CONCLUSIONI

---

I risultati ottenuti nel presente studio di tesi hanno evidenziato che ceppi isolati da ambienti caratterizzati da condizioni maggiormente ostili sono contraddistinti da una più spiccata attività antimicrobica. Azione che sembra essere correlata alla capacità di produrre acido fenil-lattico che pur essendo un metabolita principale, il suo accumulo è maggiormente pronunciato in condizioni di crescita sub-ottimali. Accumulo che nelle condizioni di acidità subottimale è accompagnato anche dalla produzione dell'acido fenil-acetico.

Il surnatante libero di cellule e contenente i due metaboliti innanzi descritti esplica la sua attività antimicrobica quando utilizzato in condizioni di pH uguali o inferiori a 4.5.

Dunque, l'azione inibente esplicata dal ceppo può avere un ruolo protettivo in alimenti caratterizzati da pH tendenzialmente acidi ed, in particolare, inferiori a 5,0.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Abedfar, A., Hosseini-zhad, M., & Corsetti, A. (2019). Effect of wheat bran sourdough with exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* (NR\_104573.1) on quality of pan bread during shelf life. *LWT*, *111*, 158-166.

Abedfar, A., Hosseini-zhad, M., Sadeghi, A., Raeisi, M., & Feizy, J. (2018). Investigation on “spontaneous fermentation” and the productivity of microbial exopolysaccharides by *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* isolated from wheat bran sourdough. *LWT*, *96*, 686-693.

Ahmad Rather, I., Seo, B. J., Rejish Kumar, V. J., Choi, U.-H., Choi, K.-H., Lim, J. H., & Park, Y.-H. (2013). Isolation and characterization of a proteinaceous antifungal compound from *Lactobacillus plantarum* YML007 and its application as a food preservative. *Letters in Applied Microbiology*, *57*(1), 69-76.

Angiolillo, L., Conte, A., Zambrini, A. V., & Del Nobile, M. A. (2014). Biopreservation of fior di latte cheese. *Journal of Dairy Science*, *97*(9), 5345-5355.

Arena, M. P., Silvain, A., Normanno, G., Grieco, F., Drider, D., Spano, G., & Fiocco, D. (2016). Use of lactobacillus plantarum strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. *Frontiers in Microbiology*, *7*(APR).

Aljasir, S. F., Gensler, C., Sun, L., & D'Amico, D. J. (2020). The efficacy of individual and combined commercial protective cultures against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, O157 and non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in growth medium and raw milk. *Food Control*, *109*.

Al-Nabulsi, A. A., & Holley, R. A. (2005). Effect of bovine lactoferrin against *Carnobacterium viridans*. *Food Microbiology*, *22*(2-3), 179-187.  
doi:10.1016/j.fm.2004.06.001

Alakomi, H. L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K., & Helander, I. M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and environmental microbiology*, 66(5), 2001–2005.

Anonau, S. (2017). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. A. Méndez-Vilas (Ed.), *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (pp. 475-486).

Ares-Yebra, A., Garabal, J. I., Carballo, J., & Centeno, J. A. (2019). Formation of conjugated linoleic acid by a *Lactobacillus plantarum* strain isolated from an artisanal cheese: Evaluation in miniature cheeses. *International Dairy Journal*, 90, 98-103.

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Delgado, D., Gaya, P., & Garde, S. (2017). Industrial-scale application of *Lactobacillus reuteri* coupled with glycerol as a biopreservation system for inhibiting *Clostridium tyrobutyricum* in semi-hard ewe milk cheese. *Food Microbiology*, 66, 104-109.

Ávila, M., Gómez-Torres, N., Hernández, M., & Garde, S. (2014). Inhibitory activity of reuterin, nisin, lysozyme and nitrite against vegetative cells and spores of dairy-related *Clostridium* species. *International Journal of Food Microbiology*, 172, 70-75.

Bassi, D., Puglisi, E., & Cocconcelli, P. S. (2015). Understanding the bacterial communities of hard cheese with blowing defect. *Food Microbiology*, 52, 106-118.

Behera, S. S., Ray, R. C., & Zdolec, N. (2018). *Lactobacillus plantarum* with Functional Properties: An Approach to Increase Safety and Shelf-Life of Fermented Foods. *BioMed research international*, 2018, 9361614.

Benito, M.J., Martín, A., Aranda, E., Pérez-Nevado, F., Ruiz-Moyano, S., & Córdoba, M.G. (2007). Characterization and selection of autochthonous lactic acid bacteria isolated from traditional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo sausages. *Journal of Food Science*, 72 (6), M193-M201.

Bergamini, C. V., Peralta, G. H., Milesi, M. M., & Hynes, E. R. (2013). Growth, survival, and peptidolytic activity of *Lactobacillus plantarum* I91 in a hard-cheese model. *Journal of Dairy Science*, *96*(9), 5465-5476.

Breukink, E., Wiedemann, I., Van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H.-G., & De Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, *286*(5448), 2361-2364.

Butler, È., Alsterfjord, M., Olofsson, T. C., Karlsson, C., Malmström, J., & Vásquez, A. (2013). Proteins of novel lactic acid bacteria from *Apis mellifera mellifera*: An insight into the production of known extra-cellular proteins during microbial stress. *BMC Microbiology*, *13*(1)

Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J., & Heyndrickx, M. (2016). Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. isolated from different foods. *Food Microbiology*, *54*, 142-153.

Cheong, E. Y. L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T. T., Nhiep, N. T., My Ho, H. T., Bansal, N., & Turner, M. S. (2014). Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control*, *46*, 91-97.

Chung, T. C., Axelsson, L., Lindgren, S. E., & Dobrogosz, W. J. (1989). In vitro studies on reuterin synthesis by *Lactobacillus reuteri*. *Microbial Ecology in Health and Disease*, *2*(2), 137-144.

Collins, J.W., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., & Searle, L.E.J. (2009). Application of Prebiotics and Probiotics in Livestock. In: Prebiotics and Probiotics Science and Technology, D. Charalam popoulos, R.A. Rastall (Eds.), Springer Science+Business 35. Media B.V., New York, NY, USA pp. 1123–1192.

Cosentino, S., Viale, S., Deplano, M., Fadda, M. E., & Pisano, M. B. (2018). Application of Autochthonous *Lactobacillus* Strains as Biopreservatives to Control Fungal Spoilage in Caciotta Cheese. *BioMed Research International*, vol. 2018.

Coppola, R., Succi, M., Sorrentino, E., Iorizzo, M., & Grazia, L. (2003). Survey of lactic acid bacteria during the ripening of caciocavallo cheese produced in molise. *Lait*, 83(3), 211-222.

Coppola, R., Giagnacovo, B., Iorizzo, M. and Grazia, L. (1998). Characterization of lactobacilli involved in the ripening of soppressata molisana, a typical southern Italy fermented sausage. *Food Microbiology*, 15(3), 347-353.

Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Food microbiology: Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10), 777-788.

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., & Oliveira, R. P. D. S. (2014). Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. *Food Research International*, 64, 527-536.

Datta, N., & Deeth, H. C. (2001). Age gelation of UHT milk - A review. *Food and Bioproducts Processing: Transactions of the Institution of Chemical Engineers, Part C*, 79(4), 197-210.

Daechel M.A. (1989): Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*, 43, 164-167.

Denev, S., G. Beev, Dinev, T., Moutafchieva, R., & Georgieva, T. (2015). Health benefits of functional probiotic cultures. In: Scientific Symposium Beneficial and Pathogenic Microbes for Healthier Life and Safety Foods (Abstracts), Sofia, Bulgaria, United Scientific Group, Sofia, p. 1.

del Olmo, A., Calzada, J., & Nuñez, M. (2018). The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 86, 359-366.

Desai, A. N., Anyoha, A., Madoff, L. C., & Lassmann, B. (2019). Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases*, 84, 48-53.

Di Luccia A., Tremonte P., Trani A., Loizzo P., La Gatta B., Succi M., Sorrentino E., Coppola R. (2016). Influence of starter cultures and KCl on some biochemical, microbiological and sensory features of soppressata molisana, an Italian fermented sausage. *European Food Research and Technology*, 242(6), 855-867.

D'Incecco, P., Faoro, F., Silveti, T., Schrader, K., & Pellegrino, L. (2015). Mechanisms of *Clostridium tyrobutyricum* removal through natural creaming of milk: A microscopy study. *Journal of Dairy Science*, 98(8), 5164-5172.

Dinev, T., Beev, G., Tzanova, M., Denev, S., Dermendzhieva, D., & Stoyanova, A. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* against pathogenic and food spoilage microorganisms: a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 21(3), 253-268.

Fadaei, V. (2012). Milk proteins-derived antibacterial peptides as novel functional food ingredients. *Ann.Biol.Res.*, 3(5), 2520-2526.

FDA, (1998) FDA Direct food substances affirmed as generally recognized as safe: egg white lysozyme. *Federal Register*, 63 (4) (1998), pp. 12421-12426

Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2002). Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition*, 88(SUPPL. 1), S39-S49.

Fontana, C., Cocconcelli, P. S., & Vignolo, G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 103(2), 131-142.

Franciosa, I., Alessandria, V., Dolci, P., Rantsiou, K., & Cocolin, L. (2018). Sausage fermentation and starter cultures in the era of molecular biology methods. *International Journal of Food Microbiology*, 279, 26-32.

Gaggia, F., Di Gioia, D., Baffoni, L., & Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science and Technology*, 22(SUPPL. 1), S58-S66.

García, P., Rodríguez, L., Rodríguez, A., & Martínez, B. (2010). Food biopreservation: Promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*, 21(8), 373-382.

Garde, S., Ávila, M., Gómez, N., & Nuñez, M. (2013). *Clostridium* in late blowing defect of cheese: Detection, prevalence, effects and control strategies. *Handbook on cheese: Production, chemistry and sensory properties*. pp. 503-518

Gómez-Torres, N., Garde, S., Peiroten, A., & Ávila, M. (2015). Impact of *Clostridium* spp. on cheese characteristics: Microbiology, color, formation of volatile compounds and off-flavors. *Food Control*, 56, 186-194.

Gong, H. S., Meng, X. C., & Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from "jiaohe", a traditional fermented cream from china. *Food Control*, 21(1), 89-96.

Goswami, R. P., Jayaprakasha, G. K., Shetty, K., & Patil, B. S. (2018). *Lactobacillus plantarum* and natural fermentation-mediated biotransformation of flavor and aromatic compounds in horse gram sprouts. *Process Biochemistry*, 66, 7-18.

Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412-429.

Hamid abadi Sherahi, M., Shahidi, F., Yazdi, F. T., & Hashemi, S. M. B. (2018). Effect of *Lactobacillus plantarum* on olive and olive oil quality during fermentation process. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 572-580.

Hiatt, K. L. (2010). Tracing pathogens in poultry and egg production and at the abattoir. *Tracing pathogens in the food chain*. pp. 465-502.

Jyoti, B., Suresh, A.K., & Venkatesh, K.V. (2003): Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 19, 509–515.

Katina, K., Sauri, M., Alakomi, H.L., & Mattila-Sandholm, T. (2002) Potential of Acid Bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1629-1634.

Kavitha, S., Harikrishnan, A., & Jeevaratnam, K. (2019). Characterization and evaluation of antibacterial efficacy of a novel antibiotic-type compound from a probiotic strain *Lactobacillus plantarum* KJB23 against food-borne pathogens. *LWT*.

Kleerebezem, M., Boekhorst, J., Van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O. P., Leer, R., . . . Siezen, R. J. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1990-1995.

Klijn, N., Nieuwenhof, F. F. J., Hoolwerf, J. D., Van der Waals, C. B., & Weerkamp, A. H. (1995). Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), 2919-2924.

Lee, H. I., Kim, M. H., Kim, K. Y., & So, J. S. (2010). Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe*, 16(5), 522-526.

Lee, K. W., Shim, J. M., Park, S. -, Heo, H. -, Kim, H. -, Ham, K. -, & Kim, J. H. (2016). Isolation of lactic acid bacteria with probiotic potentials from kimchi, traditional korean fermented vegetable. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 130-137.

- Li, C., Song, J., Kwok, L. -, Wang, J., Dong, Y., Yu, H., . . . Chen, Y. (2017). Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during postfermentation storage. *Journal of Dairy Science*, *100*(4), 2512-2525.
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Uluko, H., Cui, W., & Lv, J. (2013). Potential use of *Lactobacillus casei* AST18 as a bioprotective culture in yogurt. *Food Control*, *34*(2), 675-680.
- Lindgren, S.E., & Dobrogosz, W.J. (1990): Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*, *87*,149-164.
- Liu, F., Wang, F., Du, L., Zhao, T., Doyle, M. P., Wang, D., Zhang, X., Sun, Z., & Xu, W. (2018). Antibacterial and antibiofilm activity of phenyllactic acid against *Enterobacter cloacae*. *Food Control*, *84*, 442-448.
- Lucera, A., Costa, C., Conte, A., & Del Nobile, M. A. (2012). Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in microbiology*, *3*, 287.
- Messen, W., & De Vuyst, L. (2002) Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs a review. *International Journal Food Microbiology*, *72*,31-43.
- Moon, N. J. (1983). Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate, lactate and propionate and their synergistic mixtures. *Journal of Applied Bacteriology*, *55*(3), 453-460.
- Moraes, P. M., Perin, L. M., Tassinari Ortolani, M. B., Yamazi, A. K., Viçosa, G. N., & Nero, L. A. (2010). Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Science and Technology*, *43*(9), 1320-1324.
- Morandi, S., Silvetti, T., Battelli, G., & Brasca, M. (2019). Can lactic acid bacteria be an efficient tool for controlling *Listeria monocytogenes* contamination on cheese surface? the case of gorgonzola cheese. *Food Control*, *96*, 499-507.

Mu, W., Yu, S., Zhu, L., Zhang, T., & Jiang, B. (2012). Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5), 1155-1163.

Mun, S. Y., Kim, S. K., Woo, E. R., & Chang, H. C. (2019). Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum* EM showing both antifungal and antibacterial activities. *LWT*, 114.

Murdock, C. A., Cleveland, J., Matthews, K. R., & Chikindas, M. L. (2007). The synergistic effect of nisin and lactoferrin on the inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 44(3), 255-261.

Nami, Y., Vaseghi Bakhshayesh, R., Manafi, M., & Hejazi, M. A. (2019). Hypocholesterolaemic activity of a novel autochthonous potential probiotic *Lactobacillus plantarum* YS5 isolated from yogurt. *LWT*, 111, 876-882.

Ning, Y., Yan, A., Yang, K., Wang, Z., Li, X., & Jia, Y. (2017). Antibacterial activity of phenyllactic acid against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by dual mechanisms. *Food Chemistry*, 228, 533-540.

Nikodinoska, I., Baffoni, L., Di Gioia, D., Manso, B., García-Sánchez, L., Melero, B., & Rovira, J. (2019). Protective cultures against foodborne pathogens in a nitrite reduced fermented meat product. *LWT*, 101, 293-299.

Pehrson, M. E. S. F., I. M. Mancilha & C. A. S. Pereira, (2015). Antimicrobial activity of probiotic *Lactobacillus* strains towards gram-negative enteropathogens. *European International Journal of Science and Technology*, 4, 136-149.

Pérez-Díaz, I. M., Hayes, J., Medina, E., Anekella, K., Daughtry, K., Dieck, S., Levi, R., Price, R., Butz, N., Lu, Z., & Azcarate-Peril, M. A. (2017). Reassessment of the succession of lactic acid bacteria in commercial cucumber fermentations and physiological and genomic features associated with their dominance. *Food Microbiology*, 63, 217-227.

Pepe, O., Blaiotta, G., Anastasio, M., Moschetti, G., Ercolini, D., & Villani, F. (2004). Technological and molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(4), 443-453.

Prado, N., Sampayo, M., González, P., Lombó, F., & Díaz, J. (2019). Physicochemical, sensory and microbiological characterization of asturian chorizo, a traditional fermented sausage manufactured in northern Spain. *Meat Science*, 156, 118-124.

Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., & Immanuel, G. (2010). Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3).

Reale, A., Di Renzo, T., Succi, M., Tremonte, P., Coppola, R., & Sorrentino, E. (2011). Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(2), 237-244.

Reale, A., Tremonte, P., Succi, M., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2005). Exploration of lactic acid bacteria ecosystem of sourdoughs from the Molise region. *Annals of Microbiology*, 55(1), 17-22.

Reid G. (2008): Probiotic lactobacilli for urogenital health in women. *Journal Clinical Gastroenterology (Suppl. 3)*, 42, 234–236.

Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: Characteristics and applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124-140.

Ribeiro, S. C., Stanton, C., Yang, B., Ross, R. P., & Silva, C. C. G. (2018). Conjugated linoleic acid production and probiotic assessment of *Lactobacillus plantarum* isolated from Pico cheese. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 403-411.

Ricciardi, A., Blaiotta, G., Di Cerbo, A., Succi, M., & Aponte, M. (2014). Behaviour of lactic acid bacteria populations in Pecorino di Carmasciano cheese samples submitted to

environmental conditions prevailing in the gastrointestinal tract: Evaluation by means of a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 179, 64-71.

Ricciardi, A., Parente, E., Guidone, A., Ianniello, R. G., Zotta, T., Sayem, S. M. A., & Varcamonti, M. (2012). Genotypic diversity of stress response in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paraplantarum* and *Lactobacillus pentosus*. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 278-285.

Rossi, C., Serio, A., Chaves-López, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Goffredo, E., Cenci-Goga, B. T., Lista, F., Fillo, S., & Paparella, A. (2018). Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. *Food Control*, 86, 241-248.

Rumjuankiat, K., Perez, R. H., Pilasombut, K., Keawsompong, S., Zendo, T., Sonomoto, K., & Nitisinprasert, S. (2015). Purification and characterization of a novel plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(6), 983-994.

Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. (2017). *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, 247, 48-54.

Ryser, E. T. (2011). Pathogens in milk: *Listeria monocytogenes*. *Encyclopedia of dairy sciences: Second edition*. pp. 81-86.

Sangmanee, P., & Hongpattarakere, T. (2014). Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*, 40(1), 224-233.

Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1-3), 70-78.

Sedaghat, H., Eskandari, M. H., Moosavi-Nasab, M., & Shekarforoush, S. S. (2016). Application of non-starter lactic acid bacteria as biopreservative agents to control fungal spoilage of fresh cheese. *International Dairy Journal*, 56, 87-91.

Sidira, M., Santarmaki, V., Kiourtzidis, M., Argyri, A. A., Papadopoulou, O. S., Chorianopoulos, N., Tassou, C., Kaloutsas, S., Galanis, A., & Kourkoutas, Y. (2017). Evaluation of immobilized *Lactobacillus plantarum* 2035 on whey protein as adjunct probiotic culture in yoghurt production. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 137-146.

Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 138-146.

Singh V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation - a review. *Open veterinary journal*, 8(1), 104–111.

Sorrentino, E., Tremonte, P., Succi, M., Iorizzo, M., Pannella, G., Lombardi, S. J., Sturcchio, M., & Coppola, R. (2018). Detection of antilisterial activity of 3-phenyllactic acid using *Listeria innocua* as a model. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN).

Skariyachan, S., & Govindarajan, S. (2019). Biopreservation potential of antimicrobial protein producing *Pediococcus* spp. towards selected food samples in comparison with chemical preservatives. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 189-196.

Stiles, M. E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 70(2-4), 331-345.

Succi, M., Pannella, G., Tremonte, P., Tipaldi, L., Coppola, R., Iorizzo, M., Lombardi, S.J., & Sorrentino, E. (2017). Sub-optimal pH preadaptation improves the survival of *Lactobacillus plantarum* strains and the malic acid consumption in wine-like medium. *Frontiers in Microbiology*, 8, 470.

Sun, S. Y., Gong, H. S., Liu, W. L., & Jin, C. W. (2016). Application and validation of autochthonous *Lactobacillus plantarum* starter cultures for controlled malolactic

fermentation and its influence on the aromatic profile of cherry wines. *Food Microbiology*, 55, 16-24.

Sweis, I. E., & Cressey, B. C. (2018). Potential role of the common food additive manufactured citric acid in eliciting significant inflammatory reactions contributing to serious disease states: A series of four case reports. *Toxicology Reports*, 5, 808-812.

Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., & Dobrogosz, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(12), 1854-1858.

Testa B., Lombardi S.J., Tremonte P., Succi M., Tipaldi L., Pannella G., Sorrentino E., Iorizzo M., Coppola R. (2014). Biodiversity of *Lactobacillus plantarum* from traditional Italian wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30 (8), 2299-2305.

Todorov, S. D., Ho, P., Vaz-Velho, M., & Dicks, L. M. T. (2010). Characterization of bacteriocins produced by two strains of *Lactobacillus plantarum* isolated from beloura and chouriço, traditional pork products from portugal. *Meat Science*, 84(3), 334-343.

Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J. M., Ivanova, I., & Dousset, X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*, 48(3), 167-177.

Tran, K. T. M., May, B. K., Smooker, P. M., Van, T. T. H., & Coloe, P. J. (2011). Distribution and genetic diversity of lactic acid bacteria from traditional fermented sausage. *Food Research International*, 44(1), 338-344.

Tremonte, P., Pannella, G., Succi, M., Tipaldi, L., Sturchio, M., Coppola, R., Luongo, D., & Sorrentino, E. (2017). Antimicrobial activity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from different environments: a preliminary study. *International Food Research Journal*, 24(2): 852-859

Tremonte, P., Reale, A., Di Renzo, T., Tipaldi, L., Di Luccia, A., Coppola, R., . . . Succi, M. (2010). Interactions between *Lactobacillus sakei* and CNC (*Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians*) and their influence on proteolytic activity. *Letters in Applied Microbiology*, *51*(5), 586-594.

Tremonte, P., Sorrentino, E., Succi, M., Tipaldi, L., Pannella, G., Ibañez, E., Mendiola, J.A., Di Renzo, T., Reale, A., & Coppola, R. (2016). Antimicrobial effect of *Malpighia puniceifolia* and extension of water buffalo steak shelf-life. *Journal of Food Science*, *81* (1):M97-M105.

Tremonte, P., Sorrentino, E., Pannella, G., Tipaldi, L., Sturchio, M., Masucci, A., Maiuro, L., Coppola, R., & Succi, M. (2017). Detection of different microenvironments and *Lactobacillus sakei* biotypes in Ventricina, a traditional fermented meat from central Italy. *International Journal of Food Microbiology*, *242*, 132–140.

Tremonte, P., Succi, M., Reale, A., Di Renzo, T., Sorrentino, E., & Coppola, R. (2007). Interactions between strains of *Staphylococcus xylosus* and *Kocuria varians* isolated from fermented meats. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(3), 743-751.

Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M., & Visconti, A. (2004). Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria: an approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. *FEMS microbiology letters*, *233*(2), 289-295.

Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, *12*(1-3), 221-237.

Wang, F., Wu, H., Jin, P., Sun, Z., Liu, F., Du, L., Wang, D., & Xu, W. (2018). Antimicrobial activity of phenyllactic acid against *Enterococcus faecalis* and its effect on cell membrane. *Foodborne Pathogens and Disease*, *15*(10), 645-652.

Wang, J., Wu, T., Fang, X., & Yang, Z. (2019). Manufacture of low-fat cheddar cheese by exopolysaccharide-producing *Lactobacillus plantarum* JLK0142 and its functional properties. *Journal of Dairy Science*, *102*(5), 3825-3838.

Wang, J., Fang, X., Wu, T., Min, W., & Yang, Z. (2018). Exopolysaccharide producing *Lactobacillus plantarum* SKT109 as adjunct culture in cheddar cheese production. *LWT*, 97, 419-426.

WHO (2015) <https://www.who.int/campaigns/world-health-day/2015/event/en/>

Yépez, A., Luz, C., Meca, G., Vignolo, G., Mañes, J., & Aznar, R. (2017). Biopreservation potential of lactic acid bacteria from andean fermented food of vegetal origin. *Food Control*, 78, 393-400.

Zhao, X., Yi, R., Zhou, X., Mu, J., Long, X., Pan, Y., Song, J. L., & Park, K. Y. (2019). Preventive effect of *Lactobacillus plantarum* KSFY02 isolated from naturally fermented yogurt from xinjiang, china, on D-galactose–induced oxidative aging in mice. *Journal of Dairy Science*, 102(7), 5899-5912.

Zhu, Y., Wang, X., Pan, W., Shen, X., He, Y., Yin, H., Zhou, K., Zou, L., Chen, S., & Liu, S. (2019). Exopolysaccharides produced by yogurt-texture improving *Lactobacillus plantarum* RS20D and the immunoregulatory activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 342-349.