

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

Meccanismi di risposta genici di *Lactobacillus acidophilus* 08 a seguito dell'applicazione di alte pressioni di omogeneizzazione

Tesi in

Microbiologia delle fermentazioni

Microbiologia avanzata e predittiva (c.i.)

Relatore

Prof.ssa **Rosalba Lanciotti**

Presentata da

Margherita D'Alessandro

Correlatori

Dott.ssa **Francesca Patrignani**

Dott. **Giacomo Braschi**

Sessione II

Anno Accademico 2017-2018

Indice

Introduzione:

1. Batteri lattici **7**
Genere *Lactobacillus* **9**
Lactobacillus acidophilus **10**
Potenzialità funzionali di *Lactobacillus acidophilus* **11**
Applicazione industriale di *Lactobacillus acidophilus* **14**
Meccanismo d'azione dei probiotici **16**
Sistemi di adesione **17**
Mub **18**
Elongation factor-Tu e GroEl **18**
Caseinolytic protease Clp **19**
Surface layer proteins **19**

Introduzione:

2. Omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) **20**
Meccanismo d'azione del trattamento HPH **21**
Applicazioni e potenzialità dei trattamenti HPH e UHPH **22**

Introduzione:

3. Espressione genica **26**
Retro-trascrizione **27**
Reazione a Catena della Polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) **28**
Real-Time PCR **31**

Obbiettivi:

4. **35**

Materiali e Metodi:

5. Caratteristiche del ceppo impiegato **40**
Cinetica di crescita **40**
Campionamento microbiologico **40**
HPH e Idrofobicità **41**
Estrazione DNA batterico e selezione dei primers **42**
Preparazione stock di *Lb. acidophilus* con RNA protect **47**
Purificazione RNA **47**

Retrotrascrizione di RNA in cDNA **49**

Real-Time qPCR **50**

Analisi dei profili di espressione genica **52**

Analisi statistiche **53**

Risultati:

6. 54

Conclusioni:

7. 62

Bibliografia:

8. 64

Introduzione

1. Batteri Lattici

A partire dagli inizi del XX secolo si è cominciata a sviluppare l'idea dei batteri dell'acido lattico (LAB) come gruppo definito di microrganismi. In realtà questo concetto era già stato introdotto, verso la fine del XIX secolo, da studi scientifici, che erano stati condotti a riguardo. Le interessanti interazioni che i LAB svolgono negli alimenti hanno goduto di un'attenzione precoce da parte degli scienziati, ciò ha portato nel 1857 al significativo contributo di Pasteur sulla fermentazione dell'acido lattico. A ciò è seguito, nel 1873, il primo isolamento di una coltura pura di *Bacterium lactis*, da parte di Lister. Quasi contemporaneamente, nel 1890, fu introdotto l'uso di colture starter per la produzione di formaggio e latte acido da parte di Weigmann e Starch, rispettivamente a Kiel e Copenaghen. Ciò ha aperto la strada all'industrializzazione delle fermentazioni alimentari. I LAB infatti sono da sempre coinvolti in un gran numero di fermentazioni alimentari spontanee. Scavi in Svizzera hanno dimostrato che il pane a lievitazione naturale faceva parte di una dieta tipica oltre 5000 anni fa (Whren, 1990), inoltre ci sono riferimenti biblici riguardo la "lievitazione naturale" del pane. Alcuni prodotti lattiero-caseari fermentati come formaggio, yogurt e burro sono riportati in testi arcaici d'origine irachena datati intorno al 3200 a.C. (Nissen et al., 1991). Anche la birra prodotta dai babilonesi e esportata in Egitto intorno al 3000 a.C. era molto probabilmente il prodotto di due fermentazioni, quella alcolica e lattica. Attualmente alcuni produttori fanno ancora affidamento a tecnologie tradizionali per la produzione di alcune tipologie di prodotti fermentati come formaggio, prodotti carnei fermentati etc., senza l'uso di colture starter. Nel complesso i batteri lattici costituiscono un gruppo microbico piuttosto omogeneo, ma la loro classificazione ha subito nel tempo numerose traversie ed ancora oggi presenta qualche incertezza. Le prime definizioni di LAB come gruppo, basate sulla capacità di fermentare e coagulare il latte, includevano anche i batteri coliformi. Nel 1901 la descrizione da parte di Beijerinck dei microrganismi appartenenti al genere *Lactobacillus* come batteri gram-positivi separò i coliformi dai LAB. Da allora è stata ben consolidata l'influenza che hanno i lattobacilli selezionati, in varie fermentazioni alimentari. Secondo Orla-Jensen (1919) i "veri batteri dell'acido lattico" appartengono ad un gruppo di microrganismi gram-positivi, non mobili, non sporigeni a forma bastoncellare o coccica che fermentano carboidrati e alcoli superiori per formare principalmente acido lattico. Egli propose sette diversi generi che sono

Betabacterium, Thermobacterium, Streptobacterium, Streptococcus, Betacoccus, Microbacterium, Tetracoccus.

La prima classificazione di Orla-Jensen (1919) rispecchiava quello che era l'approccio classico alla tassonomia batterica, basato su caratteristiche fenotipiche. Studi più recenti comprendono, oltre alla determinazione delle caratteristiche fenotipiche, altre metodiche di indagine tassonomica come il grado di omologia del DNA e la composizione in basi del DNA (mol% G+C), la determinazione elettroforetica delle proteine solubili, la determinazione degli acidi grassi della membrana cellulare, la caratterizzazione del sistema ubiquinone, il sequenziamento dei geni del DNA_r, dell'RNA 5S e dell'RNA 16S. Infatti una valida classificazione non deve prescindere dai rapporti filogenetici ricavabili, per esempio, dal sequenziamento di biopolimeri altamente conservati come l'RNA 16S che presenta indelebilmente incisa nella sua sequenza nucleotidica la storia evolutiva del microrganismo. L'analisi di 16S rRNA porterebbe ad evidenziare che le varie specie, all'interno del gruppo, hanno avuto una diversa evoluzione (Kandler, 1984). In generale, possono essere definiti "lattici" quei batteri che per fermentazione degli zuccheri formano quantità prevalenti di acido lattico. Tale definizione risulta però abbastanza incompleta, poiché questa capacità risulta comune anche a numerosi batteri non lattici; è necessario quindi prendere in considerazione altri criteri di selezione. Attualmente sono considerati "lattici" quei batteri che presentano le seguenti caratteristiche:

- cellule con forma sferica o bastoncellare, Gram-positivi, immobili, privi di spore;
- anaerobi facoltativi o microaerofili;
- catalasi negativi con accumulo di H₂O₂;
- prodotti della fermentazione rappresentati da solo acido lattico (omofermentativi), o da acido lattico in prevalenza e acido acetico, etanolo e CO₂ (eterofermentativi);
- complesse esigenze nutritive riguardo agli aminoacidi ed i fattori di crescita;
- non patogeni, non tossigeni;
- molto acido tolleranti, talvolta acidofili.

Sulla base delle recenti acquisizioni tassonomiche, i batteri lattici si distribuiscono nei seguenti generi:

- *Lactobacillus*
- *Lactococcus*

- *Pediococcus*
- *Streptococcus*
- *Leuconostoc* (Bottazzi,1993).

Genere *Lactobacillus*

I lattobacilli sono batteri lattici (LAB) appartenenti al phylum *Firmicutes* (basso contenuto GC; Gram-positivi), classe *Bacilli*, ordine *Lactobacillales* che possono essere isolati da numerosi ambienti come piante, animali e prodotti alimentari, anche di nicchia (Claesson et al., 2008). Infatti, i lattobacilli rivestono una grande importanza per gli uomini, sia come starter di fermentazione per alimenti e mangimi, sia come componenti della naturale flora microbica intestinale e vaginale (Tannock, 2004). Il genere *Lactobacillus* è il più numeroso tra i LAB, con oltre 145 specie riconosciute (Euzéby, 1997). È un genere estremamente diverso, con una tassonomia che è generalmente considerata non del tutto soddisfacente (Canchaya et al., 2006; Felis and Dellaglio, 2007; Makarova et al., 2006). Già nel 1919, Orla Jensen divise sulla base della temperatura ottimale di sviluppo, dei prodotti finali della fermentazione e della morfologia il genere *Lactobacillus* in tre gruppi: *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium*. Questa suddivisione è ancora oggi ritenuta sufficientemente valida, e sulla scorta dei risultati delle più recenti ricerche, sugli aspetti biochimici del genere *Lactobacillus*, è stata arricchita di buoni particolari tassonomici differenziativi. In forza di ciò si giunge alla seguente suddivisione in gruppi (Kandler et al., 1986):

- Gruppo I: riunisce i bacilli lattici omofermentanti obbligati che convertono, secondo lo schema Embden-Meyerhof, gli esosi in acido lattico; i membri di questo gruppo non sono in grado di fermentare i pentosi. Tutte le specie sono sufficientemente acidotolleranti per sviluppare intensamente nelle condizioni in cui si trovano ad operare e differiscono fra di loro per vari caratteri fenotipici fra i quali: la capacità di fermentare i carboidrati e i punti cardinali di temperatura
- Gruppo II: confluiscono in questo gruppo gli omofermentanti e le forme eterofermentanti facoltative, che fermentano gli esosi ad acido lattico e che per alcune specie, in condizioni particolari, in acido lattico, acido acetico, etanolo ed acido formico. Possono fermentare anche i pentosi, con formazione di acido lattico e acetico.

Il gruppo comprende molte specie prevalentemente mesofile, alcune delle quali coinvolte nel processo di maturazione di vari prodotti alimentari, in quanto impiegate come starter o perché componenti della microflora naturale.

- Gruppo III: afferiscono a questo gruppo i bacilli lattici eterofermentanti obbligati, che utilizzano gli esosi per produrre acido lattico, acido acetico, etanolo e CO₂ ed anche i pentosi per produrre acido lattico e acido acetico.

Lactobacillus acidophilus

I lattobacilli sono importanti abitanti del tratto gastrointestinale e ad alcune delle specie appartenenti a questo gruppo sono associate proprietà probiotiche. Queste, infatti, sono in grado di offrire una serie di benefici per il benessere e la salute umana (Reid et al., 2003). Alcuni dei membri più conosciuti di questo gruppo sono classificati all'interno del "complesso *acidophilus*", composto da specie strettamente isolate dal tratto gastrointestinale di esseri umani e animali (Klaenhammer et al., 2000). Tra questi, *Lactobacillus acidophilus* risulta come una coltura probiotica ampiamente riconosciuta e commercialmente distribuita. L'organismo, isolato per la prima volta da Moro nel 1900 da feci infantili di neonati allattati al seno, è stato caratterizzato come omofermentativo, Gram-positivo di forma bastoncillare, che cresce in modo ottimale da 37 ° C a 42 ° C (Gonzalez et al., 1989). La dimensione tipica è di 1.5-6 µm in lunghezza e 0.6-0.9 in larghezza. È non mobile, non sporigeno, intollerante al sale. Questo microrganismo non contiene citocromi, è quindi benzidina negativo. Inoltre, è microaerofilo, quindi la crescita superficiale su supporti solidi è generalmente migliorata da anaerobiosi o ridotta pressione dell'ossigeno e CO₂ compresa tra il 5-10%. La maggior parte dei ceppi di *Lb. acidophilus* può fermentare amigdalina, cellobiosio, fruttosio, galattosio, glucosio, lattosio, maltosio, mannosio, salicina, saccarosio, trealosio e aesculina (Nahaisi et al., 1986). Il lattosio è praticamente l'unico zucchero presente nel latte, eppure è stato segnalato che *Lb. acidophilus* utilizza il saccarosio in modo più ecologico rispetto al lattosio (Mital et al., 1992). Tali osservazioni possono essere attribuite a differenze in merito all'attività galattosidasica e fruttosidasi. Mentre la fruttosidasi è un enzima costitutivo, la galattosidasi in *Lb. acidophilus* è inducibile (Nielsen et al., 1992). Inoltre entrambe le frazioni di glucosio e fruttosio del saccarosio sono utilizzate da *Lb. acidophilus*, mentre la frazione di galattosio dal lattosio non è metabolizzata allo stesso modo. La frazione

del glucosio viene metabolizzata attraverso la via l'Embden Meyerhof Parnas con acido lattico come unico prodotto finale (Marshall et al., 1983).

Potenzialità funzionali di *Lactobacillus acidophilus*

L'epitelio intestinale intatto, insieme alla normale microflora intestinale, rappresenta una barriera al movimento di batteri patogeni, antigeni e altre sostanze nocive dal lume intestinale al sangue. In soggetti sani questa barriera è stabile, proteggendo così l'ospite e assicurando la normale funzionalità intestinale. Quando la microflora normale o le cellule epiteliali sono disturbate, da antigeni alimentari, agenti patogeni, sostanze chimiche o radiazioni, diventano evidenti difetti nei meccanismi di barriera e l'alterata permeabilità facilita l'invasione di agenti patogeni, antigeni estranei e altre sostanze nocive nel sangue. È documentato l'uso di batteri probiotici per il trattamento dei disordini intestinali, ad esempio fenomeni di diarrea acuta da rotavirus nei bambini o di allergie alimentari (Gomes et al., 1999). Alcuni esempi sono inclusi nella Tabella 1 che illustra lo stato dell'arte per ciò che riguarda l'applicazione, per scopi terapeutici, di diversi ceppi probiotici tra cui alcuni di *Lb. acidophilus*.

Strain	Experimental parameters	Observations	Effect	Reference
Indigenous microorganism				
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RP32, <i>L. acidophilus</i> P47	Analysis of cells and spent broth culture in 1% MRS broth containing oxgall	Removal of cholesterol efficient in the presence of oxgall under anaerobic conditions Presence of oxgall caused appearance of less cholesterol in broth and more in cells RP32 and P47 are bile resistant but only RP32 assimilates cholesterol in the presence of bile salt Strain specificity of <i>L. acidophilus</i> is suggested	Hypocholesterolemic action (direct action of culture on cholesterol assimilation or co-precipitation with bile salts)	Gilliland [56]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> RP32, <i>L. acidophilus</i> MUH41, <i>L. acidophilus</i> MUH79, <i>L. acidophilus</i> MUH117, <i>L. acidophilus</i> CH1, <i>Bifidobacterium bifidum</i> MUH80	Analysis of cells and spent broth culture in 1% MRS broth containing oxgall	RP32 is effective in the precipitation of cholesterol and bile salts at low pH Absence of bile acids in either supernatant or cells following incubation	Hypocholesterolemic action (co-precipitation of cholesterol in the presence of deconjugated bile salts and low pH)	Klaver and van der Meer [80]
<i>Bifidobacterium longum</i> BB 536 <i>B. breve</i> ATCC 15700, <i>B. animalis</i> ATCC 25527	Resting cell assays culture in TPY medium containing oxgall	Removal of cholesterol by precipitation and assimilation <i>B. longum</i> BB536 is the most efficient in deconjugating bile salts	Hypocholesterolemic action	Tahri et al. [81]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 301	Inhibitory activity of <i>L. acidophilus</i> against different pathogens (<i>S. typhi</i> 83, <i>P. vulgaris</i> 204, <i>S. aureus</i> C2-T10, <i>Y. enterocolitica</i> 03, <i>E. coli</i> 6) when grown simultaneously in milk; study of growth-inhibition profiles	Sharp decrease of pathogen populations by 8 h of incubation Inhibition shown by <i>L. acidophilus</i> is due to acid production and production of antibiotic-like compounds	Antibacterial activity	Gupta et al. [124]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK8912	Study of mode of action of acidocin 8912, a bacteriocin produced by <i>L. acidophilus</i> TK8912	Inhibitory action causes increase in permeability of cytoplasmic membrane of target cells by both dissipation of the proton motive force and pore formation	Bactericidal activity	Tahara et al. [64]
<i>Bifidobacterium</i> spp. (<i>B. breve</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i>)	Enterocyte-like Caco-2 mucus-secreting HT29-MTX cells for adhesion studies; characterization by light microscopy, SEM; type of mechanism involved in interaction with eukaryotic cells	Adhesion to human intestinal epithelial cells; bacterial maintenance in the intestinal tract and inhibition of enteropathogen-cell interactions	Stabilizer of gut mucosal barrier, immune enhancer	Bernet et al. [61]
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Six different strains; procarcinogens, nitrite and nitrosamines, tested	No growth inhibition at $<50 \mu\text{mol}^{-1}$ nitrite and $<200 \mu\text{g ml}^{-1}$ nitrosamine Nitrite elimination by non-enzymic mechanism, possibly via acid production <i>B. longum</i> metabolized nitrosamine by intracellular mechanism	Anticarcinogenic effect	Grill et al. [125]
<i>Bifidobacterium infantis</i> (NCFB 2205) <i>Bifidobacterium</i> spp.	Incubation of strains; with <i>E. coli</i> and <i>C. perfringens</i> in batch fermentations, two-vessel chemostat, single-stage continuous culture system, serum tube experiments and plate experiments	Inhibitory effect possibly related to acid production and excretion of antimicrobial substance with broad spectrum of activity (<i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Shigella</i> , <i>V. cholerae</i>)	Antibacterial activity (possible protection against gastroenteritis)	Gibson and Wang [63]
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 4356 <i>Bifidobacterium thermophilum</i> ATCC 25866, <i>B. breve</i> ATCC 14917	Cells grown in modified TPY medium, Fe^{2+} accumulation studied in two media at pH 5.0 and pH 6.5 and effect of glucose as energy source	Transport of Fe^{2+} into cell and partial oxidation to Fe^{3+} by intracellular putative ferroxidase Enzyme uses oxygen as substrate to promote Fe^{2+} oxidation and requires glucose as positive effector Extracellular oxidation by <i>L. acidophilus</i> via release of H_2O_2 Fe^{2+} unavailable for proliferation of pathogens	Nutritional immunity (antibacterial activity)	Kot et al. [62-66]
<i>Bifidobacterium longum</i> SBT 2928 and other <i>Bifidobacterium</i> spp.	Competitive binding of <i>Bifidobacterium</i> spp. and <i>E. coli</i> Pb 176 to ganglio-tetraosylceramide (GA1) examined <i>in vitro</i> using TLC overlay binding suppression assay, study of the inhibitory factor(s) in the <i>Bifidobacterium</i> culture supernatant fluid	Competitive exclusion of <i>E. coli</i> from GA1 by <i>Bifidobacterium</i> cells Binding inhibitor produced by <i>B. longum</i> SBT 2928 is a proteinaceous molecule Inhibition of pathogenic <i>E. coli</i> binding to GA1 on surface of human intestinal mucosa	Antibacterial activity	Fujiwara et al. [65]

Tabella 1. Applicazioni terapeutiche di alcuni ceppi di *Lb. acidophilus* (Gomes et al., 1999).

In questi stati di malattia, la microflora intestinale presente è spesso alterata, la barriera intestinale è compromessa e sono presenti diversi tipi di infiammazione intestinale, rendendo così una logica giustificazione l'uso selettivo dei batteri probiotici, non solo per il trattamento, ma soprattutto per la prevenzione. (Salminen et al., 1999). Tra i possibili meccanismi responsabili di risposte cliniche favorevoli, si può citare la promozione delle barriere di difesa immunologica e non immunologica nell'intestino, la capacità di prevenire l'adesione o l'attivazione di patogeni attraverso la produzione di metaboliti inibitori, come acidi organici,

perossido di idrogeno, batteriocine o attraverso l'assorbimento di ferro rendendolo così non disponibile per i patogeni (Bernet et al., 1993). I batteri probiotici sono in grado di sopravvivere alle condizioni gastriche (caratterizzate da pH 1,5 - 2,0 durante il digiuno e 4,0 - 5,0 dopo un pasto), colonizzano l'intestino (almeno temporaneamente) aderendo all'epitelio intestinale, in un processo mediato dalle adesine. Nella nutrizione clinica, ad esempio, vengono utilizzate diete speciali per il trattamento dell'infiammazione intestinale: i batteri probiotici svolgono un ruolo importante nell'alleviare tali disturbi, pertanto l'introduzione di tali ceppi in alimenti clinici e alimenti dietetici speciali è entrata nella norma. È stato dimostrato che la flora del colon è coinvolta nella carcinogenesi del colon (Salminen et al., 1999). Questo effetto è mediato da enzimi microbici come glucuronidasi, glucosidasi, nitroreductasi e ureasi, che convertono i procancerogeni in cancerogeni. Esperimenti condotti su modelli animali hanno mostrato che alcuni ceppi di *Lb. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp. sono in grado di ridurre i livelli di enzimi responsabili dell'attivazione di alcuni procancerogeni e di conseguenza ridurre il rischio di sviluppo del tumore (Mital et al., 1992). Studi nel corpo umano, usando gli stessi enzimi come punti finali, hanno dimostrato una riduzione generale delle attività degli enzimi microbici e una concomitante diminuzione della mutagenicità fecale (Marteau et al., 1993). L'effetto benefico potrebbe essere giustificato da un cambiamento favorevole nella composizione della flora intestinale, dopo l'introduzione dei suddetti batteri. Va notato che ceppi strettamente correlati di *Lb. acidophilus* differiscono tra loro in proprietà immunostimolatorie, quindi alcuni ceppi potrebbero non avere tutte quelle proprietà necessarie per tali attività. Alcuni studi sperimentali, condotti su animali, hanno avuto successo nell'attribuire positivamente le proprietà di abbassamento del colesterolo a *Lb. acidophilus* contenuto in prodotti lattiero-caseari, somministrati come yogurt ai suini e ai topi (Jones et al., 1985). Oltre all'azione ipocolesterolemica, è stato riscontrato un numero più elevato di lattobacilli fecali e un minor numero di coliformi nei topi che hanno ricevuto lo yogurt con *Lb. acidophilus*, rispetto a quelli che hanno ricevuto lo yogurt normale; indicando così che *Lb. acidophilus* si è affermato più efficacemente nel tratto intestinale rispetto a *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. I meccanismi, con cui i prodotti a base di latte fermentato sono in grado di diminuire il colesterolo, non sono stati finora pienamente dimostrati. Studi in vitro hanno dimostrato che *Lb. acidophilus* è in grado di utilizzare il colesterolo nei terreni di crescita, sia per assimilazione, che per precipitazione con sali biliari deconiugati in condizioni

acide. Il loro suggerimento è che l'assimilazione del colesterolo era più elevata in presenza di sali biliari triidrossi-coniugati rispetto ai sali biliari diidrossi-coniugati. La summenzionata assimilazione batterica del colesterolo nell'intestino può ridurre il suo assorbimento dal tratto digestivo nel sistema sanguigno (Klaver et al., 1993).

Applicazione industriale di *Lactobacillus acidophilus*

Le specie microbiche più frequentemente impiegate nella produzione di prodotti lattiero-caseari probiotici sono di origine intestinale umana, perché è generalmente accettato che siano più adatte ai bisogni fisiologici dell'ospite e che possano colonizzare più facilmente l'intestino, rispetto ai ceppi selvaggi o ai ceppi che esistono nel colon di altri animali. Ad esempio alcuni microrganismi di origine umana sono: *Bifidobacterium adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. longum*, *Lactobacillus acidophilus*, (Hoier, 1992). Vale anche la pena notare che ogni ceppo all'interno di queste specie esibisce proprietà uniche come tasso di crescita, tasso metabolico, attività proteolitica etc. Di conseguenza, un'attenta gestione di tali fattori, attraverso tecnologie di fabbricazione su misura, consentirà a queste specie di raggiungere vari gradi di successo in molteplici applicazioni industriali (Gomes et al., 1999). I prodotti alimentari funzionali più frequenti sul mercato sono di origine lattiero-casearia (Tabella 2).

Product	Country of origin	Microorganisms
A-38	Denmark	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i> , mesophilic lactococci
Acidophilus buttermilk	USA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp. <i>cremoris</i> , mesophilic lactococci
Progurt		<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , mesophilic lactococci
Acidophilus milk	Several countries	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Acidophilus yeast milk	Former USSR	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Saccharomyces fragilis</i> , <i>S. cerevisiae</i>
A-B Yoghurt	France	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Cultura	Denmark	Ibidem
Milky	Italy	Ibidem
Nu-Trish A/B Milk	USA	Ibidem
Biomild	Several countries	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus acidophilus</i>
Acidophilus yoghurt (ACO-yoghurt)	Several countries	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
B-Active	France	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Fresh BA	UK	Ibidem
Kyr	Italy	Ibidem
Yoplus	Australia	Ibidem
Biogarde	Germany	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Ofilus	France	Ibidem
Philus	Norway	Ibidem
Bifidus milk	Several countries	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. longum</i>
Bifighurt	Germany	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biogurt	Germany	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Biokys	Czech Republic	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Mil-Mil	Japan	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. breve</i>
Akult	Japan	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>B. breve</i> , <i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>

Tabella 2. Prodotti commerciali contenenti *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus acidophilus* (Hoier, 1992).

Il Giappone, paese leader nella produzione, commercializza più di 50 prodotti lattiero-caseari contenenti cellule vitali e funzionali. Tendenze simili si osservano anche in paesi europei come la Francia, la Germania e la Svezia, dove i prodotti probiotici rappresentano circa il 25% di tutti i prodotti lattiero-caseari fermentati. Si stima che in Europa siano in numero elevato gli impianti industriali produttori di alimenti funzionali con *Lb. acidophilus*. Non a caso da decenni gli studi di ricerca sono stati sempre più incentrati sulla produzione di latti fermentati, yogurt, gelati, formaggio, latte di soia fermentato e yogurt di soia addizionati con ceppi probiotici come bifidobatteri e *Lb. acidophilus* (Murtri et al., 1992). I ceppi probiotici di bifidobatteri e *Lb. acidophilus* possono essere aggiunti, da soli o in seguito ad una combinazione con altri batteri lattici, durante la fermentazione, al prodotto finale fermentato o al prodotto fresco prima della distribuzione. Oltre ai prodotti alimentari contenenti batteri probiotici, sono disponibili sul mercato vari prodotti per la salute e preparati farmaceutici

contenenti probiotici. In generale, questi consistono in popolazioni batteriche incapsulate e liofilizzate che vengono utilizzate nel trattamento di disturbi gastrointestinali come diarrea, includendo gli effetti secondari della terapia antibiotica, stitichezza e alcune malattie epatiche (Kurmann et al., 1991).

Meccanismo d'azione dei probiotici

La modalità di azione mediante la quale un probiotico sradica un patogeno può essere descritta come la soppressione delle cellule vitali patogene. Il probiotico, infatti, riesce ad alterare il metabolismo dei patogeni, promuovendo il sistema immunitario dell'ospite (Fuller 1989). Tale soppressione può essere facilitata dalla produzione di composti antimicrobici quali le batteriocine, gli acidi organici e il perossido di idrogeno. L'attività antagonista di tali composti contro i batteri Gram-positivi e Gram-negativi è stata dimostrata in vitro (Klaenhammer 2000). Inoltre, anche la competizione per i nutrienti può ridurre il numero di cellule patogene, in quanto i probiotici possono utilizzare nutrienti che potrebbero essere consumati dagli agenti patogeni (Fuller 1989). L'effetto dei probiotici sul metabolismo microbico, nell'intestino, è stato dimostrato dal consumo di *L. acidophilus*. A tal proposito è stata osservata una soppressione nell'attività di enzimi selezionati come β -glucuronidasi, nitroreduttasi e azoreduttasi (Goldin et al., 1984). La competizione per i siti di adesione batterica sulle superfici epiteliali è un altro importante meccanismo d'azione dei probiotici (Adlerberth et al., 1996). La competizione per questi siti non solo potrebbe diminuire le possibilità di proliferazione degli agenti patogeni, ma anche aumentare la protezione per l'ospite dalle infezioni (Reid et al., 2002). Lo strato di muco gioca un ruolo fondamentale nel mantenere un rivestimento protettivo sul tessuto intestinale, prevenendo così la permeabilità intestinale (Fioramonti et al., 2003). Gli agenti patogeni producono mucinasi che degrada lo strato mucoso e che compromette l'integrità dell'epitelio intestinale, portando a diverse infezioni (Guandalini et al., 2000). La capacità di degradare il muco è quindi considerata un valido indicatore di patogenicità e tossicità. Studi condotti su batteri probiotici hanno evidenziato la capacità di legarsi al muco intestinale. Ad esempio, il 45% dei ceppi di *Lactobacillus rhamnosus* e il 30% dei ceppi di *Bifidobacterium lactis* hanno aderito al muco delle feci dopo somministrazione orale nell'uomo (Kirjavainen et al., 1998). I lattobacilli aderiscono e si

propagano sullo strato mucoso, come mostrato per l'intestino tenue dei maiali (Rojas et al., 1996). La mancanza di enzimi della mucinasi nei batteri probiotici e l'incapacità di alcuni ceppi di degradare il muco hanno promosso il loro uso sicuro. Questa proprietà è stata dimostrata per ceppi probiotici *L. casei*, *L. acidophilus*, *B. bifidum* (Ruseler-van Embden et al., 1995), *L. rhamnosus* e *B. lactis* (Zhou et al., 2001). Inoltre, i probiotici hanno dimostrato la notevole capacità di stimolare la produzione di mucina come altro meccanismo efficace per prevenire la colonizzazione patogena. Ceppi probiotici *L. plantarum* 299 e *L. rhamnosus* GG hanno dimostrato l'up-regulation dei geni *muc2* e *muc3* nelle cellule umane HT-29 del colon (Mack et al., 2003). Di conseguenza, alcuni ceppi probiotici sono stati selezionati, per altri studi, esclusivamente sulla base della loro forte capacità adesiva (Rolfe, R. D. 2000).

Sistemi di adesione

Sono stati descritti vari meccanismi per l'ancoraggio delle proteine alle superfici dei batteri Gram-positivi. La superficie esterna della cellula dei batteri Gram-positivi è composta da una membrana cellulare circondata da uno strato di peptidoglicano (PG) e da polimeri della parete cellulare come gli acidi teicoici, l'acido teicuronico e altri polisaccaridi neutri o acidi (Navarre et al., 1999). Un meccanismo di ancoraggio comune è il meccanismo sortasi dipendente tramite il gruppo LPXTG, composto da leucina, prolina, un qualsiasi amminoacido (X), treonina e glicina. Le proteine che presentano questo meccanismo sono caratterizzate da un LPXTG carbossilico terminale, una regione idrofobica e una coda di amminoacidi carichi. La sequenza LPXTG è legata in modo covalente ai legami crociati del PG tramite un enzima sortasi che è associato alla membrana (Pavan et al., 2003). La proteina legante il muco (MUB) (Roos et al., 2002.), le proteasi della superficie cellulare (Savijoki et al., 2006) e gli esoenzimi come la fruttosiltransferasi (Van Hijum et al., 2002) sono proteine superficiali di lattobacilli caratterizzate proprio da questa sequenza. Per *Lactobacillus* spp. è stata descritta anche la sequenza GW (Braun et al., 1997). Le proteine con il gruppo GW contengono ripetizioni di glicina e triptofano nel terminale carbossilico, che ancorano la proteina agli acidi teicoici della parete cellulare (Jonquieres et al., 1999). Le proteine con il dominio LysM sono state descritte per varie specie batteriche e mediano il legame al PG attraverso il C-terminale (Bateman et al., 2000). È stato quindi suggerito che questo dominio si leghi ai glycan strands, componenti

comuni nel PG (Steen et al., 2005). Altri meccanismi includono il legame diretto delle proteine alla membrana cellulare attraverso una cisteina comune, contenente lipobox (Sutcliff et al., 2002), o un sistema di ancoraggio α -elicoidale transmembrana (Desvaux et al., 2006). La caratterizzazione molecolare delle proteine d'adesione nei lattobacilli non ha ricevuto molta attenzione. La maggior parte della ricerca condotta sull'adesione si concentra principalmente su aspetti fenotipici quali l'adesione in vitro di potenziali cellule probiotiche a modelli di adesione come linee cellulari o preparati di muco. Le proteine di adesione, caratterizzate fino ad oggi, includono diverse proteine tra cui: Mub (Roos et al., 2002), Elongation factor-Tu (EF-Tu) (Granato et al., 2004) e GroEl (Bergonzelli et al., 2006), Surface layer proteins (Slp) (Boot et al., 1993).

Mub

Mub è stata la prima proteina di adesione di *Lactobacillus* a mostrare la stessa organizzazione di dominio della maggior parte delle adesine, caratterizzanti per altri batteri Gram-positivi. Queste adesine generalmente includono un peptide segnale, sequenze di ancoraggio C-terminale contenenti il dominio LPXTG, regioni ripetute che mostrano proprietà di adesione e una regione N-terminale, spesso con una funzione non caratterizzata (Roos et al., 2002). Il corrispondente gene di Mub ha due possibili siti di inizio della traduzione e la sequenza di ancoraggio della membrana al terminale C contiene un residuo di cisteina. La presenza di due tipi di ripetizioni di residui amminoacidici (MBP-Mub1 e MBP-Mub2) e di una regione N-terminale con più di 500 amminoacidi, indica che il Mub è una proteina multifunzionale. L'inibizione del legame da parte delle glicoproteine suggerisce l'interazione con i componenti glicemici nel muco. Omologhi di Mub sono stati descritti per alcuni lattobacilli tra cui *Lb. acidophilus*, indicando l'importanza di questa proteina per l'aderenza e la colonizzazione degli stessi lattobacilli (Alterman et al., 2005)

Elongation factor-Tu e GroEl

La proteina EF-Tu è una proteina legante, che funziona durante la sintesi proteica e svolge anche un ruolo nell'adesione in alcune specie di lattobacilli. In particolare, Granato e

collaboratori (2004) hanno evidenziato come EF-Tu sia in grado di mediare l'adesione di *Lactobacillus johnsonii* La1, alle linee cellulari e al muco intestinale dell'uomo. EF-Tu di *L. johnsonii* non possiede una sequenza di segnali identificabile e manca della prima metionina al terminale amminico. La proteina mostra anche un'apparente mancanza di LPXTG o di un altro dominio lipoproteico, funzionale per mostrare la sua localizzazione sulla superficie del batterio. La presenza di EF-Tu su diverse regioni di batteri è ben documentata.

Diversamente GroEl, è una proteina intracellulare, che agisce nel ripiegamento delle proteine. Tuttavia, la proteina è stata identificata sulla superficie cellulare e sul terreno di coltura di *L. johnsonii* La ed anche come si lega alla mucina e alle cellule epiteliali umane a pH acido. Il potenziale probiotico di questa proteina in *L. johnsonii* è stato dimostrato dalla capacità di stimolare la secrezione di interleuchina-8 nei macrofagi e nelle cellule del patogeno gastrico *Helicobacter pylori* (Bergonzelli et al., 2006).

EF-Tu e GroEl sono indicate come proteine multifunzionali senza ancoraggio poiché nessuna sequenza di segnale stabilita o dominio di ancoraggio è presente nelle loro sequenze predette (Chhatwal 2002).

Caseinolytic protease Clp

Clp (caseinolytic protease) è un complesso proteico che gioca un ruolo centrale nella degradazione ATP dipendente delle proteine denaturate. Si tratta di un complesso multimerico costituito da una sub-unità ad attività proteolitica ClpP e una subunità ad azione ATPasica ClpA (Weiss et al., 2010). Si tratta di proteine fortemente conservate tra le specie procariote e gli organismi eucarioti. La loro funzione è infatti quella di degradare selettivamente le proteine denaturate a seguito di stress di vario tipo, la cui corretto ripiegamento ad opera dei complessi GroEL e DnaK è compromesso (Weiss et al., 2010).

Surface layer proteins

I surface layers (S-layers) sono strutture cristalline composte da subunità proteiche o glicoproteiche, con masse molecolari che vanno da 40 a 200 kDa (Sleytr et al., 1999). Gli strati superficiali dei lattobacilli sono tra i più piccoli conosciuti, con masse molecolari che vanno da 25 a 71 kDa. La proprietà unica delle proteine S-layers dei lattobacilli è la loro

natura estremamente basica con pI compreso tra 9,35 e 10,4 (Sara et al., 2000). Ciò può verificarsi come risultato di una maggiore percentuale di residui di amminoacidi carichi positivamente (12,5%). La struttura dei glicani è stata identificata dalle proteine S-layers di diversi batteri Gram-positivi (Schaffer et al., 1996). Tuttavia gli S-layers dei lattobacilli sembrano non glicosilati, solo per *L. buchneri* è stata evidenziata una struttura glicemica (Masuda et al., 1983). All'interno del gruppo dei lattobacilli, la composizione aminoacidica delle proteine S-layer condivide un certo grado di omologia con altre proteine S-layer, in particolare nell'alto contenuto di residui di amminoacidi idrofobici. Questo valore varia dal 31,9% al 38,7%, caratteristica tipica di tutte le proteine S-layer. Le subunità proteiche dello strato S sono legate non covalentemente l'una all'altra e alla parete cellulare. Queste proteine possono quindi essere estratte dalla superficie cellulare mediante agenti caotropici come la guanidina cloridrato o con un'alta concentrazione di sali, come il litio cloruro (Sleytr et al., 1997). Una proprietà funzionale generale per tutte le proteine S-layer non è stata determinata. Tuttavia, le funzioni proposte comprendono adesione cellulare e riconoscimento superficiale (Sara et al., 2000). Tra i geni delle proteine S-layer di *Lactobacillus* spp. che sono stati caratterizzati, alcuni includono il *L. acidophilus* (Boot et al., 1993), il cui ruolo funzionale è stato scarsamente caratterizzato, se non per il meccanismo di attacco alle varie superfici.

2. Omogeneizzazione ad alta pressione (HPH)

Per tradizione, il trattamento termico permette il raggiungimento di un livello accettabile in termini di sicurezza e shelf-life per i prodotti alimentari. Sicuramente tra gli ostacoli tecnologici impiegati per una efficiente pastorizzazione di materie prime e cibi fluidi, i più comuni risultano essere i trattamenti termici condotti a basse temperature per tempi lunghi, o quelli svolti a temperature più alte. Bisogna però considerare che i trattamenti termici possono andare ad intaccare la qualità e la freschezza dell'alimento. Anche per rispondere a tale esigenza, negli ultimi anni sono stati proposti alcuni trattamenti alternativi tra cui alta pressione idrostatica, campo elettrico pulsato, ultrasuoni (US) e omogeneizzazione ad alta pressione (HPH). Tra questi l'HPH ha mostrato ottimi risultati in termini di shelf-life per alcuni prodotti "freschi". Inoltre tale trattamento ha preso piede anche a livello industriale, grazie alla messa a punto di valvole di omogeneizzazione con la capacità di resistere ad intervalli di pressione compresi tra 350-400 MPa. Già da tempo l'omogeneizzazione ad alta

pressione (HPH) è stata proposta per la decontaminazione microbica degli alimenti, ed è ben documentata la sua efficacia nell'inattivazione di microrganismi patogeni e degradativi in sistemi modello, come nei sistemi reali (Lanciotti et al., 1994; Lanciotti et al., 1996). L'applicazione di questo processo, come alternativa al trattamento termico, per migliorare la sicurezza e la qualità microbiologica per alcune tipologie di alimenti è stato già proposto (Guerzoni et al., 1997). Di conseguenza, l'HPH è divenuto uno strumento di differenziazione per lo sviluppo di prodotti innovativi, diversi dai tradizionali, oltre che da un punto di vista organolettico anche funzionale (Lanciotti e Patrignani, 2016).

Meccanismo d'azione del trattamento HPH

Seguendo un approccio costruttivo, i componenti essenziali che assicurano la funzionalità dell'omogeneizzatore sono la pompa e la valvola omogeneizzatrice; la pompa ha la funzione di forzare il fluido nella valvola dove avviene l'omogeneizzazione (Diels and Michiels, 2006). Il fluido è spinto sotto pressione, grazie alla presenza di un piccolo orificio che si trova tra la valvola e la sede della valvola; andando a modificare la distanza che c'è tra questi due elementi si riesce a regolare e a controllare la pressione d'esercizio (Figura 1).

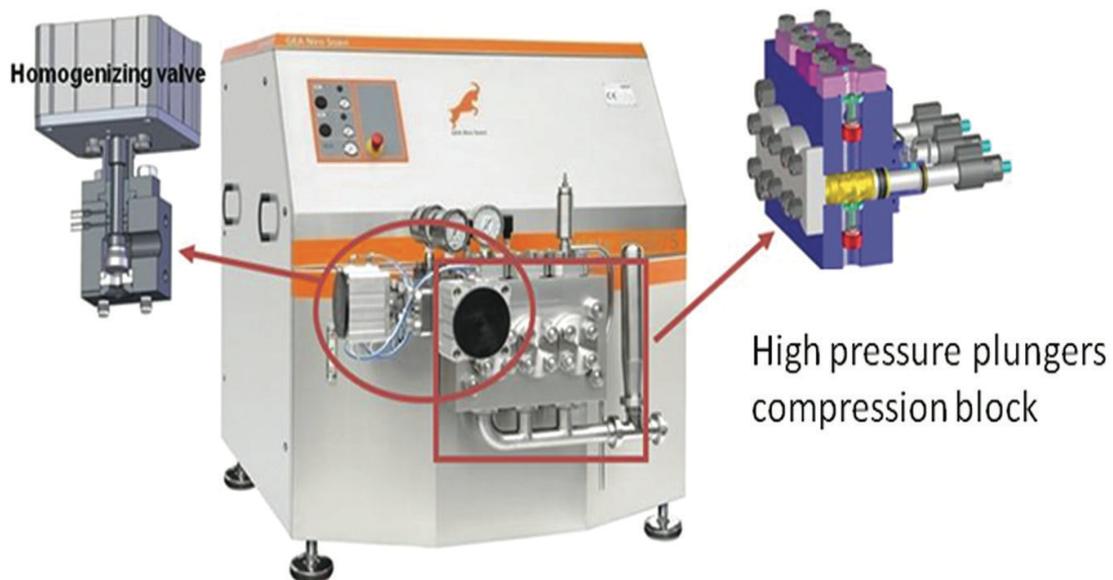


Figura 1. Omogeneizzatore GEA (Niro Soavi) in grado di raggiungere 200 MPa (Lanciotti e Patrignani, 2016).

Sono diversi i parametri di processo in grado di influenzare la struttura chimica e la popolazione microbica presente nel prodotto alimentare. Tra questi, le variabili di processo di

cui tener conto sono sicuramente il livello di pressione impiegato, come anche la temperatura finale raggiunta dalla matrice alimentare sottoposta al trattamento HPH. La disattivazione microbica, dovuta all'applicazione del trattamento HPH, se pur influenzata principalmente dalla natura chimica e fisica della matrice alimentare e dalla sensibilità dei microrganismi presenti, aumenta con il livello di pressione d'esercizio (Diels and Michiels, 2006). Nel corso del trattamento con le alte pressioni di omogeneizzazione, però, si deve tenere conto di quelli che sono gli effetti legati alla temperatura impiegata, infatti durante l'omogeneizzazione si verifica un aumento della temperatura di circa 2,5 ° C per 10 MPa, nel fluido a valle della valvola. Questo effetto, secondo la letteratura, è attribuibile all'alta velocità del flusso del fluido e alle risultanti sollecitazioni viscosse. Ciò ha quindi un riflesso, che porta alla dissipazione di una parte dell'energia meccanica come calore nel fluido (Zamora and Guamis, 2015). Nonostante ciò, considerando i veloci tempi di trattamento che sono impiegati per i prodotti alimentari, l'aumento di temperatura non ha comportato la comparsa di indicatori di calore nei campioni alimentari trattati con HPH (Floury et al., 2004) . Negli ultimi anni abbiamo assistito ad importanti progressi tecnologici relativi non solo a quelle che sono le strumentazioni impiegate, ad esempio la messa a punto di valvole omogeneizzatrici in grado di sopportare 300-400 MPa, ma anche relativi alla funzionalità ed alla flessibilità delle suddette attrezzature. Anche ciò ha permesso l'affermazione a livello industriale delle alte pressioni di omogeneizzazione come strumento oltre che di differenziazione, anche di innovazione in termini di qualità igienico-sanitaria, organolettica e di proprietà funzionali (Lanciotti e Patrignani, 2016).

Applicazioni e potenzialità dei trattamenti HPH e UHPH

Il primo che riuscì a comprendere quelle che erano le potenzialità dell'omogeneizzazione, come strumento per la stabilizzazione di alimenti emulsionati, fu Auguste Gaulin. Infatti alla Fiera mondiale di Parigi del 1900, Gaulin decise di presentare come invenzione uno strumento che sfruttava pressioni fino 30 MPa per mescolare il latte. Ad oggi l'omogeneizzazione convenzionale presenta un range, in termini di pressione, che si è esteso fino a 50 MPa. Attualmente, in virtù dei progressi tecnologici e delle ricerche svolte in tal senso, sono stati messi a punto moderni omogeneizzatori caratterizzati dall'impiego di pressioni d'esercizio 10-15 volte superiori, con intervalli di pressione compresi tra 300-400 MPa (tecnologia

UHPH). L'UHPH permette la distruzione dei microrganismi per quelle matrici alimentari liquide che raggiungono la sterilizzazione. Inoltre ha un'influenza positiva non solo sulla stabilità e shel-life degli alimenti trattati, ma anche sul mantenimento delle loro peculiari caratteristiche organolettiche e nutrizionali. Tale trattamento comporta una più efficace riduzione nelle dimensioni delle particelle della matrice trattata rispetto alla classica omogeneizzazione. Questo effetto è risultante dalle improvvise cadute di pressione, fenomeni di torsione e sforzi di taglio, turbolenza, urto, fenomeni di cavitazione, onde d'urto e aumento della temperatura; con una riduzione concomitante di carico microbico e con conseguenze interessanti su quelle che sono le proprietà dell'emulsione (Lanciotti e Patrignani, 2016).

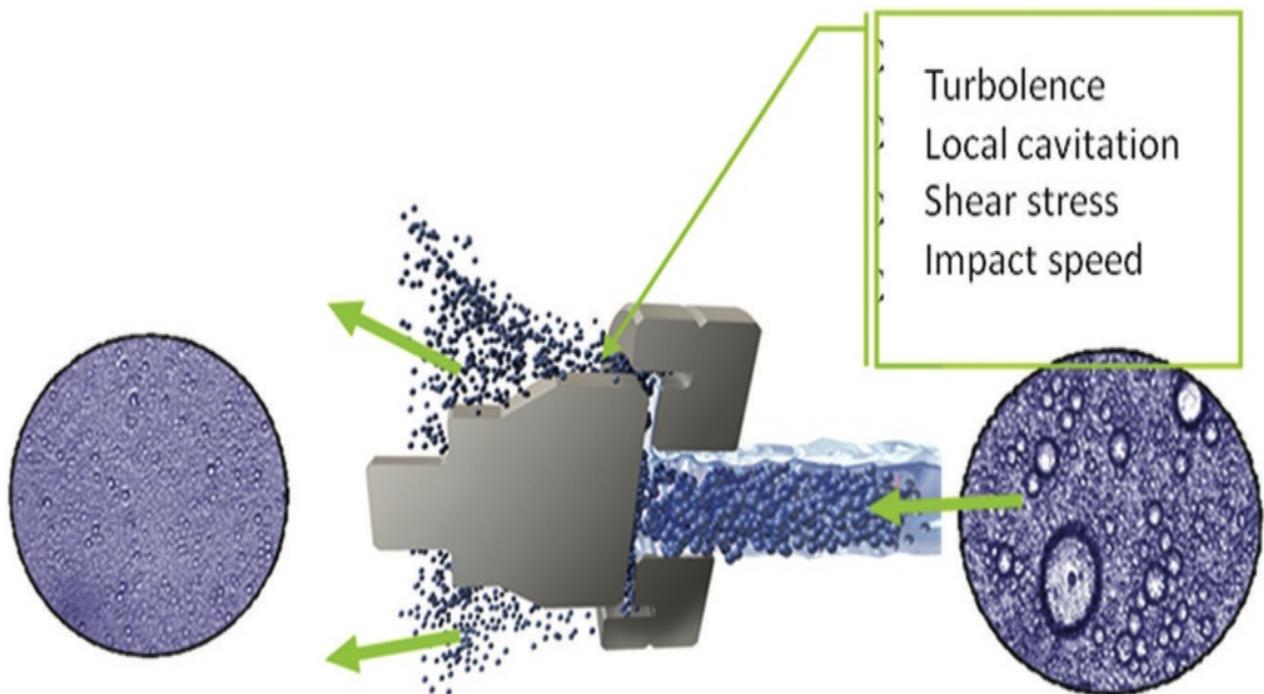


Figura 2. Meccanismi d'azione dell'HPH GEA (Lanciotti e Patrignani, 2016).

HPH e UHPH sono stati impiegati su matrici alimentari diverse e in sistemi in vitro utilizzando, per verificare l'efficacia di tali trattamenti, diversi microrganismi patogeni e degradativi come bersagli microbici.

Matrix	Microorganisms	Reduction	Conditions	Homogenizer/type of valve	Reference
Water 50%, oil 25%, egg yolk 25%	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>	7 log for all	Pressure ranges: 150–200 MPa	PA'NS valve	Lanciotti et al., 1994
Water 25%, oil 53%, egg yolk 22%	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> ,	7 log for all	Pressure ranges: 150–200 MPa	PA'NS valve	Lanciotti et al., 1994
Brain Heart Infusion modified in pH and water activity	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	7 log for all	Pressure ranges: 150–200 MPa	'PA'NS valve	Lanciotti et al., 1996
Model system simulating dairy product	<i>Listeria monocytogenes</i> ,	No growth with respect to the inoculum	Pressure: 25 MPa	'PA'NS valve	Guerzoni et al., 1997
Brain Heart Infusion modified in pH and NaCl	<i>Salmonella enteritidis</i>	2.6 log	Pressure ranges: 0.1–140 MPa	PA'NS valve	Guerzoni et al., 2002
PBS buffer (pH 7)	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.0 log	Tin = 50 P = 300 Tout = 18	Counterjet dispergator	Diels et al., 2003
PBS buffer (pH 7)	<i>Staphylococcus aureus</i>	6.0 log	Tin = 25 P = 300 Tout = 42	Counterjet dispergator	Wuytack et al., 2002
PBS buffer (pH 7)	<i>Yersinia enterocolitica</i>	6.0 log	Tin = 50 P = 250 Tout = 18	Counterjet dispergator	Diels et al., 2003
PBS buffer (pH 7)	<i>Salmonella enteritidis</i> ATCC 13047	8.0 log (after five passes)	Tin = 25 P = 200 Tout = NR, flow 1.5 L/h	Counterjet dispergator	Vachon et al., 2002
PBS buffer (pH 7)	<i>Enterococcus faecalis</i>	3.0 log	Tin = 25 P = 250 Tout = 42	Counterjet dispergator	Wuytack et al., 2002
PBS buffer (pH 7)	<i>Escherichia coli</i> K12	6.0 log	Tin = 25 P = 300 Tout = NR	Axial-flown through orifice valve	Diels et al., 2005
PBS buffer (pH 7)	<i>Escherichia coli</i> MG1655	7.0 log	Tin = 50 P = 250 Tout = 18	Counterjet dispergator	Diels et al., 2004
Saline solution and nisin	<i>Escherichia coli</i> K12	7.0 log	Tin = 5 P = 300 Tout = 70	Axial-flown through orifice valve	Taylor et al., 2007
PBS buffer (pH 7)	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 35150	8.0 log (after three passes)	Tin = 25 P = 200 Tout = NR flow 1.5 L/h	Counterjet dispergator	Vachon et al., 2002
LB nutrient	<i>Escherichia coli</i>	7.0 log	300 MPa	Stansted high-pressure homogenizer (model FPG11300:350)	Donsi et al., 2009b

Tabella 3. Studi riguardanti l'inattivazione microbica in sistemi modello mediante HPH o UHPH, in relazione agli obiettivi microbici, al livello di inoculo e alle condizioni adottate (Lanciotti e Patrignani, 2016).

Sebbene fosse disponibile un'enorme quantità di dati raccolti in sistemi modello utile per comprendere i meccanismi di azione dell'HPH contro le specie patogene, molti ricercatori hanno testato le potenzialità di questa tecnologia contro i patogeni inoculandoli direttamente nelle matrici alimentari. Infatti la viscosità del trattamento e la composizione del cibo ha anche un effetto indiretto sull'attivazione microbica

Matrix	Microorganisms	Reduction	Conditions	Homogenizer/type of valve	Reference
Milk	<i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> 5 log at 150 MPa <i>Listeria monocytogenes</i> : the same	<i>P</i> range = 40–150 MPa Tout max = 65	PS valve, Gea Homogenizer	Lanciotti et al., 1994
Egg yolk 10%, yoghurt 13%, sunflower oil 60%, water in relation to pH and NaCl	<i>Salmonella enteritidis</i>	Reduction was obtained at 50 MPa with pH 4 and 2% NaCl. No re-growth at 10°C	<i>P</i> range = 0.1–50 MPa	PS valve, Gea Homogenizer	Guerzoni et al., 2002
Skim, soy, and strawberry-raspberry milk	<i>Escherichia coli</i> MG1655	Skim 3.5 log Soy 3.0 log Straw/rasp 3.0 log	Tin = 25, <i>P</i> = 300 MPa, Tout = 18	Counterjet dispergator	Diels et al., 2005
Bovine milk	<i>Pseudomonas fluorescens</i> AFT 36	6 log	Tin = 45 <i>P</i> = 250 Tout = 76.8	Axial-flown through orifice valve	Hayes et al., 2005
Milk	<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 976	7 log	Tin = 20 <i>P</i> = 330 Tout = NR flow 16 L/h	Axial-flown through orifice valve	López-Pedemonte et al., 2006
Orange juice	<i>Escherichia coli</i> O58:H21 ATCC 10536, <i>Escherichia coli</i> O157:H7 CCUG 44857	3.9 log (O58:H21) 3.7 log (O157:H7)	Tin = 20 <i>P</i> = 300 Tout = NR, flow 18 L/h	Axial-flown through orifice valve	Brinez et al., 2006b
Milk	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	2.7 log	Tin = 20, <i>P</i> = 300; Tout = NR, flow = 18 L/h	Axial-flown through orifice valve	Brinez et al., 2006a
Milk and orange juice	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 13565	Milk 3.6 log Orange juice 4.2 log	Tin = 20 <i>P</i> = 300 Tout = 18 flow 18 L/h	Axial-flown through orifice valve	Brinez et al., 2007
Liquid whole egg	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>senftenberg</i> 775W	3.2 log at 250 MPa	100, 150, 200, and 250 MPa	Not found	Velazquez-Estrada et al., 2008
Milk (0.3, 3.6, 10, and 15% fat contents)	<i>Listeria monocytogenes</i> CCUG 15526	7.95 log at 400 MPa and 15% fat	200, 300, and 400 MPa	Benchtop high-pressure homogenizer (model/DRG FPG7400H:350, Stansted Fluid)	Roig-Sagues et al., 2009
Apple juice and apple cider	<i>Escherichia coli</i> K12	7 log	Tin = 25 <i>P</i> = 250 Tout = 70	Axial-flown through orifice valve	Kumar et al., 2009
Apple and carrot juice	<i>Listeria innocua</i> , <i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> : > 5 log reduction (> 250 MPa). <i>Listeria innocua</i> : 5 log at 350 MPa	<i>P</i> range = 0–350 MPa		Pathanibul et al., 2009
Orange, red orange, and pineapple	<i>Escherichia coli</i>	100 MPa 7 log after four passes 150 MPa 8 log after three passes	<i>P</i> range = 50–250 MPa Passes = 1–5 Tin = 2–20°C	nm-GEN 7400 series by Stansted Power Fluids, UK.	Maresca et al., 2011
Liquid whole egg	<i>Salmonella enteritidis</i>	3 log	100 MPa for five cycles	PS valve, Gea Homogenizer	Patrignani et al., 2013b
Egg white	<i>Salmonella enterica</i> SDMZ 9898	5 log after eight passes at 150 MPa	<i>P</i> = 20, 50, 100, 150 MPa <i>P</i> = 150 MPa via multiple passes up to 17	Cylindrical tungsten carbide homogenising valves	Panozzo et al., 2014

Tabella 4. Studi riguardanti l'inattivazione microbica mediante HPH o UHPH, in relazione alla matrice alimentare, agli obiettivi microbici, al livello di inoculo e alle condizioni adottate (Lanciotti e Patrignani, 2016).

Sulla base dei numerosi dati disponibili in letteratura sono evidenti le straordinarie potenzialità del trattamento HPH come strumento per garantire la qualità igienico-sanitaria, organolettica, nutrizionale e funzionale in campo alimentare. Tuttavia, prima dell'introduzione delle nuove valvole di omogeneizzazione e degli omogeneizzatori ad altissima pressione UHPH, in grado di raggiungere pressioni di 400 MPa, questa tecnologia è stata implementata nell'industria alimentare per la riduzione dei globuli grassi, per il

trattamento dei succhi e la creazione di emulsioni. Le nuove applicazioni riguardano il trattamento del latte (per consumo o produzione di prodotti caseari), succhi di frutta e verdura, latti vegetali e componenti alimentari (come gli enzimi). Nella maggior parte dei casi, i dati della letteratura hanno evidenziato un miglioramento delle proprietà sensoriali e nutrizionali e nella stabilità dei prodotti trattati con HPH e UHPH.

La sostituzione del trattamento termico tradizionale potrebbe rappresentare un vantaggio per l'industria, infatti l'HPH è una tecnologia a freddo con un minore impatto sull'ambiente, che risulta più sostenibile con un maggior risparmio di energia, tempo e costi. Tale tecnologia presenta, però, ancora dei limiti che ne limitano implementazione a livello industriale. Il processo di omogeneizzazione, di per sé, non garantisce una avvenuta sterilizzazione, perciò si impone un successivo condizionamento in asettico. Questa condizione rappresenta uno svantaggio per l'applicabilità industriale, in quanto viene limitata la completa sostituibilità del trattamento termico con questa tecnologia più moderna (Lanciotti e Patrignani, 2016).

3. Espressione genica

Il termine espressione genica definisce il processo attraverso il quale, l'informazione contenuta in un gene, costituito di DNA, viene convertita in una macromolecola funzionale, tipicamente una proteina, attraverso i meccanismi di trascrizione del DNA in mRNA e poi di traduzione dell'mRNA in proteina. Tale processo, attraverso cui l'informazione è trasferita dai geni alle proteine, è responsabile della specializzazione delle cellule di uno stesso organismo (fenotipo) dotate dello stesso corredo genetico (genotipo).

Inizialmente il gene era definito come la porzione di un cromosoma che influenza un singolo fenotipo, ovvero una singola caratteristica visibile dell'organismo. Successivamente, si definì il gene come quel segmento di materiale genetico che codifica una proteina (Andalò et al., 2014). Non tutti i geni sono sempre necessari alla vita di una cellula: alcuni geni, chiamati costitutivi, sono espressi sempre, altri invece solo quando se ne presenta l'esigenza. L'espressione dei geni è quindi regolata in base alle necessità della cellula, in base alle funzioni richieste e alle condizioni ambientali. L'analisi dell'espressione genica permette quindi di descrivere il fenotipo cellulare, cioè la manifestazione delle proteine che vengono effettivamente prodotte dalla cellula, nell'istante in cui si sta eseguendo l'indagine.

Perciò, la misurazione dell'espressione di un gene permette di fornire una valutazione quantitativa della presenza di trascritti, cioè delle molecole di RNA messaggero, o dei tradotti, cioè delle specifiche proteine, da essi codificati. Sono diversi i fattori determinanti lo stato di attivazione un gene, e quindi la potenziale presenza o assenza della corrispondente proteina. Per la misurazione della quantità relativa di mRNA è necessario selezionare più condizioni sperimentali. Infatti livelli alterati di una specifica sequenza di mRNA, indice di una variazione nella corrispondente proteina, potrebbero essere associati ad un cambiamento delle necessità cellulari. Tra le metodiche analitiche maggiormente impiegate per caratterizzare l'espressione genica troviamo la reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), che unita alla tecnica di Real-Time PCR consente un'accurata quantificazione del livello di espressione di geni d'interesse.

Retro-trascrizione

La Retro-trascrizione (RT) consiste nella sintesi, a partire dall' RNA, di una molecola di DNA chiamata cDNA, ovvero DNA complementare. L'enzima che catalizza questa particolare reazione viene chiamato trascrittasi inversa, e consiste in una particolare DNA polimerasi, che utilizza come filamento stampo una molecola di RNA. La trascrittasi inversa per poter catalizzare la sintesi di un filamento di cDNA, che sia complementare all'RNA necessita di:

- RNA stampo;
- deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs);
- primer, che servono da innesco per l'enzima. Questi possono essere Random Examer Primer, cioè sequenze oligonucleotidiche di 6 basi, che legano in maniera casuale le molecole dell'RNA; o Oligonucleotide Primer Di Poli-T, cioè sequenze oligonucleotidiche costituite da basi timina, che legano la coda poli-A dell'RNA.
- Soluzione tampone;
- Ioni Mg^{2+} .

Durante la reazione di Retro-trascrizione i primer si legano alle specifiche sequenze complementari di RNA, per venir poi estesi dell'enzima, formando un composto ibrido, dato da un filamento di cDNA e uno di RNA. Tale metodica analitica, ampiamente impiegata in

biologia molecolare, permette quindi di convertire l'mRNA in cDNA. Infatti il cDNA risulta essere una molecola più stabile e meno sensibile ai processi di degradazione. Il composto può essere così utilizzato nella reazione di Real-Time PCR, per determinare la quantità relativa di specifici trascritti (Andalò et al., 2014).

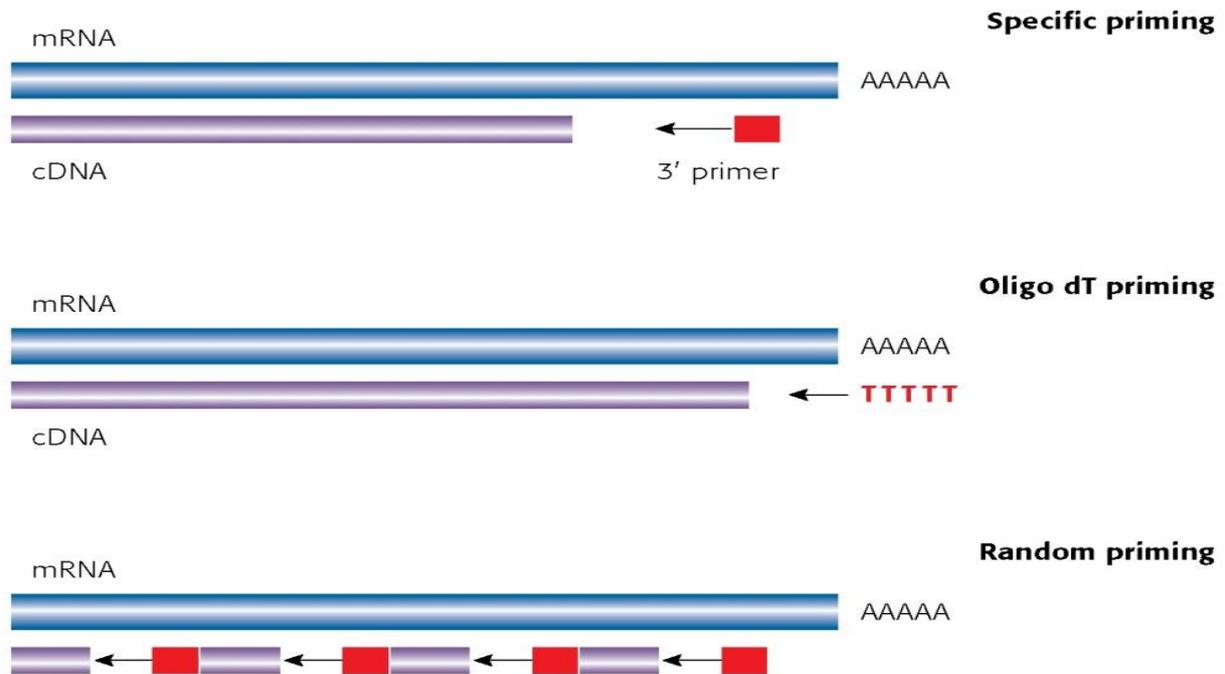


Figura 3. Reazione di Retro-Trascrizione (Andalò et al., 2014).

Reazione a Catena della Polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR)

La PCR è una reazione che permette la sintesi esponenziale di un segmento di DNA, a partire da un filamento di DNA stampo. È infatti una metodica di amplificazione degli acidi nucleici in vitro. È necessario che nella miscela di amplificazione sia presente la DNA-polimerasi, enzima che lega le sequenze oligonucleotidiche disegnate, per legarsi all'estremità della regione di interesse. Nella mix di reazione devono necessariamente essere presenti:

- Sequenza target: materiale genetico che contiene le regioni target da amplificare.
- DNA polimerasi: che deve essere termoresistente e termostabile come la “Taq pol”, polimerasi isolata dal batterio termofilo “*Thermus aquaticus*”, che resiste a temperature elevate, come quelle impiegate per denaturare il DNA.
- Due Primer: oligonucleotidi a singolo filamento complementari rispettivamente

all'estremità 3' e 5' della sequenza target. Sono gli elementi di innesco per l'attività dell'enzima.

- Soluzione buffer: soluzione salina che mantiene stabile il pH.
- Deossiribonucleotiditriposfati (dNTPs): singoli nucleotidi necessari per la sintesi di nuove eliche.
- $MgCl_2$: cofattore per l'attività della DNA polimerasi. Un parametro importante da valutare è la sua concentrazione, perché influenza la specificità dell'appaiamento dei primer e l'attività dell'enzima (Scialpi e Mengoni, 2008).

Il termociclatore riscalda e raffredda i tubi di reazione per ottenere le temperature richieste in ogni fase del processo. Le temperature utilizzate e il periodo di tempo in cui vengono applicate, in ciascun ciclo, dipendono da alcuni parametri come: il tipo di enzima utilizzato per la sintesi del DNA, la concentrazione degli ioni bivalenti, i dNTP presenti nella reazione e la temperatura di fusione dei primer (Rychlik et al., 1990).

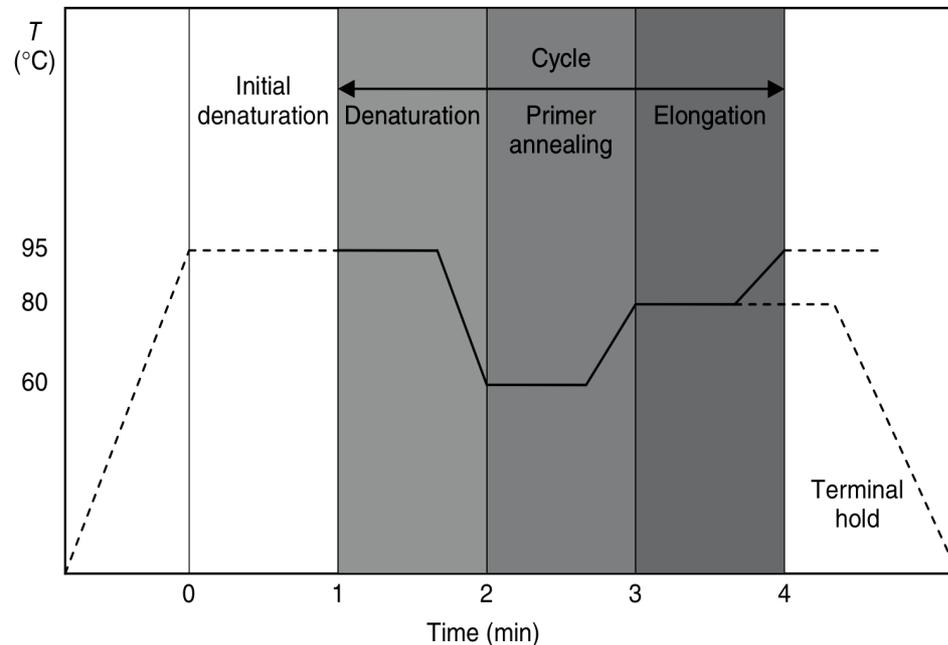


Figura 4. Profilo termico della PCR (Popp et al., 2015)

Il profilo termico della PCR è caratterizzato dall'alternanza di più fasi:

- Initialization: viene utilizzata una DNA polimerasi ibrida, non attiva a temperatura ambiente. L'attività della polimerasi è inibita dal legame degli anticorpi o dalla

presenza di effettori legati in modo covalente, che si dissociano solo dopo una fase di attivazione. Vengono usate temperature attorno 94-96 ° C o anche fino a 98 ° C, per polimerasi estremamente termostabili (Pavlov et al., 2006)

- Denaturation: avviene la fusione del DNA, cioè la scissione termica dei legami idrogeno tra le basi, a 94-98 ° C per 20-30 secondi.
- Annealing: si associano i primer al DNA modello. Le temperature sono comprese tra i 50-65 ° C per 20-40 secondi. La temperatura di annealing del primer (T_a) di solito è circa 3-5 ° C sotto la mediana del punto di melting (fusione) (T_m) del primer. Un T_a troppo alto produrrà un'ibridazione insufficiente tra primer e DNA modello, con conseguente bassa produzione dei prodotti di PCR; se invece il T_a risulta troppo basso può portare a prodotti non specifici, causati da un numero elevato di disallineamenti delle coppie di basi.
- Extension/elongation: sintesi enzimatica di un nuovo filamento di DNA complementare al filamento di DNA modello, aggiungendo dNTPs nella direzione 5'-3', condensando il gruppo 5'- fosfato dei dNTPs con il gruppo 3'- idrossile, alla fine del filamento di DNA che si sta creando. La temperatura è fortemente dipendente dagli enzimi, ad esempio fino a 75-80 ° C con un Taq polimerasi ottimale. Anche la velocità di estensione dipende dalla DNA polimerasi usata.

La lunghezza del frammento di DNA definisce la durata richiesta dell'intervallo di amplificazione. In condizioni ottimali, cioè senza limitazioni per quanto riguarda substrati o reagenti, l'amplificazione esponenziale è ottenuta da ciascun ciclo con solo piccole quantità di DNA (diversi femtogrammi). La reazione di solito diminuisce in modo incrementale quando i substrati sono limitati e si ferma, o raggiunge un plateau, se sono completamente esauriti (PCR end-point). La Taq polimerasi è in grado di amplificare frammenti di oltre 50 kb (Cheng et al., 2006).

- Final elongation: processo opzionale dopo l'ultimo ciclo. Serve per raggiungere un consumo massimo di nucleotidi, eseguito a 70-74 ° C per 5-15 minuti (Popp et al., 2015).

Real-Time PCR

L'invenzione della Reazione a Catena della Polimerasi (PCR) da parte di Kary Mullis, negli anni '80, ha avuto un forte significato nel campo della biologia molecolare. Attualmente la PCR risulta come una procedura abbastanza standard e il suo uso è estremamente ampio: dalla ricerca di base, fino a scopi clinici o altri scopi diagnostici. Nella sua applicazione più basilare, la PCR può amplificare una piccola quantità di DNA modello in grandi quantità, in pochi minuti o ore. Recentemente, è stato inventato un nuovo metodo di quantificazione della PCR chiamato Real-time PCR, che permette di vedere in tempo reale l'aumento effettivo della quantità di DNA che viene amplificata. La PCR di base è un'applicazione di tipo endpoint, in cui il target amplificato viene identificato solo dopo che è stato completato l'ultimo ciclo del processo PCR. Viene poi eseguita un'elettroforesi su gel, che separa il prodotto amplificato in base al suo peso molecolare. Poiché la PCR è una procedura esponenziale, in cui piccole variazioni nella quantità di molecole bersaglio introdotte nella PCR determinano grandi differenze nella quantità di prodotti finali, non è considerata quantitativa. La PCR in tempo reale ha la capacità di monitorare l'avanzamento della PCR mentre questa si verifica. Pertanto, i dati vengono raccolti durante l'intero processo PCR anziché alla fine della PCR, rivoluzionando la quantificazione del DNA e dell'RNA.

Al contrario, un dosaggio endpoint misura la quantità di prodotto della PCR che si accumula alla fine del ciclo di PCR.

La PCR di base e la PCR in tempo reale sono generalmente utilizzate, in un formato qualitativo, per valutare campioni biologici. Tuttavia, una vasta gamma di applicazioni, come la determinazione della presenza microbiologica e la caratterizzazione dell'espressione genica, sono migliorate mediante la determinazione quantitativa. La determinazione quantitativa in teoria, è abbastanza facile da ottenere, in base alla natura esponenziale della PCR. Esiste infatti una relazione lineare tra il numero di cicli di amplificazione e il logaritmo del numero di molecole, almeno in teoria. In pratica, tuttavia, l'efficienza dell'amplificazione è solitamente inferiore a causa della presenza di inibitori, dell'esaurimento del substrato, dell'inattivazione della polimerasi etc. All'aumentare del numero di cicli, l'efficienza dell'amplificazione diminuisce, di solito risultando in un effetto di plateau (Popping et al., 2010).

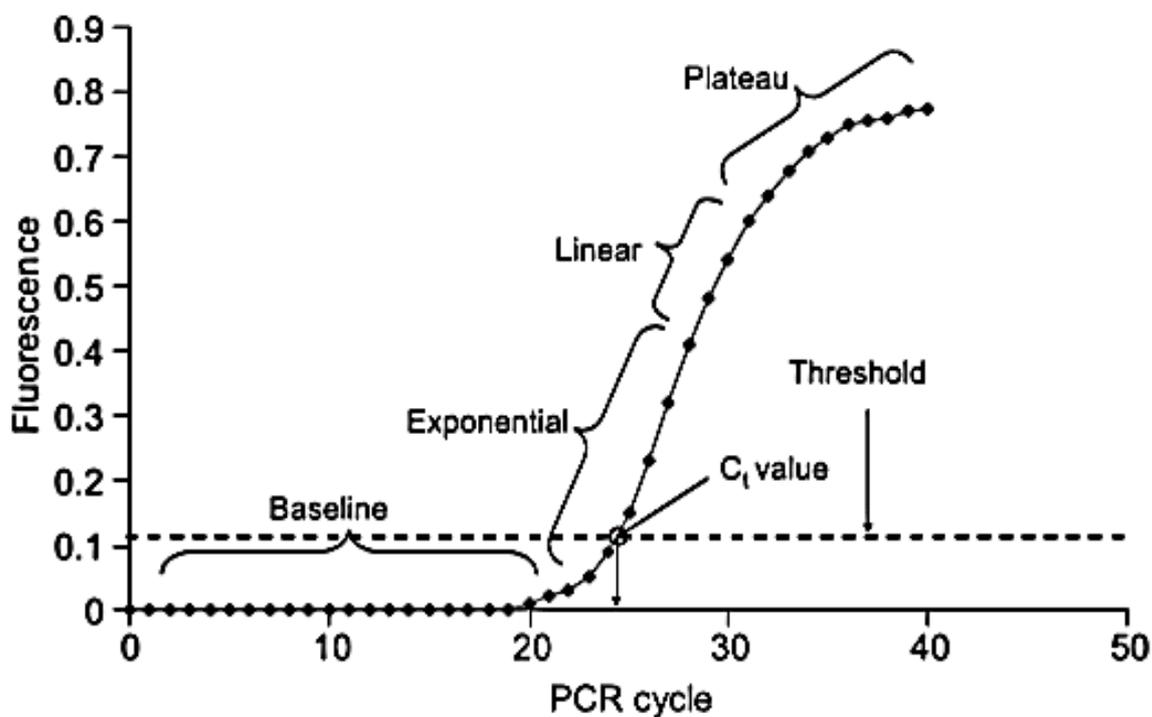


Figura 5. Real-time PCR plot (Popping et al., 2010).

I metodi qPCR (real-time PCR) consentono quindi la quantificazione di una data sequenza presente in un campione, come accumulo di prodotto DNA dopo ogni ciclo di amplificazione. Questa tecnica viene spesso applicata per determinare quantitativamente i livelli di espressione genica, in virtù della sensibilità elevata e consente sia il rilevamento, che la quantificazione come numero di copie assolute o come quantità relativa.

Il DNA amplificato, rilevato mentre la reazione progredisce in tempo reale, vede una misurazione di tipo fluorimetrica.

Due tecniche di colorazione ampiamente applicate sono:

- Coloranti fluorescenti non specifici, intercalano con qualsiasi dsDNA e quantitativamente all'interno di nuovi ampliconi sintetizzati. L'aumento del prodotto durante la PCR porta ad un aumento dell'intensità della fluorescenza, che viene misurato ad ogni ciclo, consentendo così di quantificare le concentrazioni di DNA. Tuttavia, il legame con prodotti di PCR non specifici, come i dimeri dei primer, può

potenzialmente interferire con la quantificazione accurata della sequenza target desiderata (Popp et al., 2015). Uno dei fluorofori più utilizzati è il SYBR® Green, molecola fluorescente che durante la reazione di PCR si intercala nel doppio filamento del DNA. Il complesso DNA-SYBR® Green assorbe luce blu ad una lunghezza d'onda $\lambda_{\max} = 488$ nm ed emette luce verde a una lunghezza d'onda $\lambda_{\max} = 522$ nm. Picchi di assorbimento, più deboli, si rilevano nella regione dell'ultravioletto. Il SYBR® Green poichè si intercala nel DNA a doppio filamento, non è adatto per quantificare RNA a singolo filamento (Ian M. Mackay, 2007). Durante la fase di denaturazione il SYBR® Green si trova libero nella miscela di reazione; successivamente nella fase di annealing esso si posiziona in maniera aspecifica nel solco minore del DNA. Nella fase di elongazione il colorante si intercala nella molecola di DNA e quando eccitato emette fluorescenza in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte (Andalò et al., 2014).

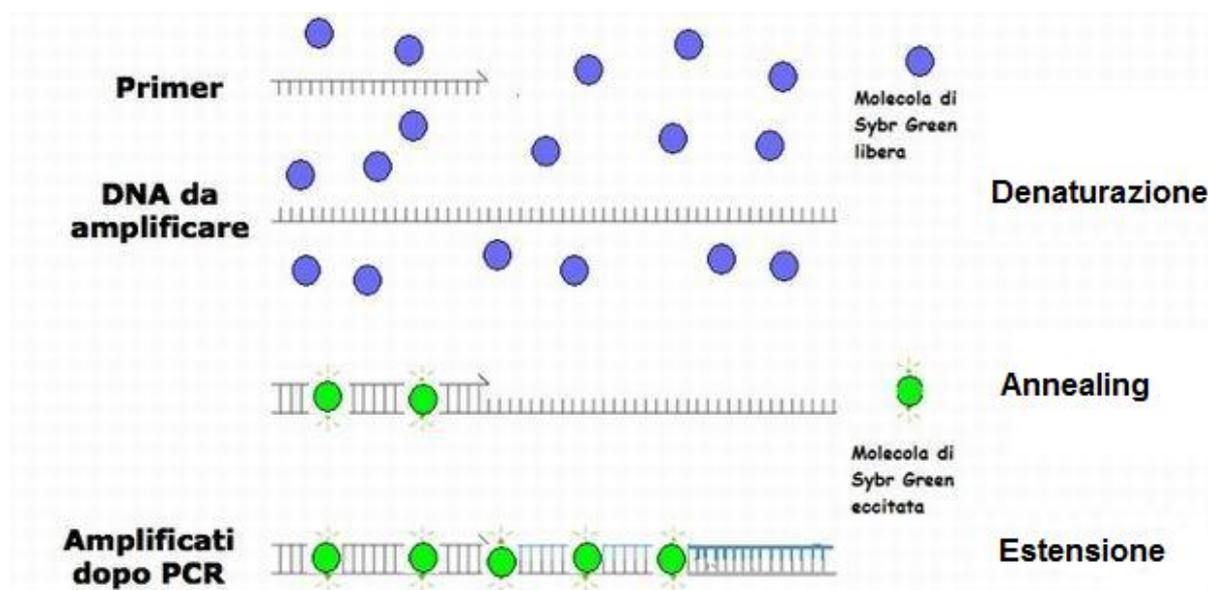


Figura 6. Incorporazione del SYBR nelle fasi di PCR (Andalò et al., 2014).

- Sonde di DNA specifiche per la sequenza, che si ibridizzano specificamente con sequenze target fuse (Popp et al., 2015). I metodi si basano su due progetti di sonda sostanzialmente diversi:

- Sonde idrolitiche, presentano rispettivamente alle due estremità un fluoroforo ad alta energia (reporter) e un inibitore del fluoroforo (quencher). Quando la sonda è appaiata alla sequenza bersaglio, l'inibitore è sufficientemente vicino al fluoroforo da bloccarne l'emissione del segnale fluorescente. Durante l'allungamento, in ogni ciclo di amplificazione, la polimerasi idrolizza la sonda. In questo modo il fluoroforo viene liberato nella miscela di reazione e si allontana dall'azione dell'inibitore, con conseguente emissione del segnale fluorescente. Quindi nelle analisi che utilizzano sonde idrolitiche l'emissione del segnale fluorescente dipende dall'attività della Taq DNA polimerasi. Le sonde idrolitiche vengono anche chiamate sonde TaqMan.
- Sonde di ibridazione, permettono di rilevare il segnale nel momento in cui si legano alla sequenza bersaglio. Esistono diversi modelli di sonde di ibridazione, tra queste troviamo un tipo di sonda che sfrutta il trasferimento di energia per risonanza fluorescente (FRET). Durante il processo di FRET, l'eccitazione di un fluoroforo donatore provoca il trasferimento di energia ad un fluoroforo accettore. Le sonde FRET sono formate da una coppia di oligonucleotidi, progettati in modo tale da ibridarsi sulla sequenza bersaglio. Il segnale che si rileva è proporzionale alla quantità di sonda ibridata e, di conseguenza, alla quantità di prodotto amplificato (Andalò et al., 2014).

Obiettivi

Negli ultimi anni i consumatori hanno dimostrato un maggiore interesse per il benessere legato all'alimentazione e alla dieta. Al fine di aumentare il benessere psicofisico dell'individuo, la ricerca nelle ultime decadi si è incentrata nell'individuazione di specifiche strategie alimentari, diete e alimenti. In questo contesto grande importanza hanno assunto gli alimenti funzionali, o meglio prodotti dotati di proprietà in grado di esercitare un effetto benefico sull'organismo umano, contribuendo in maniera significativa alla prevenzione di molteplici malattie (Sethi et al., 2016). Tra questi, quelli contenenti microrganismi probiotici, risultano particolarmente apprezzati dai consumatori (Patrignani et al., 2011). Si tratta di microrganismi, che se ingeriti vivi e in quantità adeguate sono in grado di apportare effetti benefici all'organismo umano (FAO/WHO, 2002). Diverse evidenze scientifiche suggeriscono come l'ingestione di probiotici siano in grado di alleviare e contribuire positivamente al decorso di diverse patologie, più o meno severe, che vanno dalla diarrea, alle gastroenteriti, alla sindrome del colon irritabile, immunodepressione, cancro e infezione del tratto genitourinario (Gupta and Garg, 2009; Hong et al., 2011). La maggior parte dei probiotici appartiene ai batteri lattici, microrganismi generalmente riconosciuti come sicuri e fondamentali per la produzione di molteplici alimenti fermentati, sia di origine animale che vegetale. Nelle preparazioni industriali o nei formulati farmaceutici probiotici prevalgono, infatti, ceppi delle specie *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus acidophilus*. Tra questi, *Lactobacillus acidophilus* risulta come una coltura probiotica ampiamente riconosciuta (Reid et al., 2003) e commercialmente distribuita. Quest'ultima specie, oltre ad includere ceppi di documentata attività probiotica di origine intestinale (Klaenhammer et al., 2000), comprende anche ceppi probiotici di origine alimentare. I dati della letteratura hanno messo in evidenza l'utilizzo del ceppo *Lactobacillus acidophilus* 08 come probiotico in diversi prodotti lattiero-caseari argentini. Infatti, si tratta di un ceppo che, oltre a possedere documentate attività probiotiche in vitro e in modelli animali e linee cellulari (Tabanelli et al 2013), è in grado di resistere molto bene durante i processi produttivi di caseificazione e durante la conservazione refrigerata in diversi formaggi

freschi e latti fermentati (Burns et al 2008). Queste caratteristiche sono fondamentali per i microrganismi probiotici, perché per esercitare un effetto benefico sul consumatore essi devono essere ingeriti a livelli compresi, a seconda del ceppo, tra 10^8 e 10^{12} CFU/giorno. Affinché possano essere assunti tali livelli, senza ingerire quantità dell'alimento incompatibili con l'apporto calorico ottimale, i microrganismi probiotici devono avere livelli di carico al momento del consumo non inferiori a 10^6 e 10^{10} CFU/g o mL. Tuttavia, la capacità di mantenere un'elevata vitalità durante i processi tecnologici e durante la conservazione refrigerata è una caratteristica piuttosto rara nei batteri lattici probiotici. Per questo motivo la ricerca ha cercato di individuare e ottimizzare delle strategie tecnologiche in grado di migliorare questa caratteristica fondamentale dei batteri probiotici, che devono essere inclusi negli alimenti (Patrignani et al., 2011). Tra le strategie studiate quella più promettente nel settore lattiero caseario è l'alta pressione di omogeneizzazione (HPH), per altro già implementata per più bassi livelli di pressione, nel settore lattiero caseario per la riduzione dei globuli di grasso del latte. Trattamenti sub-letali iperbarici sono stati inoltre impiegati con successo da differenti autori (Lanciotti et al., 2007) per modulare i profili metabolici e le attitudini probiotiche di diversi ceppi di batteri lattici starter e co-starter. In particolare, Tabanelli et al. (2013) hanno dimostrato che pressioni di 50 MPa, applicate a *Lactobacillus acidophilus* 08, sono in grado di modificarne l'idrofobicità di membrana, la capacità di auto aggregazione nonché la resistenza a stress gastrico-duodenali simulati, tutte proprietà che influiscono direttamente sulla capacità di adesione e colonizzazione del ceppo con gli epitelii intestinali. Come suggerito da Serrazanetti et al., 2015, la maggiore interazione/adesione dei ceppi probiotici con le cellule intestinali è attribuibile, a seguito dei trattamenti iperbarici, alle modificazioni che questi hanno sulle strutture cellulari più esterne, nello specifico la parete e la membrana cellulare. In particolare, la membrana è ritenuta essere uno dei bersagli più suscettibili alla pressione, ed è in grado di rispondere in maniera diversa al fine di minimizzare lo stress sub-letale a cui la cellula microbica va incontro durante il trattamento omogeneizzante (Serrazanetti et al., 2015). La membrana cellulare può rispondere agli stress sub-letali modificando la sua composizione lipidica per mantenere fluidità e funzionalità, conservando inalterato lo stato fisiologico cellulare (Rodríguez-Vargas et al., 2007; Montanari et al., 2010). Questo può senz'altro ripercuotersi sulle caratteristiche di idrofobicità, adesione e funzionalità delle cellule probiotiche (Tabanelli et al., 2015).

Tuttavia, ancora poco studiati sono i meccanismi genici che la cellula microbica mette in atto quando sottoposta a stress iperbarico (Patrignani et al., 2013). Oltre alla membrana cellulare, anche le strutture più esterne della cellula, incluse parete e spazio periplasmatico, sono riportate subire delle forti modificazioni in rapporto agli stimoli esterni, incluso il trattamento iperbarico. Pertanto, obiettivo della mia tesi è stato quello di valutare gli effetti delle alte pressioni di omogeneizzazione sulla vitalità, idrofobicità, ed espressione genica di *Lactobacillus acidophilus* 08, quando sottoposto a trattamenti sub-letali ad alta pressione di omogeneizzazione a 50 MPa. Nello specifico verrà valutata l'efficacia dei trattamenti iperbarici nell'indurre, o meno, l'espressione di geni il cui prodotto proteico è direttamente coinvolto nei fenomeni di interazione cellula-cellula e di adesione alle mucose gastro intestinali. I dati così ottenuti contribuiranno alla comprensione degli effetti che hanno le alte pressioni di omogeneizzazione sulla fisiologia delle cellule probiotiche, e se gli effetti che diversi autori hanno evidenziato siano esclusivamente di tipo transiente oppure provochino una risposta attiva nella cellula, inducendo significativi cambiamenti a livello trascrittomico.

Materiali e metodi

Caratteristiche del ceppo impiegato

La mia sperimentazione ha avuto come oggetto di studio la caratterizzazione genetica delle proprietà di adesione di un batterio lattico appartenente al genere *Lactobacillus*, specie *acidophilus*; nello specifico è stato investigato il ceppo *Lactobacillus acidophilus* 08. Il ceppo impiegato è stato precedentemente testato per le sue proprietà funzionali ed è comunemente usato, a livello commerciale nei prodotti lattiero-caseari (Burns, Reinheimer, Vinderola, 2011; Burns, Vinderola, Binetti, et al., 2008; Vinderola, Prosello, Ghiberto, & Reinheimer, 2000).

Cinetica di crescita

Il ceppo *Lb. acidophilus* 08, precedentemente conservato in congelamento (-80°C), è stato ripreso e rinfrescato più volte utilizzando MRS Broth (De Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid) come brodo di coltura. Ogni volta che si è proceduto con il rinfresco del ceppo, questo è stato poi incubato a 37°C per almeno 24 h. Il ceppo così vitale, con un carico iniziale di circa 10⁵ CFU/mL (Unità Formanti Colonia/mL), è stato poi inoculato in una beuta contenente 2,5 L di MRS Broth e incubato a 37°C. Il microrganismo oggetto di studio è stato campionato, in triplicato, ad intervalli regolari per 24 h, in modo da ottenere informazioni circa le variazioni di carico microbico, utili per descrivere la cinetica di crescita ed evidenziare il raggiungimento della fase stazionaria. Più nello specifico i tempi di campionamento corrispondono a T₀, T₁, T₂, T₃, T₄, T₆, T₇, T₁₆, T₁₇, T₁₈, T₁₉, T₂₀, T₂₂, T₂₃.

La curva di crescita, ottenuta dai dati di campionamento microbiologico, è stata poi modellata seguendo l'equazione di Gompertz modificata da Zwietering et al. (1990), determinando quindi i valori fondamentali, K, A, μ_{\max} , λ .

Campionamento microbiologico

Per effettuare i diversi campionamenti microbiologici sono state eseguite delle diluizioni seriali del campione tal quale, al fine di facilitarne la rilevazione e la conta in piastra. Ad ogni tempo, precedentemente definito, 100 μ L del campione di *Lb. acidophilus* 08 sono stati prelevati, dalla beuta in incubazione, ed inseriti in un microtubo contenente 900 μ L di soluzione

fisiologica sterile, ottenendo così una diluizione della concentrazione del campione di 10 volte. Dalla diluizione così ottenuta, denominata -1, è stata effettuata la diluizione successiva prelevando dalla stessa -1 100 μ L di liquido, opportunamente reso omogeneo grazie all'ausilio di un agitatore Vortex, ed inserendo tale volume in un altro microtubo contenente 900 μ L di soluzione fisiologica sterile. Per le diluizioni successive si è proceduto allo stesso modo. Per il campionamento sono state impiegate piastre petri con MRS Agar (De Man, Rogosa, Sharpe, Oxoid). L'MRS Agar, ottenuto miscelando in 1 litro di acqua distillata 52 g di MRS Broth e 16 g di Agar tecnico (Oxoid), è stato trattato termicamente in autoclave a 121°C per 15 minuti e posto nelle capsule di petri, sempre prestando attenzione a mantenere le condizioni di sterilità. Il metodo di campionamento utilizzato è quello dello spatolamento superficiale, il quale consiste nell'inserire e spatolare in piastra, in modo omogeneo, 100 μ L di campione. Le piastre spatolate sono state poste in incubazione a 37°C per circa 48 ore. Trascorso il periodo di incubazione, si è proceduto con il conteggio delle colonie di *Lb. acidophilus* 08 cresciute in piastra. In questo modo è stato possibile ottenere i valori di carico microbico corrispondenti ai vari tempi, necessari per la costruzione della curva di crescita del microrganismo.

HPH e Idrofobicità

La misura dell'idrofobicità è stata effettuata attraverso la valutazione dell'abilità del microrganismo di aderire al carbonio idrato. Nello specifico prima di procedere con il test dell'idrofobicità, il *Lb. acidophilus* 08 con un carico iniziale di circa 10^5 CFU/mL è stato inoculato in due beute contenenti ciascuna 2,5 L di MRS Broth. Le beute, poi, sono state incubate per 18 ore a 37°C, in modo da fornire al microrganismo inoculato le condizioni sufficienti per il raggiungimento della fase stazionaria. Raggiunta la fase stazionaria, la coltura del ceppo contenuta in una delle due beute ha subito il passaggio in omogeneizzatore PANDA (Niro Soavi, Parma, Italia) a 50 MPa. Le colture dei ceppi, sia l'eluato dall'omogeneizzatore, che il controllo, sono state raccolte dalla fase stazionaria tramite centrifugazione a 8000 giri per 10 minuti a 5°C e lavate 2 volte con soluzione fisiologica. La sospensione cellulare è stata poi aggiustata a un valore di A_{560nm} di circa 1.0, tramite la soluzione fisiologica.

Successivamente 3 ml della sospensione batterica, controllo e trattata con HPH, sono stati vortexati con 0,6 ml di n-esadecano per 180 secondi, tale operazione è stata replicata a tempi definiti dopo il trattamento HPH (minuti): T₀, T₅, T₁₀, T₁₅, T₂₀, T₃₀, T₄₅, T₆₀, T₇₅, T₉₀, T₁₀₅, T₁₂₀, T₁₅₀, T₁₈₀. Le due fasi sono state fatte separare per 1 ora a 37°C. Infine è stata rimossa la fase acquosa e misurata l'assorbanza a 560 nm.

La diminuzione di assorbanza della fase acquosa è indice dell'idrofobicità cellulare (H%) che è stata calcolata, secondo quanto descritto da Vinderola e Reinheimer (2003), con la formula seguente:

$$H(\%) = \frac{A_0 - A}{A_0} * 100$$

dove A₀ e A sono rispettivamente l'assorbanza prima e dopo l'estrazione con n-esadecano (Vinderola e Reinheimer 2003). Allo scopo di verificare che l'eventuale variazione di idrofobicità, a seguito del trattamento HPH a 50 MPa, non fosse dovuta a modifiche della vitalità cellulare, è stato effettuato un campionamento microbiologico, nelle stesse condizioni precedentemente descritte, della sospensione cellulare di *Lb. acidophilus* 08 dopo 15, 30, 60, 90 e 120 minuti dal trattamento con le alte pressioni di omogeneizzazione.

Estrazione DNA batterico e selezione dei primers

Prima di procedere con l'analisi dei profili di espressione genetica di *Lb. acidophilus* 08, a seguito dei trattamenti con le alte pressioni di omogeneizzazione, è stata necessaria la selezione dei primers, e l'ottimizzazione delle condizioni di reazione di Real-Time PCR da poter impiegare. Attraverso ricerca bibliografica è stato individuato un pool di geni coinvolti nella risposta generica agli stress e nel meccanismo di adesione cellulare con le mucose gastrointestinali. La lista dei geni è riportata in tabella (5).

Tabella 5. Lista dei geni e dei relativi primers considerati nella sperimentazione.

Gene	Primer 5'->3'	Riferimento bibliografico	T annealing (°C)
<i>groEL</i> (LBA0406)_FOR	GCTGTTAAGGCACCTGGTTTTG	Weiss et al, 2010	60°C
<i>groEL</i> (LBA0406)_REV	AAGGGCTGCAATGTCTTCAAG		
<i>dnaK</i> (LBA1247)_FOR	CGGCTTGGACAAAGATGATGA	Weiss et al, 2010	60°C
<i>dnaK</i> (LBA1247)_REV	ACGGAAACGTCGAAAGTACCA		
<i>clpP</i> (LBA0694)_FOR	GCAATCGGTATGGCAGCAT	Weiss et al, 2010	60°C
<i>clpP</i> (LBA0694)_REV	ACGCTTACCCTTTGTACCACTTG		
<i>slp A</i> (LBA0169)_FOR	AGGCAGATACTGAAAATGCCACTA	Weiss et al, 2010	60°C
<i>slp A</i> (LBA0169)_REV	TGCAGCTAATTCVGCAGGTTTAAC		
<i>mub</i> LBA 1392_FOR	TTGACACCTGCAAGTCCGATT	Weiss et al, 2010	60°C
<i>mub</i> LBA 1392_REV	ATGTTGCAGCAGCACTTTTAGG		
<i>mub</i> LBA 1709_FOR	AACACCGCCATCAACTGAGTAA	Weiss et al, 2010	60°C

<i>mub</i> LBA 1709_REV	TTACATCCCGACGGTTCGAT		
<i>fib</i> LBA1148_FOR	CAGCCAACGCTCAATATCCTAGA	Weiss et al, 2010	60°C
<i>fib</i> LBA1148_REV	AAATAGGTGCTTTGTCTGGATTAGC		
23S <i>rRNA</i> (LBA2002)_FOR	TGTCAGGTGGGCAGTTTGAC	Weiss et al, 2010	60°C
23S <i>rRNA</i> (LBA2002)_REV	TTGAGCGCCTCCGTTACAC		
<i>mub</i> 4356F_FOR	GTAATCGTGTTCTACATATACATAG	Ramiah et al., 2009	55°C
<i>mub</i> 4356R_REV	GGTTATAAAGTTAACAGCATTGTTC		
<i>slp</i> 4356F_FOR	GCACAACGCATACTACTACG	Ramiah et al., 2009	55°C
<i>slp</i> 4356R_REV	CTTGTCAACAGCCTTACCGT		
<i>eFTu</i> 4356F_FOR	GGTGCTATCTTAGTTGTTGC	Ramiah et al., 2009	55°C
<i>eFTu</i> 423R_REV	CAACCAAGTCGATCAATTCT		
<i>GADPH</i> 4356F_FOR	CTATCGTTTACTCAGTAAACCAAGA	Ramiah et al., 2009	55°C
<i>GADPH</i> 4356R_REV	CGTGGATAGTAGTCATAGTACCAAC		

Per ciascun gene e coppia di primers, al fine di individuare le condizioni ottimali di reazione, sono state allestite differenti reazioni a catena della DNA polimerasi, utilizzando come stampo DNA genomico di *Lb. acidophilus* 08, allo scopo di verificare l'effettiva specificità dei primers. A tal fine, si è proceduto inizialmente, con l'estrazione del DNA genomico di *Lb. acidophilus* 08 da coltura liquida. Dopo aver inserito 1 mL di coltura batterica in un microtubo da centrifuga da 1.5 mL sterile, questa è stata centrifugata per 5 minuti a 20 °C a 12000 giri. Al termine è stato rimosso il surnatante ed al pellet microbico sono stati aggiunti 200 µL di InstaGene matrix (Biorad). Il campione di DNA così ottenuto, è stato incubato per 25 min in bagnetto termostato a 56 °C. Al termine del periodo di incubazione, la miscela è stata mescolata ad alta velocità, con l'ausilio di un Vortex per 10 secondi, e posta nuovamente in incubazione per 8 minuti a 100°C. Il campione è stato poi miscelato e centrifugato a 12000 giri per 3 minuti. Dal surnatante, separatosi dopo centrifugazione, sono stati prelevati 100 µL, che sono stati inseriti in un nuovo microtubo. La resa di estrazione e la purezza del campione sono state successivamente valutate utilizzando un metodo spettrofotometrico. Attraverso l'impiego di uno spettrofotometro BioDrop µLite (BioDrop), è stata misurata la concentrazione totale di DNA estratto, e la purezza dei campioni mediante la valutazione del rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e 280 nm. Sono stati ritenuti puri solo i campioni di DNA genomico con un indice Abs 260nm/280nm compreso tra 1.9 e 2.1.

Il DNA genomico di *Lb. acidophilus* 08, così ottenuto, è stato successivamente diluito utilizzando acqua DNA/RNA free in modo da ottenere soluzioni a concentrazione finale nota pari a 10 ng/µL. Ottenuto così il DNA stampo a concentrazione nota, sono stati preparati i primers in modo tale che avessero una concentrazione finale 25 mM.

Per ciascuna coppia di primers selezionata dalla letteratura, il DNA genomico così diluito è stato successivamente utilizzato come stampo per differenti PCR di performance. A tale scopo è stata formulata una master mix per la reazione di PCR per ciascuna coppia di primers contenente:

- 2 µL di DNA 10 ng/µL;
- 0,5 µL di Primer Forward 25 mM, determinante l'inizio della regione da amplificare;
- 0,5 µL di Primer Reverse 25 mM, determinante la fine della regione da amplificare;
- 0,125 µL di Taq Polimerasi, enzima che copia la regione da amplificare;

- 0,5 μL di dNTPs, per la sintesi di nuovo DNA;
- 2,5 μL di Buffer, che fornisce l'ambiente chimico ideale per la Taq Polimerasi;
- 0,5 μL di MgCl_2 50 mM;
- 16,87 μL di H_2O distillata sterile DNA/RNA free.

È stata così preparata la miscela di reazione per ciascuna coppia di primers, prestando attenzione ad affiancare a ciascun campione il relativo bianco. Ogni bianco è stato ottenuto sostituendo, nella miscela di reazione, il DNA stampo con lo stesso volume di acqua distillata sterile. I campioni ed i relativi bianchi sono stati così inseriti in un termociclatore, per cui sono state definite le condizioni dei diversi cicli termici; in particolare le temperature di denaturazione, annealing, extension, rispettivamente di 92°C , 60°C e 72°C . Al termine della reazione, un'aliquota di ogni campione è stata sottoposta ad elettroforesi su gel di agarosio, per verificare la purezza dell'amplificato e l'assenza di frammenti aspecifici. In questo caso la separazione elettroforetica è stata svolta su un supporto solido, il gel d'agarosio, che ha agito da "setaccio" molecolare, favorendo il passaggio di molecole di dimensioni pari o inferiori a quelle dei pori del gel. Il gel d'agarosio è tra i più utilizzati per la separazione degli acidi nucleici, specie per frammenti con dimensioni comprese tra 50 bp e 10 kbp. Il gel è stato preparato in modo da ottenere una soluzione di agarosio al 3%, tenendo conto che la dimensione dei pori risulta inversamente proporzionale alla concentrazione di agarosio impiegata. Una volta versata nell'apposito vassoio, la sospensione è stata lasciata raffreddare a temperatura ambiente fino a completa gelificazione. I campioni, ed i rispettivi bianchi da separare, sono stati caricati in apposite fenditure, praticate nel gel in fase di solidificazione con setti dentellati (pettini). Preliminarmente alla fase di caricamento, ciascun campione e ciascun bianco è stato miscelato con un colorante fluorescente l'etidio bromuro, che è servito come marker visivo del progredire della migrazione elettroforetica. Inoltre sono anche stati caricati dei marcatori di taglia, ossia delle miscele di frammenti di DNA di lunghezza nota, per avere informazioni approssimative circa la dimensione dei frammenti dei campioni. Terminato il caricamento, la cella è stata chiusa ed è stato attivato il campo elettrico, applicando una differenza di potenziale. Al termine della migrazione sono stati visualizzati i frammenti di DNA, ponendo il gel in un trans-illuminatore dotato di lampade UV. Sulla base

dell'intensità delle bande visualizzate sono quindi stati selezionati i primer funzionanti: *groEL*, *clpP*, *slp*, *23S rRNA*, *efTU*

Preparazione stock di *Lb. acidophilus* con RNA protect

Sulla base dei risultati ottenuti con il test dell'idrofobicità, precedentemente descritto, l'analisi genica è stata svolta su *Lb. acidophilus* 08 controllo e *Lb. acidophilus* 08 trattato con le alte pressioni di omogeneizzazione, solo per le condizioni ottimali corrispondenti ai tempi T₅, T₃₀, T₆₀, T₉₀, T₁₂₀. Dopo aver inoculato il *Lb. acidophilus* 08 in una beuta con 1,5 L di MRS Broth ed aver posto in incubazione a 37 °C per 18 ore, il contenuto della stessa ha visto il passaggio in omogeneizzatore PANDA a 50 MPa. Si è quindi proceduto alla preparazione degli stock di *Lb. acidophilus* 08 con RNA protect sia per il non trattato T₀, che per i campioni trattati ad i tempi, precedentemente definiti, T₅, T₃₀, T₆₀, T₉₀, T₁₂₀. Nello specifico, in microtubi da 1.5 mL sterili sono stati aggiunti 750 µL di RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) e 750 µL di campione. Il contenuto è stato miscelato con il Vortex. Trascorsi 5 minuti, i microtubi sono stati centrifugati a 12000 giri per 7 minuti. Infine, eliminato il surnatante da ogni campione, si è proceduto con lo stoccaggio a -80 °C.

Purificazione RNA

Per la purificazione dell'RNA dei diversi campioni in esame T₀, T₅, T₃₀, T₆₀, T₉₀, T₁₂₀, stoccati in congelamento (-80°C) con RNA protect, è stato impiegato il MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit ed il relativo protocollo.

I materiali presenti nel Kit sono:

- Red Cell Lysis Solution;
- Tissue and Cell Lysis Solution;
- 2X T and C Lysis Solution;
- MPC Protein Precipitation Reagent;
- RNase A;
- RNase-Free DNase;

- Proteinase K;
- RNase Inhibitor;
- 1X DNase Buffer;
- TE Buffer.

La procedura consiste di più passaggi:

- 1 Diluire 1 μL di Proteinase K in 300 μL di Tissue and Cell Lysis Solution per ogni campione.
- 2 Aggiungere 300 μL di acqua distillata ad i pellet microbici dei campioni, stoccati precedentemente con RNA protect; centrifugare a 11000 giri per 10 minuti a 4 °C e scartare il surnatante lasciando circa 25 μL di liquido.
- 3 Agitare quindi con il Vortex per 10 secondi, in modo da risospendere il pellet cellulare.
- 4 Aggiungere 300 μL di Tissue and Cell Lysis Solution contenente la Proteinase K e mescolare accuratamente.
- 5 Incubare a 65°C per 15 minuti, mescolando con il Vortex ogni 5 minuti.
- 6 Porre in ghiaccio per 5 minuti, procedendo poi con la precipitazione della totalità degli acidi nucleici.
- 7 Aggiungere 150 μL di MPC Protein Precipitation Reagent ai 300 μL di campione lisato e agitare con il Vortex vigorosamente per 10 secondi.
- 8 Centrifugare a 11000 giri per 10 minuti a 4 °C.
- 9 Trasferire il surnatante in un microtubo nuovo e scartare il pellet.
- 10 Aggiungere 500 μL di isopropanolo al surnatante recuperato. Girare poi il microtubo 30-40 volte.
- 11 Centrifugare a 11000 giri per 10 minuti a 4 °C.
- 12 Rimuovere i residui di isopropanolo.
- 13 Preparare 200 μL di DNase I solution per ogni campione, diluendo 5 μL di RNase-Free DNase in 200 μL di 1X DNase Buffer.
- 14 Risospendere il pellet, contenente la totalità degli acidi nucleici, in 200 μL di DNase I solution.
- 15 Incubare a 37 °C per 10 minuti.

- 16 Aggiungere 200 μ L di 2X T and C Lysis Solution e miscelare con il Vortex per 5 secondi.
- 17 Aggiungere 200 μ L di MPC Protein Precipitation Reagent, miscelare con il Vortex per 10 secondi e porre in ghiaccio per 5 minuti.
- 18 Centrifugare 2 volte a 11000 giri per 10 minuti a 4 °C.
- 19 Trasferire il surnatante contenente l'RNA in un nuovo microtubo e scartare il pellet.
- 20 Aggiungere 500 μ L di isopropanolo al surnatante recuperato. Girare poi il microtubo 30-40 volte.
- 21 Centrifugare a 11000 giri per 10 minuti a 4 °C.
- 22 Rimuovere i residui di isopropanolo, prestando attenzione a non intaccare il pellet contenente l'RNA.
- 23 Risciacquare per 2 volte il pellet con etanolo al 70%.
- 24 Risospendere l'RNA in 35 μ L di TE Buffer.
- 25 Stoccare in congelamento a - 80 °C.

Terminata la procedura è stata misurata, per ogni campione, la resa estrattiva in RNA con BioDrop μ Lite. Le rese sono risultate elevate, comprese tra i 200 e 1200 ng/ μ L di RNA con $A_{260/280}$ di circa 2. Si è quindi proceduto con una successiva reazione di retrotrascrizione dell'RNA, dopo aver standardizzato la concentrazione in RNA per ciascun campione a 700 ng/ μ L.

Retrotrascrizione di RNA in cDNA

La reazione di retrotrascrizione dell'RNA estratto in complementary DNA (cDNA), è stata effettuata, utilizzando come stampo l'RNA totale di *Lb. acidophilus* 08 trattato o meno con l'HPH, ricorrendo al kit commerciale ImProm-IITM Reverse Transcription System (Promega) ed al relativo protocollo. La reazione consta di due fasi. La prima è caratterizzata dalla denaturazione dell'RNA target e dall'attacco dei random primers (random esameri), passaggi necessari per il successo della seconda fase in cui avviene la retrotrascrizione in cDNA. Nello specifico, per ogni campione (T₀, T₅, T₃₀, T₆₀, T₉₀, T₁₂₀), è stata formulata una

prima miscela di reazione da inserire in microtubo da centrifuga da 200 μL comprendente:

- 1 μL di RNA target 700 ng/ μL ;
- 2 μL Random oligo esameri (0.5 μg /campione);
- 2 μL di Nuclease-Free water.

I campioni così preparati sono stati posti in un termociclatore a 70 °C per 5 minuti. Al termine dell'incubazione, questi sono stati prontamente raffreddati in ghiaccio per 5 minuti. Successivamente in ciascun campione è stata aggiunta la miscela di retrotrascrizione contenente:

- 7.8 μL di Nuclease-Free water;
- 4 μL di ImProm-IITM 5X Reaction Buffer;
- 1.2 μL di MgCl_2 1.5 mM;
- 1 μL di dNTP Mix 0.5mM;
- 1 μL di ImProm-IITM Reverse Transcriptase.

I campioni così preparati sono stati nuovamente trasferiti in termociclatore. La reazione di retrotrascrizione ha consistito in: una fase iniziale di annealing (25°C per 5 minuti), seguita dalla fase di retrotrascrizione vera e propria (42°C max 1 ora). La reazione, terminata l'incubazione, è stata arrestata attraverso un trattamento termico d'urto a 72°C per 3 minuti. Il cDNA così formato, assumendo una efficienza di reazione di retrotrascrizione prossima al 100%, è stato poi diluito in modo da produrre soluzioni stock di cDNA per i differenti tempi dopo il trattamento HPH ($T_0, T_5, T_{30}, T_{60}, T_{90}, T_{120}$) pari a 5 ng/ μL .

Real-Time qPCR

L'espressione genica dei diversi campioni di cDNA 5 ng/ μL è stata valutata fluorimetricamente, utilizzando SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa).

Per ogni campione è stata creata una miscela, con un volume di 11.5 μL , contenente:

- 8 μL di SYBR Premix Ex TaqTM;

- 0.25 μL di Primer Forward 25 mM;
- 0.25 μL di Primer Reverse 25 mM;
- 3 μL di H_2O DNA Free.

Per ogni coppia di primers, precedentemente testata, sono stati analizzati 26 campioni così costituiti:

1. : 1 μL di DNA genomico 50 ng/ μL + 11.5 μL di mix
2. 1 μL di DNA genomico 25 ng/ μL + 11.5 μL di mix
3. 1 μL di DNA genomico 15 ng/ μL + 11.5 μL di mix
4. 1 μL di DNA genomico 10 ng/ μL + 11.5 μL di mix
5. 1 μL di DNA genomico 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
6. 1 μL di DNA genomico 2 ng/ μL + 11.5 μL di mix
7. 1 μL di H_2O DNA Free+ 11.5 μL di mix (bianco)
8. 1 μL di H_2O DNA Free+ 11.5 μL di mix (bianco)
9. 1 μL di cDNA T_0 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
10. 1 μL di cDNA T_0 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
11. 1 μL di cDNA T_0 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
12. 1 μL di cDNA T_5 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
13. 1 μL di cDNA T_5 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
14. 1 μL di cDNA T_5 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
15. 1 μL di cDNA T_{30} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
16. 1 μL di cDNA T_{30} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
17. 1 μL di cDNA T_{30} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
18. 1 μL di cDNA T_{60} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
19. 1 μL di cDNA T_{60} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
20. 1 μL di cDNA T_{60} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
21. 1 μL di cDNA T_{90} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
22. 1 μL di cDNA T_{90} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
23. 1 μL di cDNA T_{90} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix
24. 1 μL di cDNA T_{120} 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix

25. 1 μL di cDNA T₁₂₀ 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix

26. 1 μL di cDNA T₁₂₀ 5 ng/ μL + 11.5 μL di mix

I 26 campioni, così formati, sono stati inseriti nel termociclatore per analisi RT-qPCR, di cui sono state definite le condizioni per i diversi cicli termici; in particolare le temperature di denaturazione, annealing, extension, rispettivamente di 92°C, 60-61°C e 72°C.

Analisi dei profili di espressione genica

Le espressioni geniche relative (RGE) sono state determinate secondo le linee guida MIQE (Bustin et al, 2009) utilizzando il modello matematico proposto da Pfaffl (2001) e riesaminato da Muller et al. (2002) (Figura 7).

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta\text{CP}_{\text{target}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta\text{CP}_{\text{ref}} (\text{MEAN control} - \text{MEAN sample})}}$$

Figura 7. Modello matematico per la valutazione delle espressioni geniche relative (RGE), proposto da Pfaffl (2001) e riesaminato da Muller et al. (2002).

Il modello matematico è un'espressione relativa, applicata in Real-Time PCR, i cui componenti sono rappresentati da:

- E_{target} : efficienza della Real-Time di un gene target trascritto;
- E_{ref} : efficienza della Real-Time di un reference gene trascritto;
- $\Delta\text{CP}_{\text{target}}$: differenza del Crossing Point del gene target nella condizione di controllo, rispetto alla condizione sperimentale;

- ΔCP_{ref} : differenza del Crossing Point del gene di riferimento nella condizione di controllo, rispetto alla condizione sperimentale;

L'espressione genica è stata normalizzata utilizzando come gene di riferimento il gene codificante per l'RNA ribosomiale 23S. La stabilità di espressione nelle condizioni sperimentali adottate è stata valutata tramite diversi parametri statistici utilizzando il BestKeeper© tool program (Pfaffl et al, 2004; Tasara & Stephan, 2007).

Analisi statistiche

Sono state eseguite tre repliche indipendenti per tutti gli esperimenti. I dati sono stati confrontati usando il t-test, al fine di valutare la significatività dei risultati ottenuti rispetto al controllo non trattato. Le differenze con $p < 0.05$ sono state considerate statisticamente significative.

Risultati

Cinetica di crescita

Al fine di descrivere la cinetica di crescita del ceppo di *Lactobacillus acidophilus* 08, ed individuare il raggiungimento della fase stazionaria di crescita, questo è stato campionato ad intervalli regolari nell'arco di 24 h. I livelli di carico microbico, corrispondenti ai vari tempi del campionamento microbiologico, hanno permesso la costruzione di una curva in grado di descriverne le varie fasi dello sviluppo cellulare (Figura 8). La cinetica è stata modellata secondo il modello di Gompertz modificato da Zwietering et al. (1990) (Figura 8). In tabella (6) sono riportati i parametri ottenuti dalla modellazione dei dati.

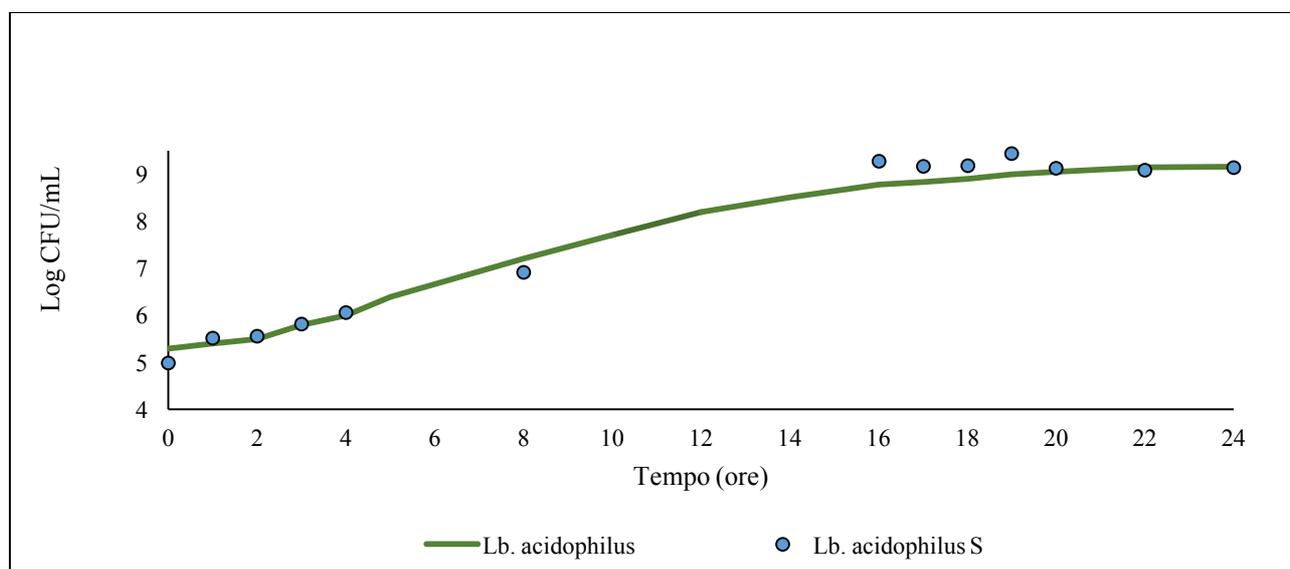


Figura 8. Curva di crescita di *Lb. acidophilus* 08 in terreno di coltura MRS incubato a 37°C. Il carico di inoculo iniziale era pari a 5 log CFU/mL. La linea continua rappresenta la curva modellata secondo Gompertz e modificata da Zwietering et al. (1990).

Tabella 6. Parametri di crescita del modello di Gompertz, modificato da Zwietering et al. (1990) di *Lb. acidophilus* 08 in sistema modello (MRS a 37°C).

K	A	μ_{\max}	λ
0.309	5.160	4.092	1.283

Il ceppo di *Lb. acidophilus* 08, a cui sono state fornite le condizioni di crescita ottimali, in termini di terreno di coltura e temperatura di incubazione, è stato inoculato con un carico iniziale di 10^5 CFU/mL. In questo modo si spiega il livello di carico microbico corrispondente al T_0 . Dall'osservazione del carico cellulare, relativo alle prime ore di campionamento ($T_0 - T_7$) e dall'andamento della relativa parte di curva, risulta evidente come la fase di sviluppo cellulare a cui ci si riferisca sia quella esponenziale. Prestando attenzione all'andamento della restante parte di curva, riferita ai tempi $T_{16} - T_{23}$, questa risulta più lineare, con livelli di carico più alti e costanti, rispetto alla fase successivamente descritta. Per questi motivi, sulla base dei risultati ottenuti, possiamo affermare come il ceppo di *Lb. acidophilus* 08, con un livello di inoculo di circa 5 log CFU/mL, incubato nelle condizioni ottimali per la sua crescita, riesca dopo circa 18 ore a raggiungere la fase stazionaria di crescita.

Idrofobicità di membrana

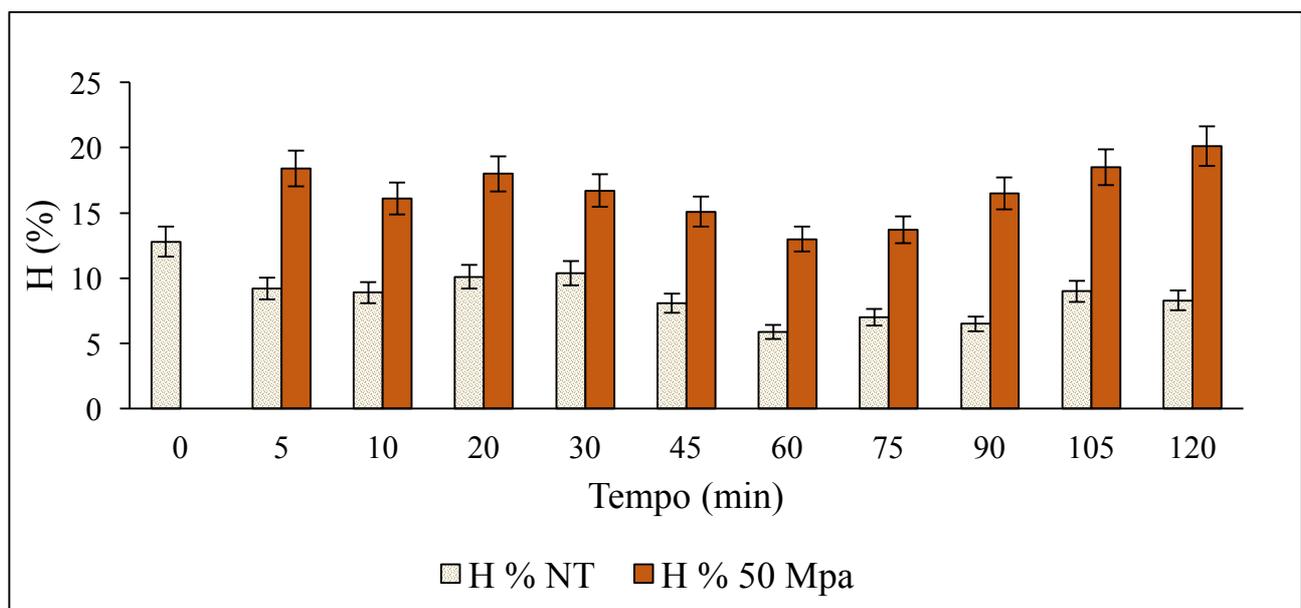


Figura 9. Evoluzione nel tempo (minuti) della idrofobicità di membrana espressa come indice percentuale H di *Lb. acidophilus* 08 a seguito o meno del trattamento iperbarico HPH a 50 MPa.

Come illustrato nella figura (9) l'idrofobicità di membrana del ceppo di *Lactobacillus acidophilus* 08, in fase stazionaria, presenta un caratteristico pattern, in funzione o meno della pressione di esercizio dell'omogeneizzatore. Specificatamente, il trattamento a 50 MPa

induce un sensibile incremento dell'idrofobicità di membrana delle cellule di *Lb. acidophilus* 08, se comparato con il controllo non trattato (Figura 9). In accordo con Tabanelli et al., 2012, per il ceppo non trattato è stato registrato un valore d'idrofobicità costante nel tempo e compreso tra il 5 e il 10 %. Diversamente le cellule di *Lb. acidophilus* 08, hanno mostrato a seguito dell'omogeneizzazione a 50 MPa, un caratteristico profilo, che si discosta dai dati della letteratura, probabilmente a causa del diverso stato fisiologico delle cellule studiate. Già dopo i primi 5 minuti si è verificato, in confronto al controllo non trattato, un aumento dell'indice di idrofobicità (H) pari al 13%. L'effetto si è poi protratto nell'arco dei successivi 30 minuti, a cui è seguita una riduzione di idrofobicità dopo un'ora dal trattamento. A tale diminuzione ha fatto seguito un progressivo aumento percentuale dell'indice di idrofobicità fino a valori prossimi a quelli iniziali, dopo il trattamento HPH e comunque superiori rispetto al non trattato (Figura 9). Al fine di verificare che la modulazione della idrofobicità, a seguito delle alte pressioni di omogeneizzazione applicate, non fosse correlata ad una diminuzione della vitalità cellulare, nel corso della prova sono stati effettuati campionamenti microbiologici, sia sul campione di *Lb. acidophilus* 08 di controllo, che su quello trattato. Come riportato in figura (10) i dati microbiologici non hanno evidenziato differenze significative, in termini di variazione di carico microbico tra le due popolazioni cellulari, suggerendo che, sebbene il trattamento iperbarico induca una variazione delle proprietà di membrana questa non è imputabile ad una diminuita vitalità cellulare.

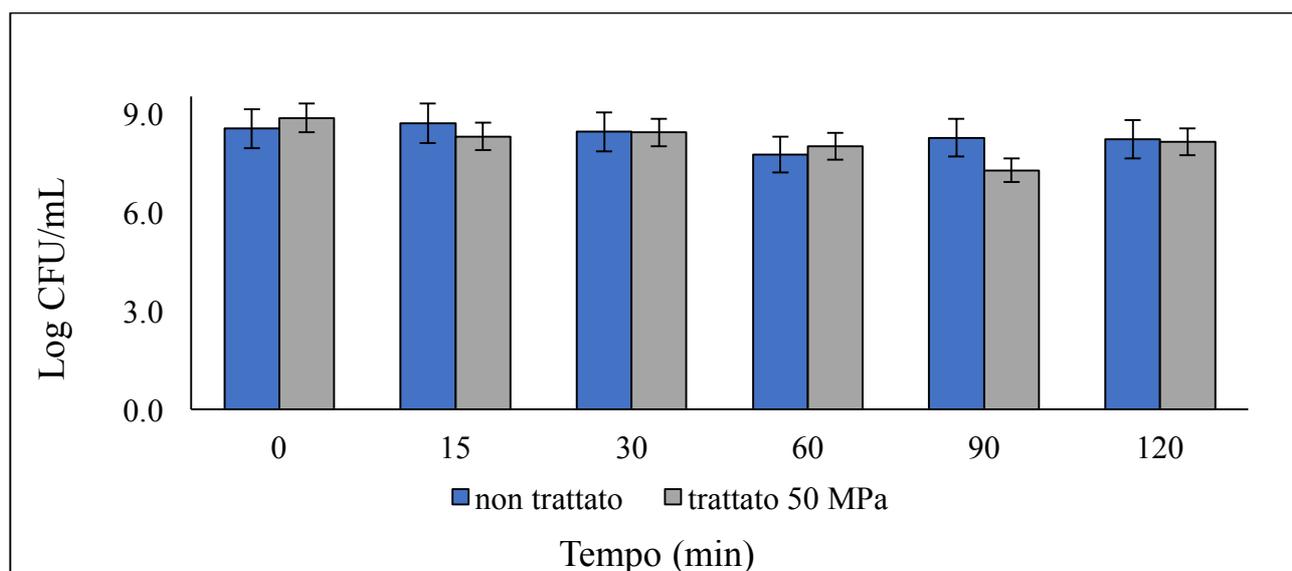


Figura 10. Evoluzione nel tempo (min) del carico cellulare (log CFU/mL) di *Lb. acidophilus* 08 a seguito o meno del trattamento iperbarico HPH a 50 MPa.

Valutazione dell'effetto delle alte pressioni di omogeneizzazione sull'espressione genica relativa

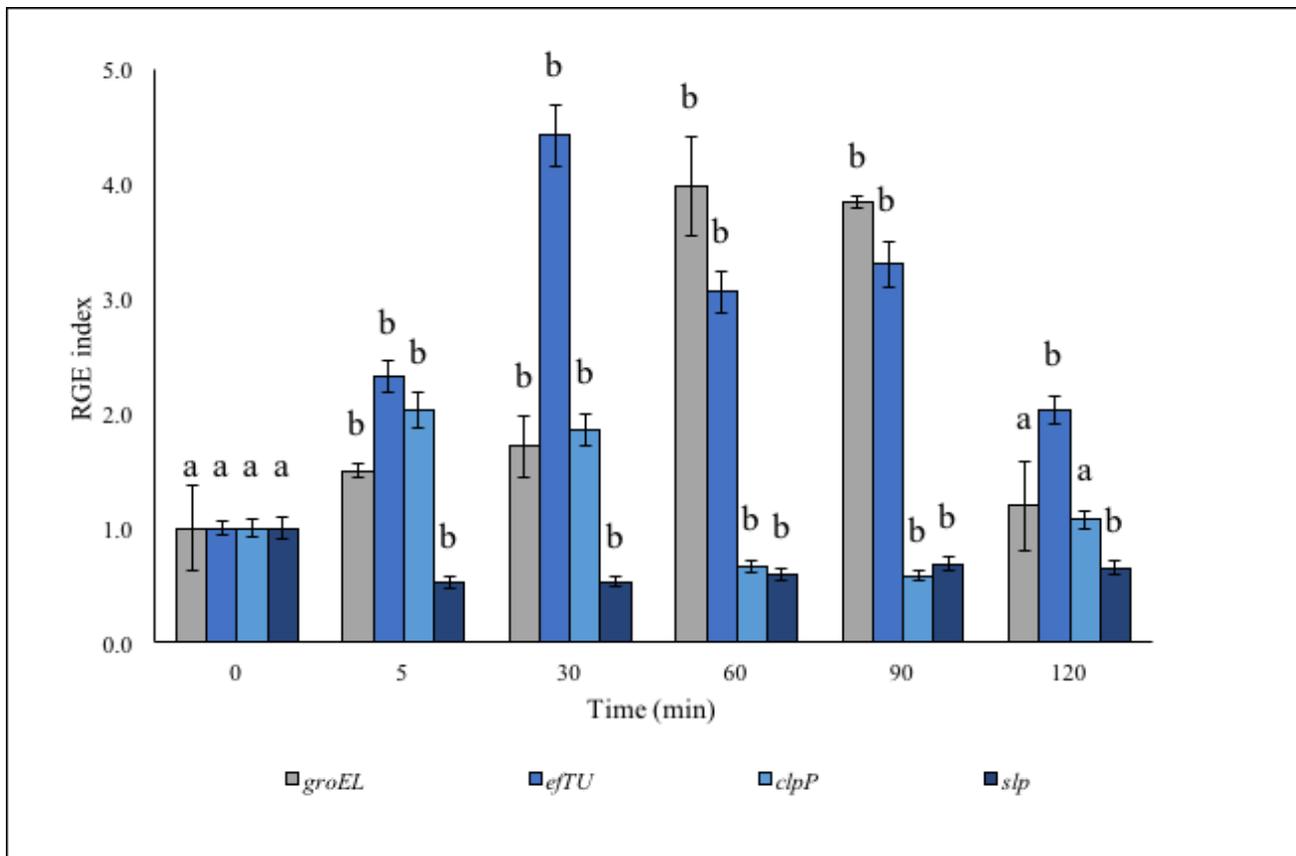


Figura 11. Espressione genica relativa (RGE index) dei geni oggetto di studio *groEL*, *eTU*, *clpP*, *slp* a seguito del trattamento iperbarico HPH a 50 MPa. L'espressione genica è stata normalizzata sulla base della espressione del gene 23S rRNA. Lettere diverse indicano campioni significativamente diversi ($p < 0.05$).

Il trattamento iperbarico ha provocato una caratteristica modulazione dei differenti geni di *Lactobacillus acidophilus* 08 presi in considerazione nella sperimentazione. Nello specifico, il trattamento iperbarico a 50 MPa ha determinato una specifica modulazione sia dei geni direttamente coinvolti nella risposta generica agli stress, che nei fenomeni di adesione cellulare. Per quanto riguarda la risposta agli stress, il trattamento HPH sub-letale ha provocato una specifica modulazione dei geni *groEL* e *clpP*, codificanti complessi proteici coinvolti nella riparazione delle proteine danneggiate. Nello specifico *groEL* codifica per l'omonima proteina GroEL, che assieme a GroES e DnaK costituiscono un fondamentale

complesso di riparazione delle proteine denaturate, ampiamente conservato tra le specie microbiche e non solo (Weiss et al., 2010). Queste proteine, infatti, appartengono alla eterogenea classe delle chaperonine, la cui funzione è quella di indurre il corretto ripiegamento dei polipeptidi denaturati, a seguito dell'esposizione a differenti stress come ad esempio l'esposizione ad acidi e basi, alle alte concentrazioni saline, all'etanolo, all'ossigeno e al calore (Hartl, 1996; Saibil, 2008; Wickner et al., 1999). Quando le chaperonine falliscono nel ripiegamento delle proteine danneggiate, la proteina ClpP agisce come "molecular scavenger" degradandole. A seguito del trattamento è stata registrata una particolare modulazione del gene *clpP*. Inizialmente è stato riscontrato, durante i primi 30 minuti, un incremento dell'espressione di due volte superiore rispetto al controllo non trattato (Figura 10), a cui è seguito una riduzione del livello di espressione. Tale effetto negativo si è poi attenuato dopo 2 ore (120 minuti) dal trattamento (Figura 11). Diversamente, il trattamento iperbarico ha avuto un effetto esclusivamente positivo sulla espressione del gene *groEL* (Figura 11). L'effetto induttivo, registrato sul suddetto gene, è massimo tra i 60 e 90 minuti (RGE index >3.5), dal trattamento a 50 MPa. Questo fenomeno tende poi a ridursi drasticamente con il tempo, attestandosi a valori prossimi a quelli iniziali (RGE index = 1) dopo 120 minuti. Un profilo simile di espressione genica per *clpP* e *groEL* è stato in parte riscontrato da Weiss et al., (2010) in studi condotti su *Lactobacillus acidophilus* NCFM di digestione gastrica e duodenale simulata. Nello specifico la digestione gastrica ha avuto un effetto induttivo sul gene *groEL*, associato a moderati incrementi nella espressione del gene *clpP*. Al contrario la digestione duodenale simulata provocava un trend opposto (Weiss et al., 2010). Questi dati, come precedentemente accennato, sono parzialmente in accordo con quanto evidenziato nella sperimentazione, suggerendo come il trattamento HPH a 50 MPa induca una risposta agli stress simile a quella da stress acido. Sebbene GroEL presenti una localizzazione prevalentemente intracellulare (Gupta et al., 1995), diversi autori ne hanno identificato la presenza sulla membrana e sulla parete cellulare di diversi microrganismi, sia patogeni, che con proprietà probiotiche.

Bergonzelli e collaboratori (2006), attraverso saggi immuno-enzimatici ELISA, hanno dimostrato come *Lactobacillus johnsonii* La1 NCC 533 presenti sulla superficie esterna della parete cellulare la proteina GroEL. Si tratta infatti di una proteina definita a comportamento "moonlight", capace, sebbene priva di segnali di localizzazione extracellulare, di essere

traslocata all'esterno della cellula dove svolge le medesime funzioni di binding proteico, ma con finalità completamente diverse. A livello extracellulare, GroEL media fenomeni di adesione cellula-cellula e cellula-mucosa intestinale (Bergonzelli et al., 2006). La letteratura individua anche, come proteina a comportamento moonlight, il prodotto dell'espressione del gene *eftU* (Granato et al., 2004). Questo gene codifica per l'elongation factor TU, proteina che facilita il corretto trasferimento degli aminoacil-tRNA ai ribosomi, durante la sintesi proteica (Gaucher et al., 2001). Analogamente a GroEL, anche questa proteina non presenta nella sequenza amminoacidica un segnale di localizzazione e ancoraggio di tipo LPXTG al peptidoglicano, costituente della parete cellulare. Tuttavia è stato dimostrato come questa proteina possa mediare funzioni di ancoraggio e di interazione con le mucose intestinali in diverse specie batteriche quali *Escherichia coli*, batteri coinvolti nell'alterazione del sake (Nakamura et al., 1997) e *Lactobacillus johnsonii* La1 NCC 533 (Granato et al., 2004). Sebbene questo comportamento sia noto, frammentarie sono le informazioni relative al meccanismo con cui questo fattore agisce nel mediare l'adesione alle mucose intestinali.

A seguito del trattamento iperbarico a 50 MPa, l'espressione del gene *eftU* in *Lb. acidophilus* 08 mostra un andamento nel tempo simile al gene *groEL* (Figura 11). L'espressione del gene presenta infatti un andamento crescente nel tempo, con un massimo di espressione tra i 30 e 90 minuti (RGE index compreso tra 4.5 e 3.0) (Figura 11), a cui fa seguito una progressiva diminuzione dell'induzione genica.

Come riportato in letteratura da Ramiah et al., 2009, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, sviluppato in ambiente gastroduodenale simulato (MRS supplementato con mucina, sali biliari e pancreatina), determina una induzione consistente del gene *eftU* di 40 volte superiore rispetto al medesimo ceppo cresciuto in condizioni ottimali. I dati ottenuti sembrano quindi indicare come il trattamento sub-letale di omogeneizzazione, condotto a 50 MPa, abbia un caratteristico effetto induttivo transiente sui geni *clpP*, *groEL* ed *eftU*, simulando una risposta fisiologica della cellula di *Lb. acidophilus* 08 simile allo stress acido, tipico del tratto gastrointestinale. Tenendo in considerazione il comportamento "moonlight" delle proteine codificate dai geni *groEL* ed *eftU*, in queste condizioni non è possibile stabilire univocamente se il meccanismo di risposta attivato costituisca un meccanismo di preservazione della cellula, o di aumento delle proprietà di adesione della stessa. Al fine di comprendere in modo più approfondito gli effetti sulla adesione, la mia sperimentazione ha indagato gli effetti del

trattamento HPH sul gene *slp* di *Lb. acidophilus* 08. Il gene *slp* codifica per la S-layer protein, proteina chiave nel mediare l'adesione dei lattobacilli all'epitelio intestinale, permettendo l'ancoraggio della parete cellulare allo stato glicoproteico delle mucose (Avall- Jaaskelainen et al., 2003; Frece et al., 2005; Schneitz et al., 1993). L' omogeneizzazione a 50 MPa induce una forte sotto-espressione del gene *slp*. Tale effetto negativo si acuisce nel tempo, attestandosi a valori di 0.5 rispetto alle cellule di *Lb. acidophilus* 08 non trattate.

L'effetto registrato mima il comportamento modulatorio di *slp* a seguito della digestione gastrica (Weiss et al., 2010). Diversamente Ramiah et al., 2009 ha riscontrato che simulando le condizioni tipiche del tratto duodenale (0.3% w/v bile; 0.3% w/v pancreatina; pH 6.5), caratterizzate da un pH maggiore, si registra una sensibile sovraespressione dello stesso gene. Analogamente, anche analisi di microarray sull'intero genoma del ceppo *Lactobacillus acidophilus* NCFM a seguito della crescita in presenza di succhi bilari hanno mostrato una up regolazione di diversi geni coinvolti nei meccanismi di adesione, come le mucin e fibronectin-binding proteins, suggerendo come le condizioni duodenali stimolino il potenziale adesivo di *Lb. acidophilus* (Pfeiler et al., 2007). I dati della sperimentazione mostrano, in accordo con gli studi presenti in letteratura, come i trattamenti di omogeneizzazione subletali, nello specifico a 50 MPa inducano una risposta fisiologica specifica di *Lb. acidophilus* 08, che mima, in parte, la risposta delle cellule di differenti ceppi, appartenenti alla stessa specie, alle avverse condizioni del tratto gastrointestinale, con riferimento alla digestione gastrica. Le differenze, nel livello e nei pattern di espressione riscontrati, possono quindi essere ricondotte a differenze geniche intra-specie e specifiche del ceppo oggetto di studio.

Conclusioni

I risultati derivanti dalle ricerche condotte nel corso della mia sperimentazione, offrono importanti spunti per la comprensione dei meccanismi di risposta genica, implicati nei fenomeni di idrofobicità cellulare, adottati da *Lactobacillus acidophilus* 08, a seguito del trattamento di alte pressioni di omogeneizzazione. In primo luogo è importante evidenziare, tenendo conto dei dati di carico cellulare, la barotolleranza dimostrata dal ceppo di *Lb. acidophilus* 08 nei confronti di stress subletali di 50 MPa. Inoltre, tale trattamento ha indotto un sensibile incremento nell'idrofobicità di membrana delle cellule di *Lb. acidophilus* 08 trattate, rispetto alle cellule del controllo. Ciò potenzialmente, potrebbe influenzare positivamente l'eventuale interazione stabilita tra le cellule funzionali del microrganismo studiato e l'epitelio intestinale. Inoltre i dati microbiologici, non avendo evidenziato differenze apprezzabili in termini di variazione di carico cellulare, tra le due popolazioni batteriche, controllo e trattate con HPH, mostrano una vitalità cellulare non compromessa, nonostante l'evidente variazione delle proprietà di membrana. Il cambiamento nelle proprietà riscontrate non è esclusivamente di tipo meccanico ed imputabile ad un maggior impaccamento delle strutture molecolari della parete e membrana citoplasmatica. Il trattamento HPH sub-letale induce infatti la modulazione di una serie di geni chiave nei fenomeni di adesione cellulare e di risposta agli stress quali *groEL*, *eftU*, *clpP* e *slp*. L'attivazione di questi geni, come riportato in letteratura, mima il comportamento fisiologico delle cellule di diversi ceppi di *Lb. acidophilus* alle condizioni avverse del tratto gastrointestinale (stress acido). La risposta indotta dal trattamento HPH raggiunge il culmine dopo 60 minuti dal trattamento. I risultati di questa tesi costituiscono quindi un interessante spunto di interpretazione per la messa appunto di nuove strategie al fine di migliorare le performance probiotiche del ceppo considerato, individuando nel trattamento HPH un ottimo sistema per stimolare la risposta adattiva di *Lb. acidophilus*. Ulteriori studi sono comunque necessari per comprendere appieno se l'attivazione genica osservata si traduca in una effettiva sintesi proteica, poiché diversi e complessi sono i meccanismi di feedback che agiscono nel reprimere la traduzione dell'RNA messaggero in proteina. In secondo luogo, dal momento che l'attivazione genica è transiente, è necessaria l'implementazione con sistemi atti a preservare le cellule così attivate, ad esempio l'abbinamento del trattamento con sistemi di liofilizzazione a freddo spray dryer, al fine di non compromettere la vitalità cellulare.

Bibliografia

- Adlerberth, I., Ahrne, S. I. V., Johansson, M. L., Molin, G., Hanson, L. A., & Wold, A. E. (1996). A mannose-specific adherence mechanism in *Lactobacillus plantarum* conferring binding to the human colonic cell line HT-29. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2244-2251.
- Afric, R. F. (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
- Altermann, E., Russell, W. M., Azcarate-Peril, M. A., Barrangou, R., Buck, B. L., McAuliffe, O., & Lick, S. (2005). Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(11), 3906-3912.
- Andalò A., Giordano E.D., Pasini A. (2014). Analisi quantitativa dell'espressione genica mediante real-time RT-PCR.
- Åvall-Jääskeläinen, S., Lindholm, A., & Palva, A. (2003). Surface display of the receptor-binding region of the *Lactobacillus brevis* S-layer protein in *Lactococcus lactis* provides nonadhesive lactococci with the ability to adhere to intestinal epithelial cells. *Applied and environmental microbiology*, 69(4), 2230-2236.
- Bateman, A., & Bycroft, M. (2000). The structure of a LysM domain from E. coli membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD) 1. *Journal of molecular biology*, 299(4), 1113-1119.
- Bergonzelli, G. E., Granato, D., Pridmore, R. D., Marvin-Guy, L. F., Donnicola, D., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2006). GroEL of *Lactobacillus johnsonii* La1 (NCC 533) is cell surface associated: potential role in interactions with the host and the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infection and immunity*, 74(1), 425-434.
- Bernet, M. F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Applied and environmental microbiology*, 59(12), 4121-4128.
- Boot, H. J., Kolen, C. P., Van Noort, J. M., & Pouwels, P. H. (1993). S-layer protein of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: purification, expression in *Escherichia coli*, and nucleotide sequence of the corresponding gene. *Journal of bacteriology*, 175(19), 6089-6096.
- Bottazzi, V. (1993). I batteri lattici nella maturazione del formaggio grana. *L'Industria del latte*, 29(2), 73-88.
- Braun, L., Dramsi, S., Dehoux, P., Bierne, H., Lindahl, G., & Cossart, P. (1997). InlB: an invasion protein of *Listeria monocytogenes* with a novel type of surface association. *Molecular microbiology*, 25(2), 285-294.
- Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G. C., Reinheimer, J. A., Lanciotti, R., & Guerzoni, M. E. (2008). Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high-pressure homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 91(2), 500-512.

- Burns, P., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2011). Impact of bile salt adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200 on its interaction capacity with the gut. *Research in microbiology*, 162(8), 782-790.
- Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., & Higuchi, R. (1994). Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(12), 5695-5699.
- Chhatwal, G. S. (2002). Anchorless adhesins and invasins of Gram-positive bacteria: a new class of virulence factors. *Trends in microbiology*, 10(5), 205-208.
- Collins, M. D., Farrow, J., Katic, V., & Kandler, O. (1984). Taxonomic studies on streptococci of serological groups E, P, U and V: description of *Streptococcus porcinus* sp. nov. *Systematic and applied microbiology*, 5(3), 402-413.
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., & Hebraud, M. (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS microbiology letters*, 256(1), 1-15.
- Diels, A. M., & Michiels, C. W. (2006). High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical reviews in microbiology*, 32(4), 201-216.
- FAO/WHO (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working group Report.
- Fioramonti, J., Theodorou, V., & Bueno, L. (2003). Probiotics: what are they? What are their effects on gut physiology? *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(5), 711-724.
- Floury, J., Legrand, J., & Desrumaux, A. (2004). Analysis of a new type of high pressure homogeniser. Part B. study of droplet break-up and re-coalescence phenomena. *Chemical Engineering Science*, 59(6), 1285-1294.
- Frece, J., Kos, B., Svetec, I. K., Zgaga, Z., Mrša, V., & Šušković, J. (2005). Importance of S-layer proteins in probiotic activity of *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 98(2), 285-292.
- Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. In *Probiotics* (pp. 1-8). Springer, Dordrecht.
- Garrison, D. R., & Vaughan, N. D. (2008). *Blended learning in higher education: Framework, principles, and guidelines*. John Wiley & Sons.
- Gaucher, E. A., Miyamoto, M. M., & Benner, S. A. (2001). Function–structure analysis of proteins using covarion-based evolutionary approaches: elongation factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(2), 548-552.
- Goldin, B. R., & Gorbach, S. L. (1984). The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *The American journal of clinical nutrition*, 39(5), 756-761.

- Gomes, A. M., & Malcata, F. X. (1999). *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 10(4-5), 139-157.
- Gonzales, S. N., Apella, M. C., Romero, N., Holgado, A. A. P. D. R., & Oliver, G. (1989). Superoxide dismutase activity in some strains of lactobacilli: induction by manganese. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 37(11), 3026-3028.
- Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, R. D., Marvin, L., Rouvet, M., & Corthésy-Theulaz, I. E. (2004). Cell surface-associated elongation factor Tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and immunity*, 72(4), 2160-2169.
- Guandalini, S., L. Pensabene, M. A. Zikri, J. A. Dias, L. G. Casali, H. Hoekstra, S. Kolacek, K. Massar, D. Micelic-Turk, A. Papadopoulou, J. S. de Sousa, B. Sandhu, H. Szajewska, Z. Wieszman. 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhoea: a multicentre European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 30:54-60.
- Guerzoni, M. E., Vernocchi, P., Ndagijimana, M., Gianotti, A., & Lanciotti, R. (2007). Generation of aroma compounds in sourdough: effects of stress exposure and lactobacilli–yeasts interactions. *Food microbiology*, 24(2), 139-148.
- Gupta, R. S. (1995). Evolution of the chaperonin families (HSP60, HSP 10 and TCP-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Molecular microbiology*, 15(1), 1-11.
- Gupta, S., Wen, J. J., & Garg, N. J. (2009). Oxidative stress in Chagas disease. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), 571.
- Hoier, E. (1992). Use of probiotic starter strains in dairy products. *Food Aust*, 44, 418-420.
- Hong, Y. S., Hong, K. S., Park, M. H., Ahn, Y. T., Lee, J. H., Huh, C. S., ... & Kim, J. S. (2011). Metabonomic understanding of probiotic effects in humans with irritable bowel syndrome. *Journal of clinical gastroenterology*, 45(5), 415-425.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M., & Zink, R. (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *Journal of bacteriology*, 185(11), 3288-3296.
- Jones, G., Shahani, K. M., & Amer, M. A. (1985). The effect of acidophilus yogurt on serum cholesterol, triglyceride and lipoprotein levels of weaning pigs. *J. Dairy Sci*, 68(Suppl 1), 84.
- Jonquière, R., Bierne, H., Fiedler, F., Gounon, P., & Cossart, P. (1999). Interaction between the protein InlB of *Listeria monocytogenes* and lipoteichoic acid: a novel mechanism of protein association at the surface of Gram-positive bacteria. *Molecular microbiology*, 34(5), 902-914.

- Kirjavainen, P. V., Ouwehand, A. C., Isolauri, E., & Salminen, S. J. (1998). The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiology Letters*, 167(2), 185-189.
- Klaenhammer, T. R. (2000). Probiotic bacteria: today and tomorrow. *The Journal of nutrition*, 130(2), 415S-416S.
- Klaver, F. A., & Van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(4), 1120-1124.
- Kurman, J. A. (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. *Therapeutic Properties of Fermented Milk, Elsevier Applied Food Science Series*, 117-157.
- Lanciotti, R., Gardini, F., Sinigaglia, M., & Guerzoni, M. E. (1996). Effects of growth conditions on the resistance of some pathogenic and spoilage species to high pressure homogenization. *Letters in Applied Microbiology*, 22(2), 165-168.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Saracino, P., & Guerzoni, M. E. (2007). Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. *Food Chemistry*, 102(2), 542-550.
- Lanciotti, R., Sinigaglia, M., Angelini, P., & Guerzoni, M. E. (1994). Effects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology*, 18(6), 319-322.
- Mack, D. R., Ahrné, S., Hyde, L., Wei, S., & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52(6), 827-833.
- Mackay, I. M. (Ed.). (2007). *Real-time PCR in microbiology: from diagnosis to characterization*. Horizon Scientific Press.
- Marshall, V. M., & Cole, W. M. (1983). Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* and their contribution to flavour production in fermented milks. *Journal of Dairy Research*, 50(3), 375-379.
- Marteau, P., & Rambaud, J. C. (1993). Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1-3), 207-220.
- Masuda, K., & Kawata, T. (1983). Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus*. *FEMS microbiology letters*, 20(2), 145-150.
- Messner, P., Allmaier, G., Schäffer, C., Wugeditsch, T., Lortal, S., König, H., ... & Dorner, M. (1997). III. Biochemistry of S-layers. *FEMS microbiology reviews*, 20(1-2), 25-46.
- Mital, B. K., & Garg, S. K. (1992). Acidophilus milk products: manufacture and therapeutics. *Food Reviews International*, 8(3), 347-389.

- Montanari C., Sado Kamdem S. L., Serrazanetti D. I., Etoa F. X., Guerzoni M. E. (2010). Synthesis of cyclopropane fatty acids in *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus sanfranciscensis* and their cellular fatty acids changes following short term acid and cold stresses. *Food Microbiol.* 27 493–502. 10.1016.
- Muller, P. Y., Janovjak, H., Miserez, A. R., & Dobbie, Z. (2002). Short technical report processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 32(6), 1372-1379.
- Murti, T. W., Bouillanne, C., Landon, M., & De Smazeaud, M. J. (1993). Bacterial growth and volatile compounds in yoghurt-type products from soymilk containing *Bifidobacterium* ssp. *Journal of Food Science*, 58(1), 153-157.
- Nahaisi, M. H. (1986). *Lactobacillus acidophilus*: therapeutic properties, products and enumeration. *Developments in food microbiology*.
- Nakamura, J., Ito, D., Nagai, K., Umehara, Y., Hamachi, M., & Kumagai, C. (1997). Rapid and sensitive detection of hiochi bacteria by amplification of hiochi bacterial common antigen gene by PCR method and characterization of the antigen. *Journal of fermentation and bioengineering*, 83(2), 161-167.
- Navarre, W. W., & Schneewind, O. (1999). Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and molecular biology reviews*, 63(1), 174-229.
- Nielsen, J. W., & Gilliland, S. E. (1992). The lactose hydrolyzing enzyme from *Lactobacillus acidophilus*. *Cultured dairy products journal (USA)*.
- Nissen, H. J., Damerow, P., & Englund, R. K. (1991). *Frühe Schrift und Techniken der Wirtschaftsverwaltung im alten Vorderen Orient: Informationsspeicherung und-verarbeitung vor 5000 Jahren*. Franzbecker.
- Orla-Jensen. S. (1919) *The Lactic Acid Bacteria*. Fred Host and Son. Copenhagen.
- Patrignani, F., & Lanciotti, R. (2016). Applications of high and ultra high pressure homogenization for food safety. *Frontiers in microbiology*, 7, 1132.
- Patrignani, F., Vannini, L., Gardini, F., Guerzoni, M. E., & Lanciotti, R. (2011). Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* strains in pork fat. *Meat science*, 88(4), 689-693.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S. L. S., Hernando, I., Marco-Molés, R., Guerzoni, M. E., & Lanciotti, R. (2013). High pressure homogenization vs heat treatment: Safety and functional properties of liquid whole egg. *Food microbiology*, 36(1), 63-69.
- Pavan, S., Desreumaux, P., & Mercenier, A. (2003). Use of mouse models to evaluate the persistence, safety, and immune modulation capacities of lactic acid bacteria. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 10(4), 696-701.
- Pavlov, A.R., Pavlova, N.V., Kozyavkin, S.A., and Slesarev, A.I. (2006) in *DNA Sequencing II*:

- Optimizing Preparation and Cleanup* (ed J. Kieleczawa), Jones and Bartlett Publishers, pp. 241–257
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 26(6), 509-515.
 - Pfeiler, E. A., Azcarate-Peril, M. A., & Klaenhammer, T. R. (2007). Characterization of a novel bile-inducible operon encoding a two-component regulatory system in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of bacteriology*, 189(13), 4624-4634.
 - Popp, J., & Bauer, M. (Eds.). (2015). *Modern Techniques for Pathogen Detection*. John Wiley & Sons.
 - Popping, B., Diaz-Amigo, C., & Hoenicke, K. (Eds.). (2010). *Molecular biological and immunological techniques and applications for food chemists*. John Wiley & Sons.
 - Ramiah, K., van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2009). Expression of the mucus adhesion gene *mub*, surface layer protein *slp* and adhesion-like factor EF-TU of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 under digestive stress conditions, as monitored with real-time PCR. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 1(1), 91.
 - Reid, G., & Bruce, A. W. (2003). Urogenital infections in women: can probiotics help?. *Postgraduate Medical Journal*, 79(934), 428-432.
 - Reid, G., & Burton, J. (2002). Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and infection*, 4(3), 319-324.
 - Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R., ... & Klaenhammer, T. R. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, 37(2), 105-118.
 - Reid, G., Sanders, M. E., Gaskins, H. R., Gibson, G. R., Mercenier, A., Rastall, R., ... & Klaenhammer, T. R. (2003). New scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of clinical gastroenterology*, 37(2), 105-118.
 - Rodríguez-Vargas S., Sánchez-García A., Martínez-Rivas J. M., Prieto J. A., Rande-Gil F. (2007). Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 110–116. 10.1128.
 - Rojas, M., & Conway, P. L. (1996). Colonization by lactobacilli of piglet small intestinal mucus. *Journal of Applied bacteriology*, 81(5), 474-480.
 - Rolfe, R. D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *The Journal of nutrition*, 130(2), 396S-402S.
 - Roos, S., & Jonsson, H. (2002). A high-molecular-mass cell-surface protein from *Lactobacillus reuteri* 1063 adheres to mucus components. *Microbiology*, 148(2), 433-442.

- Ruseler-van Embden, J. G. H., Van Lieshout, L. M. C., Gosselink, M. J., & Marteau, P. (1995). Inability of *Lactobacillus casei* strain GG, *L. acidophilus*, and *Bifidobacterium bifidum* to degrade intestinal mucus glycoproteins. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 30(7), 675-680.
- Rychlik, W. J. S. W., Spencer, W. J., & Rhoads, R. E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic acids research*, 18(21), 6409-6412
- Saibil, H.R. (2008). Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol*; 18:35–42.
- Salminen, S., Isolauri, E., & Salminen, E. (1996). Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2-4), 347-358.
- Sára, M., & Sleytr, U. B. (2000). S-layer proteins. *Journal of bacteriology*, 182(4), 859-868.
- Savijoki, K., Ingmer, H., & Varmanen, P. (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 71(4), 394-406.
- Schneitz, C., Nuotio, L., & Lounatma, K. (1993). Adhesion of *Lactobacillus acidophilus* to avian intestinal epithelial cells mediated by the crystalline bacterial cell surface layer (S-layer). *Journal of Applied Bacteriology*, 74(3), 290-294.
- Scialpi, A., & Mengoni, A. (Eds.). (2008). *La PCR e le sue varianti. Quaderno di laboratorio* (Vol. 2). Firenze University Press.
- Serrazanetti, D. I., Patrignani, F., Russo, A., Vannini, L., et al. (2015). Cell membrane fatty acid changes and desaturase expression of *Saccharomyces bayanus* exposed to high pressure homogenization in relation to the supplementation of exogenous unsaturated fatty acids. *Frontiers in microbiology* 6:1105.
- Sethi, S., Tyagi, S. K., & Anurag, R. K. (2016). Plant-based milk alternatives an emerging segment of functional beverages: a review. *Journal of food science and technology*, 53(9), 3408-3423.
- Sleytr, U. B. (1997). I. Basic and applied S-layer research: an overview. *FEMS microbiology reviews*, 20(1-2), 5-12.
- Sleytr, U. B., T. J. Beveridge. 1999. Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology*. 7:253-260.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K. J., El Khattabi, M., Grijpstra, F., Zomer, A. L., ... & Kok, J. (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23874-23881.
- Sutcliffe, I. C., & Harrington, D. J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*, 148(7), 2065-2077.
- Tabanelli, G., Burns, P., Patrignani, F., Gardini, F., Lanciotti, R., Reinheimer, J., & Vinderola, G. (2012). Effect of a non-lethal High Pressure Homogenization treatment on the in vivo response of probiotic lactobacilli. *Food microbiology*, 32(2), 302-307.

- Tabanelli, G., Patrignani, F., Vinderola, G., Reinheimer, J. A., Gardini, F., & Lanciotti, R. (2013). Effect of sub-lethal high pressure homogenization treatments on the in vitro functional and biological properties of lactic acid bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 53(2), 580-586.
- Tannock, G. W. 2004. A special fondness for lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:3189–3194.
- Tasara, T., & Stephan, R. (2007). Evaluation of housekeeping genes in *Listeria monocytogenes* as potential internal control references for normalizing mRNA expression levels in stress adaptation models using real-time PCR. *FEMS microbiology letters*, 269(2), 265-272.
- Van Hijum, S. A. F. T., van Geel-Schutten, G. H., Rahaoui, H., Van Der Maarel, M. J. E. C., & Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from *Lactobacillus reuteri* that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4390-4398.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36(9-10), 895-904.
- Vinderola, C. G., Prosello, W., Ghiberto, D., & Reinheimer, J. A. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese. *Journal of dairy science*, 83(9), 1905-1911.
- Wahren, M. (1990) Brot und Getreide in der Urgeschichte. In: Die ersten Bauern, Vol. 1. Schweizerisches Landesmuseum, Zurich, pp. 117- 118.
- Weiss, G., & Jespersen, L. (2010). Transcriptional analysis of genes associated with stress and adhesion in *Lactobacillus acidophilus* NCFM during the passage through an in vitro gastrointestinal tract model. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 18(4), 206-214.
- Wickner, S., Maurizi, M. R., & Gottesman, S. (1999). Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science*, 286(5446), 1888-1893.
- Zamora, A., & Guamis, B. (2015). Opportunities for ultra-high-pressure homogenisation (UHPH) for the food industry. *Food Engineering Reviews*, 7(2), 130-142.
- Zhou, J. S., Gopal, P. K., & Gill, H. S. (2001). Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *International Journal of Food Microbiology*, 63(1-2), 81-90.