

**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**

**PROPRIETÀ TECNOLOGICHE E ATTIVITÀ  
ANTIMICROBICA DI LATTOCOCCHI  
PRODUTTORI DI NISINA IN BEVANDE  
VEGETALI**

**Tesi in**

**MICROBIOLOGIA DELLE FERMENTAZIONI**

**(Microbiologia Avanzata e Predittiva C.I.)**

**Relatore:**

**Prof.ssa Rosalba Lanciotti**

**Correlatori:**

**Dott. Lorenzo Siroli**

**Dott.ssa Lucia Camprini**

**Presentata da:**

**Martina Polizzano**

**Sessione III**

**ANNO ACCADEMICO 2016-2017**

# INDICE

<b>Capitolo 1.</b>		<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Bevande vegetali</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Le bevande vegetali sostitutive del latte</i>	1
1.2	Proprietà, caratteristiche e valori nutrizionali	2
1.3	Tendenze di mercato	4
1.4	Bevanda vegetale a base di soia	9
1.5	Succhi di frutta e bevande a base di frutta e verdura	14
1.6	Problematiche microbiologiche dei succhi di frutta	19
<b>Capitolo 2.</b>		<b>23</b>
<b>2.</b>	<b>Batteri lattici</b>	<b>23</b>
2.1	Classificazione dei batteri lattici	23
2.1.1	Lattococchi	25
2.2	Biocontrollo e batteriocine	27
2.2.1	Classificazione delle batteriocine	31
2.2.2	Sintesi delle batteriocine	36
2.2.3	Fattori che influenzano l'efficacia di una batteriocina	39
2.2.4	Meccanismi di resistenza alle batteriocine	40
2.2.5	Meccanismi di azione delle batteriocine	41
2.3	Nisina	46
2.3.1	Meccanismo d'azione della nisina	51
2.3.2	Utilizzo della nisina in campo alimentare	53
<b>Capitolo 3.</b>		<b>58</b>
<b>3.</b>	<b>Obbiettivi</b>	<b>58</b>
<b>Capitolo 4.</b>		<b>62</b>
<b>4.</b>	<b>Materiali e metodi</b>	<b>62</b>
4.1	Prove di fermentazione in bevanda vegetale a base soia	63

4.2	Prove di fermentazione in estratto di carota	65
4.3	Quantificazione della nisina presente nei campioni	66
4.4	Analisi del profilo aromatico mediante GC/MS SPME	70
4.5	Challenge test in presenza di <i>Listeria monocytogenes</i>	71
<b>Capitolo 5.</b>		<b>73</b>
<b>5.</b>	<b>Risultati</b>	<b>73</b>
<b>Capitolo 6.</b>		<b>94</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>94</b>
<b>Bibliografia</b>		<b>96</b>

# CAPITOLO 1

## 1. Bevande vegetali

### 1.1 Le bevande vegetali sostitutive del latte

Negli ultimi anni il reparto latte dei supermercati s'è decisamente ampliato. Non c'è solo quello di vacca in tutte le sue varianti (UHT, alta digeribilità, alta qualità etc.) ma anche tanti altri prodotti che, pur non essendo latte, gli somigliano parecchio. Cambia però l'origine, non animale ma vegetale (le varianti, indicate in Tabella 1, sono soia, riso, avena, cocco, mandorla, kamut, miglio e quinoa).

Il REGOLAMENTO (UE) N. 1308/2013 del 17 dicembre del 2013 stabilisce che solo quello ottenuto dalla mungitura, senza alcuna aggiunta o sottrazione, di vacche possa essere denominato ed etichettato come "latte"; per tutti gli altri tipi di latte di origine animale bisogna indicare accanto alla dicitura "latte" la specie d'origine dell'animale<sup>1</sup>.

Già nel 2010 la Commissione Europea aveva concesso lo stesso trattamento a quelli di mandorla e cocco, (CEE/CEEA/CECA 20.12.2010 n. 791 relativa al Regolamento CEE/UE 22.10.200n.1234) perché l'utilizzo del termine "latte" per questi prodotti era già di uso consolidato. Tutti gli altri prodotti di origine vegetale possono essere denominati al massimo come "bevanda a base di...", o simili accompagnata dal nome del cereale/ legume/ seme da cui deriva.

**Tabella 1:** Origine delle bevande vegetali.

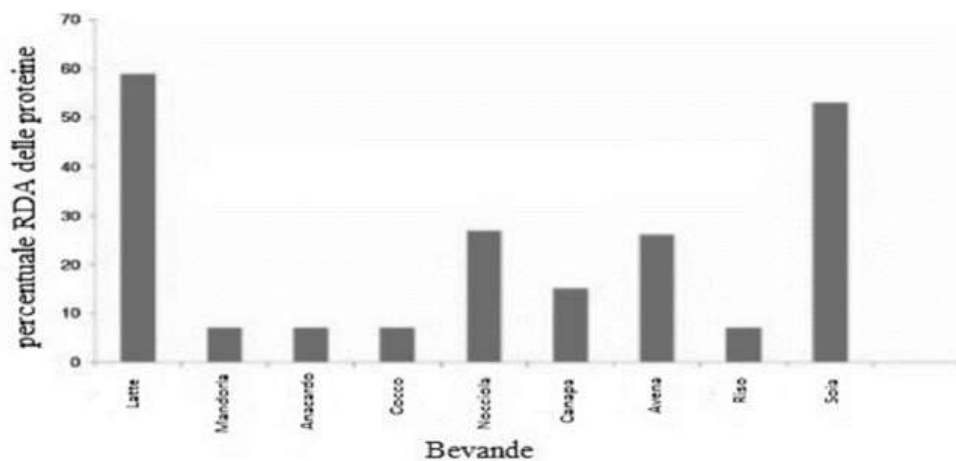
Cereali	Legumi	Semi
Riso	Soia	Mandorle
Avena		Nocciole
Orzo		Macadamia
Miglio		Cocco
Farro		Anacardi
Grano Saraceno		Quinoa
Sorgo		
Mais		

## 1.2 Proprietà, caratteristiche e valori nutrizionali

La maggior parte delle alternative al latte manca dell'equilibrio nutrizionale rispetto al latte vaccino, i due prodotti infatti non hanno valori nutrizionali paragonabili. A parte il colore bianco e opalescente le due bevande non hanno nulla in comune: ogni bevanda vegetale in commercio racchiude sostanze nutritive in quantità e qualità variabile ed è quasi impossibile eseguire un esatto confronto<sup>2</sup>.

Da un confronto dei nutrienti è emerso che:

- **Proteine:** il latte vaccino contiene proteine ad alto valore biologico. Anche le bevande di soia contengono diversi aminoacidi essenziali, mentre gli altri sono piuttosto carenti. In una scala da 1 a 100, il valore biologico del latte vaccino è 91, quello di soia massimo 75, quelli prodotti da cereali intorno a 55. Dalla comparazione della dose giornaliera consigliata (RDA, Recommended Daily Allowance) per soddisfare il fabbisogno proteico in soggetti adulti, la % di proteine varia tra il latte vaccino e le varie tipologie di bevande a base vegetale (Figura 1)<sup>1</sup>.



**Figura 1:** Confronto dei valori percentuale di RDA per le proteine contenute in 240 mL di bevanda (Singhal et al., 2017).

- **Grassi:** Il latte di origine animale è ricco di grassi, di cui il 65% sono saturi, e di colesterolo.

Le bevande vegetali invece contengono pochi grassi prevalentemente polinsaturi (PUFA)  $\omega 3$  e  $\omega 6$ , i quali svolgono un importante ruolo protettivo nei confronti di patologie cardiovascolari e neurodegenerative<sup>3</sup>; ed è anche per questo che molti consumatori, i più attenti alla linea, li preferiscono; c'è però un'eccezione: il latte di cocco. Il latte vaccino intero contiene il 3,5% di grasso, quello di soia o mandorle raramente supera il 2,5%. Mentre quello di cocco può raggiungere in alcune formulazioni il 23% (di cui il 90% sono saturi)<sup>1</sup>.

- **Vitamine:** Se il latte vaccino contiene tutte quelle necessarie allo sviluppo, alla crescita e al mantenimento, in molti prodotti vegetali questi micro-costituenti vengono aggiunti perché, di base, non ne hanno a sufficienza. Il latte vaccino, infatti, resta la migliore fonte di calcio, necessario soprattutto per le nostre ossa e per prevenire l'osteoporosi<sup>1</sup>. È un alimento di cui non dovrebbero privarsi in particolare le donne, gli anziani e i bambini, soprattutto se acquistato parzialmente scremato. Contiene anche vitamina D, fondamentale per l'assorbimento del calcio<sup>4</sup>.
- **Zuccheri:** Così come le vitamine, in alcuni "latte" vegetali ci sono zuccheri aggiunti (ad esempio l'estratto di mela o lo sciroppo di agave), in quanto al naturale, hanno un contenuto basso di zuccheri, che li renderebbero poco appetibili. Le bevande a base di riso e avena, al contrario, sono dolcissime "perché la materia prima con cui sono fatti, vale a dire i cereali, è ricca di amido<sup>1</sup>.

L'assunzione di latte vegetale apporta numerosi benefici all'organismo, sono privi di colesterolo, di lattosio e di caseina, ricchi di vitamine (A, B, C ed E), sali minerali (calcio, potassio, magnesio, fosforo, ecc.) e di acidi grassi "buoni" (grassi polinsaturi) (Tabella 2), il suo consumo è molto diffuso. Inoltre, esso è particolarmente indicato per alcune condizioni patologiche in cui è necessario eliminare il latte di origine animale.

**Tabella 2:** Confronto nutrienti latte vaccino e altre bevande vegetali.

	Cow's Milk (1 cup)	Rice Milk (1 Cup)	Soy Milk (1 cup)	Coconut Milk (1 cup)	Almond Milk (1 cup)	Oat Milk (1 cup)	Hemp Milk (1 cup)
Energy (kcal)	149	115	105	76	37	130	70
Protein (g)	7.69	0.68	6.34	0.51	1.44	4	3
Total fat (g)	7.93	2.37	3.59	5.08	2.68	2.5	5
Saturated fat (g)	4.55	0	0.5	5.083	0	0	0.5
Cholesterol (mg)	24	0	0	0	0	0	0
Carbohydrate (g)	11.71	22.37	12	7.12	1.42	24	1
Calcium (mg)	276	288	300	459	481	350	300
Iron (mg)	0.07	0.49	1.02	0.73	0.85	1.8	1.8
Vitamin D (IU)	128	96	108	96	96	100	100

È bene però assumere il latte vegetale con cautela perché, se è ovvio che si vogliono sfruttare tutti i benefici che possiede, è altrettanto prudente conoscere e capire le eventuali controindicazioni che può causare. Possono verificarsi infatti: allergie, carenze nutrizionali, problemi ormonali, diabete.

### 1.3 Tendenze di mercato

Sono diverse le motivazioni che inducono sempre più consumatori a scegliere le bevande vegetali in sostituzione del prodotto tradizionale. La scelta può essere dovuta ad allergie alimentari o intolleranze a determinate sostanze, come il lattosio; oppure a questioni di gusti, per motivi etici, culturali e religiosi<sup>2</sup>.

Il trend delle bevande a base vegetale è in continua crescita; confermato anche dal nuovo paniere Istat, presentato a febbraio del 2014, dove entrano per la prima volta proprio bevande a base di soia, riso e altri legumi o cereali. Prodotti le cui vendite sono aumentate del 27% nel 2015, secondo elaborazioni Coldiretti su Rapporto Coop. Sempre la Coldiretti evidenzia anche che le bevande vegetali, in genere, costano anche il doppio del latte di alta qualità made in Italy e il triplo di quello a lunga conservazione<sup>3</sup>.

Nel 2014, il consumatore medio italiano ha comprato circa 11,3 litri di prodotti a base vegetale (poco meno di un litro al mese), con un incremento del 12% rispetto all'anno precedente. È un vero e proprio boom di bevande vegetali: al primo posto quelle di soia (scelte da 4,2 milioni di famiglie), seguono i drink a base di riso (acquistati da 1,8 milioni di consumatori italiani), e di mandorla (1,5 milioni)<sup>5</sup>.

L'indagine è stata condotta dall'Istituto Nielsen e ha rilevato i comportamenti dei consumatori: il 70% degli intervistati ha ripetuto l'acquisto di un prodotto vegetale almeno due volte l'anno. In media, quel prodotto è stato acquistato circa 8 otto volte in un anno, quasi una volta al mese. Tra questi prodotti rientra il latte di soia, riso o tofu in sostituzione a latte, panna, yogurt, formaggi, burro, e perfino dessert.

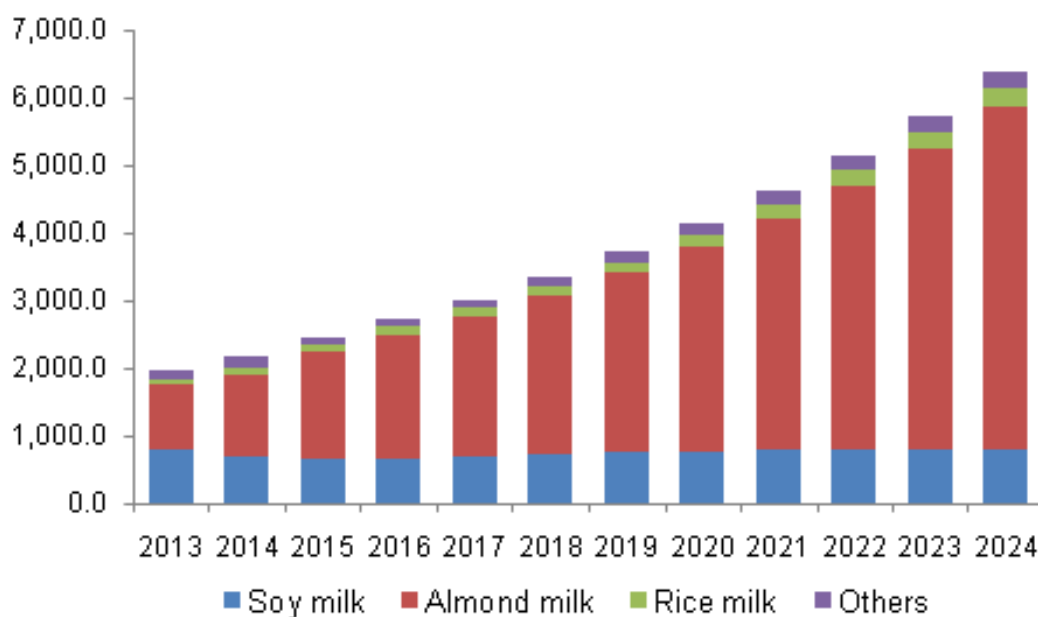
I dati Nielsen dimostrano come il mercato dei prodotti a base vegetale non si rivolga soltanto ai consumatori che tengono un determinato regime alimentare per scelta ideologica o per motivi legati alla salute, ma si sia allargato a chi cerca una dieta più bilanciata e adatta al benessere personale. La varietà dell'offerta, sia a livello di ingredienti, sia per la tipologia dei prodotti, è un fattore fondamentale per avvicinare nuovi consumatori al mondo del vegetale<sup>6</sup>.

Nel 2015 sono state 8,5 milioni le famiglie italiane che hanno acquistato almeno un prodotto a base vegetale (bevande, dessert, alternative allo yogurt e alla panna), pari al 34,5% del totale. Tra queste, il 70% ha effettuato l'acquisto almeno due volte, con una media complessiva di 8 prodotti comprati durante l'anno. Nel 2002 il fatturato delle bevande alternative al latte era il 5% del totale, nel 2021 saranno il 20% e ad oggi il mercato supera gli 8,7 miliardi di dollari.

La Cina è il paese che apprezza di più questo tipo di bevande e, insieme agli Stati Uniti, detiene il 70% del mercato globale in termini di valore; nel 2015 sono stati i Paesi asiatici i principali consumatori dei prodotti vegetali alternativi al latte vaccino con oltre il 40 % del mercato mondiale ma i paesi in cui le vendite crescono a ritmi incessanti sono l'Italia, il Vietnam e i Paesi Bassi. Secondo la ricerca, il mercato dei prodotti vegetale sarebbe destinato a crescere del 16,6% entro il 2024 arrivando a quota 35 miliardi<sup>7</sup>.



Fra i prodotti più diffusi, in cima alla classifica c'è il "latte" di soia, che nel 2015 ha rappresentato più del 40% delle vendite del mercato dei prodotti alternativi al latte vaccino. Dal latte di mandorle ci si aspetta la crescita maggiore entro il 2024 (circa il 18%, secondo uno studio americano) in ragione dell'alto contenuto di proteine, fibre e lipidi, oltre che delle caratteristiche. Segue il "latte" di riso, il cui impiego è previsto in aumento soprattutto da parte dell'industria dolciaria (Figura 2).

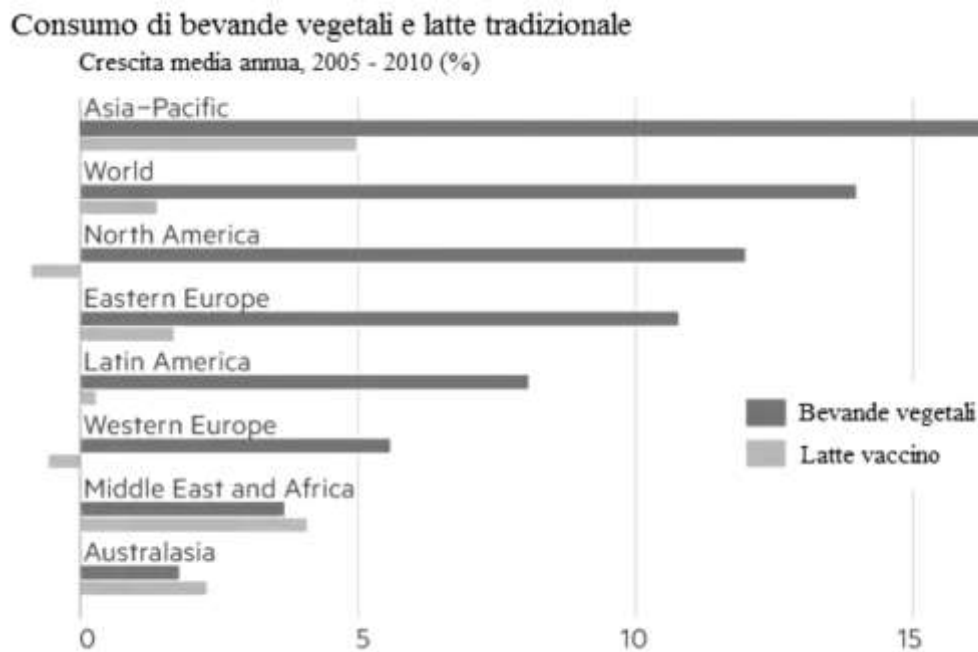


**Figura 2** Analisi del mercato del latte per prodotto (latte di soia, latte di mandorle, latte di riso), per formulazione (pianura, aromatizzati), per applicazione (cibo, bevande) e previsioni del segmento fino al 2024<sup>9</sup>.

Sebbene l'evoluzione del settore sia molto positiva, il consumo pro-capite di prodotti a base vegetale in Italia è ancora sotto la media europea del 30%, probabilmente a causa della forte tradizione di consumo di latte vaccino rispetto ad altri paesi europei, dove il latte fresco ha un mercato più ristretto. Al momento in Italia siamo a 0,85 litri contro 1,38 litri in Europa.

Le vendite mondiali di latti alternativi sono più che raddoppiate tra il 2009 e il 2015 a 21 miliardi di dollari, secondo Euromonitor ([www.euromonitor.com](http://www.euromonitor.com)). In Europa occidentale le vendite di riso e avena sono raddoppiate nei cinque anni fino al 2014, in Australia sono saliti tre volte e in Nord America le vendite sono aumentate nove volte, secondo Euromonitor. In

Figura 3, è riportata la crescita media annua del consumo delle bevande vegetali e del latte tradizionale nel mondo (www.euromonitor.com).



**Figura 3:** Crescita media annua del consumo delle bevande vegetali e del latte tradizionale nel mondo e nei vari continenti (www.euromonitor.com).

L'alone di interesse intorno ai lattini alternativi cresce in tutto il mondo e, nonostante il prezzo al litro superi quello del latte vaccino e le formule siano letteralmente diverse fra loro, le vendite crescono a ritmi serrati.

Di pari passo alla crescita del consumo di bevande vegetali crolla il consumo di latte vaccino, causa le preoccupazioni riguardanti i livelli di grassi saturi, l'intolleranza al lattosio, il contenuto di ormoni, l'uso di antibiotici nelle vacche da latte, nonché l'interesse verso il benessere degli animali.

Il consumo pro capite di latte è sceso del 13% negli Stati Uniti negli ultimi cinque anni, mentre in Europa è sceso del 4,1%. Una ricerca Mintel (www.mintel.com) ha mostrato che il 90% dei soggetti che avevano utilizzato bevande vegetali aveva consumato anche latte vaccino. Questo sottolinea che il suo consumo non necessariamente sostituisce completamente il latte convenzionale.

Poiché l'utilizzo familiare di bevande vegetali è ancora basso, c'è ancora molto spazio per la crescita, secondo Société Générale ([www.societegenerale.it/](http://www.societegenerale.it/)), evidenziando le buone opportunità a lungo termine per i prodotti vegetali sostitutivi di latte, panna, gelati e yogurt convenzionali.

<sup>1</sup>[Cfr: http://www.nationalgeographic.it/food/2016/02/01/news/il-delicato-equilibrio-del-latte-vegetale-2952620/?refresh\\_ce](http://www.nationalgeographic.it/food/2016/02/01/news/il-delicato-equilibrio-del-latte-vegetale-2952620/?refresh_ce)

<sup>2</sup>[Cfr: https://www.ilgiardinodeilibri.it/speciali/bevande-vegetali-biologiche.php#](https://www.ilgiardinodeilibri.it/speciali/bevande-vegetali-biologiche.php#)

<sup>3</sup>[Cfr: http://saperefood.it/5boom-di-bevande-vegetali-sempre-piu-latte-di-soia-riso-e-mandorle28/](http://saperefood.it/5boom-di-bevande-vegetali-sempre-piu-latte-di-soia-riso-e-mandorle28/)

<sup>4</sup>[Cfr: http://www.lastampa.it/2016/06/03/scienza/benessere/dovete-sapere/il-boom-del-latte-alternativo-su-del-la-vendita-di-quello-a-base-di-soia-avena-riso-o-mandorla-nmmYZTQxQ3FD6SikVO0gvJ/pagina.html](http://www.lastampa.it/2016/06/03/scienza/benessere/dovete-sapere/il-boom-del-latte-alternativo-su-del-la-vendita-di-quello-a-base-di-soia-avena-riso-o-mandorla-nmmYZTQxQ3FD6SikVO0gvJ/pagina.html)

<sup>5</sup>[Cfr: http://www.repubblica.it/salute/alimentazione/2017/02/27/news/anatomia-di-una-bevanda-che-sembrava-la-tte-159210298/](http://www.repubblica.it/salute/alimentazione/2017/02/27/news/anatomia-di-una-bevanda-che-sembrava-la-tte-159210298/)

## **1.4 Bevanda vegetale a base di soia**

La bevanda vegetale a base di soia, comunemente chiamata "latte vegetale" o "latte di soia", è ideale per chi desidera seguire una dieta vegana o non può assumere latte animale a causa di allergie o intolleranze al lattosio.

La bevanda a base di soia è una soluzione colloidale contenente proteine solubili, carboidrati, olio, un'elevata quantità d'acqua e altri composti minori e può essere dolce o salata in base agli ingredienti (zucchero, semi di senape o altri) (Cagnoni, 1948). Deriva dalla macerazione dei semi di soia, una pianta tipica di tutta l'area asiatica.

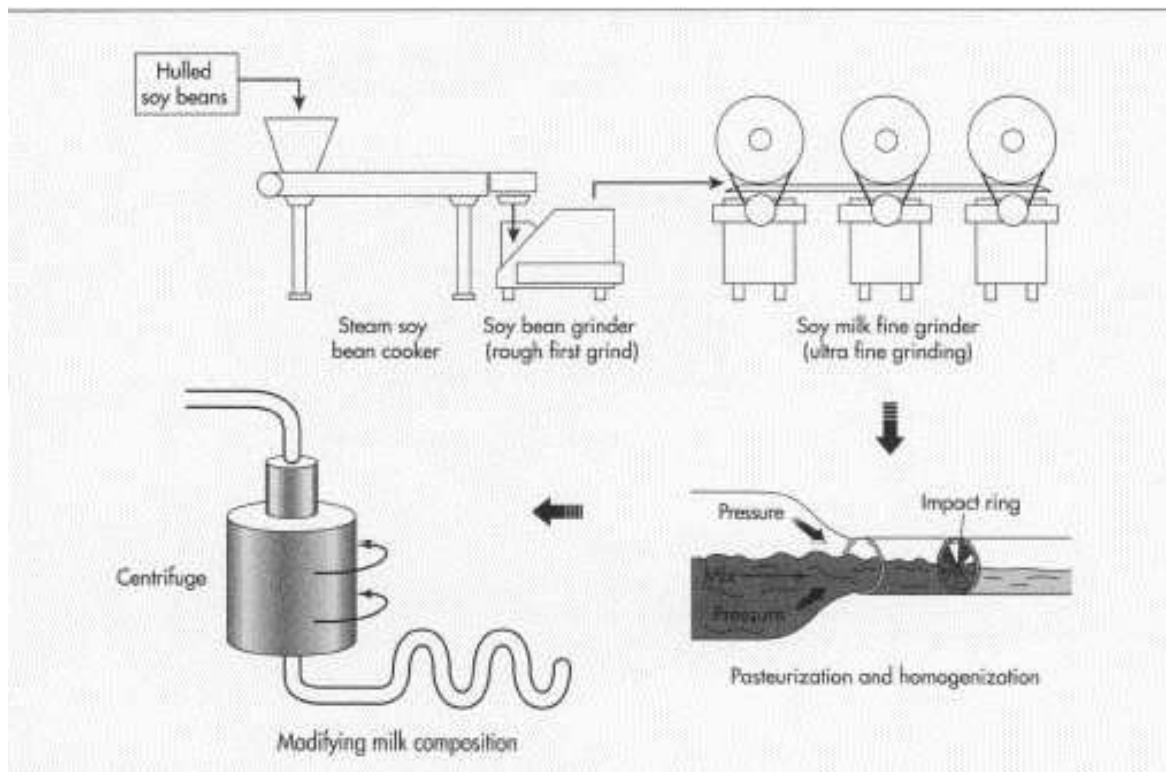
Come schematizzato in Figura 4, i semi di soia gialla vengono messi a macerare una notte intera in una quantità di acqua pari a sei volte il loro peso. Successivamente sono aggiunti enzimi, in particolar modo amilasi, per favorire la trasformazione dell'amido in zuccheri semplici. Questa fase avviene solitamente a temperature elevate (60-80 °C) ma al di sotto di quelle necessarie ad inattivare gli enzimi; successivamente vengono macinati, cotti e filtrati. Il prodotto è poi raffreddato, ed addizionato di altri ingredienti come sale, oli vegetali, vitamine, calcio, ed infine viene filtrato e sottoposto a sterilizzazione termica, generalmente UHT.

<sup>6</sup>Cfr:<http://www.italiafruit.net/DettaglioNews/34501/mercati-e-imprese/crescono-i-consumi-di-prodotti-a-base-vegetale>

<sup>7</sup>Cfr:[http://www.ansa.it/lifestyle/notizie/passioni/food\\_wine/2017/06/01/di-cocco-e-di-noci-il-latte-vegetale-bio-e-animal-friendly-e-super-trend\\_344f14a4-a1da-4ee6-8a76-44429cac27b6.html](http://www.ansa.it/lifestyle/notizie/passioni/food_wine/2017/06/01/di-cocco-e-di-noci-il-latte-vegetale-bio-e-animal-friendly-e-super-trend_344f14a4-a1da-4ee6-8a76-44429cac27b6.html)

<sup>8</sup>Cfr:[http://www.ilmessaggero.it/expo\\_2015/bevande\\_vegetali\\_expo\\_cooking\\_show\\_chef\\_stellati-1233316.html](http://www.ilmessaggero.it/expo_2015/bevande_vegetali_expo_cooking_show_chef_stellati-1233316.html)

<sup>9</sup>Cfr:<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dairy-alternatives-market>



**Figura 4:** processo produttivo della bevanda vegetale a base soia.

I trattamenti termici (soprattutto UHT), associati anche a trattamenti ad elevate pressioni (evaporazioni flash), la macinazione dei semi, la deodorazione (rimozione dei composti aromatici volatili per evaporazione) e l'aggiunta di dolcificanti e aromatizzanti sono le operazioni applicate principalmente. Il trattamento termico è un'operazione unitaria utile per la distruzione microbica e per l'inattivazione di enzimi che potrebbero causare alterazioni, in quanto la bevanda, avendo un'elevata percentuale d'acqua, è un ottimo terreno per i microrganismi.

Tuttavia, durante i trattamenti termici, soprattutto a temperature elevate, possono svilupparsi alcuni composti in grado di alterare il sapore e l'aroma del prodotto. Altri componenti, quali isoflavoni, saponine e composti fenolici, invece, sono già presenti nei semi di soia e sono parzialmente responsabili degli sgradevoli sentori organolettici della bevanda. (Lozano *et al.*, 2007).

Le capacità nutritive della bevanda a base di soia sono di poco inferiori a quelle del latte vaccino, come mostrato in Tabella 3. Esso è costituito da proteine (3,0% -3,6%), zuccheri

(2,9% -3,5%), grassi (2,0% -2,5%), ceneri (0,5%), e presenta un pH 6,8-7,0. In sintesi, il latte di soia ha circa il 8,4% -10% di solidi totali e 88% -92% di acqua.

**Tabella 3:** confronto tra i componenti del latte vaccino e il latte di soia<sup>8</sup>, su 100 mL di prodotto.

	LATTE DI MUCCA	LATTE DI SOIA
Valore Energ.	61Kcal	39Kcal
Proteine	3,15g	3g
Carboidrati	4,95g	2,5g
Zuccheri	5,05g	2,5g
Lattosio	5,05g	0g
Grassi	3,25g	1,8g
Saturi	1,86g	0,3g
Colesterolo	10,00mg	0mg
Fibre alimentari	0g	0,5g
Sodio	0,043g	0,004g

I principali zuccheri solubili (galatto-oligosaccaridi o GOS) presenti sono: raffiniosio (0,1% - 0,3%), stachiosio (0,7% -0,9%) e saccarosio (2,1% -2,3%); inoltre, il latte di soia contiene carboidrati insolubili come cellulosa, emicellulosa, pectina e tracce di amido. Contiene anche altri componenti minori, tra cui minerali, vitamine, fitati e composti fenolici (isoflavoni) (Hui, 2012).

I primi due zuccheri non sono digeriti dal tratto intestinale umano e possono causare flatulenza e problemi digestivi (Hartwig *et al.*, 1997; Rackis *et al.*, 1970; Suarez *et al.*, 1999). Tali zuccheri non sono digeribili a causa dell'assenza di  $\alpha$ -galattosidasi nella mucosa dell'intestino tenue. Di conseguenza, gli oligosaccaridi intatti passano direttamente nell'intestino inferiore dove vengono metabolizzati da batteri che possiedono l'enzima necessario, con conseguente produzione di gas (Cristofaro *et al.* 1974). È quindi necessario eliminare o ridurre tali zuccheri dal latte di soia usando opportuni trattamenti, quali processi enzimatici o la fermentazione con microrganismi selezionati.

Tuttavia, gli oligosaccaridi hanno dimostrato di possedere proprietà prebiotiche, aumentando le popolazioni di bifidobatteri indigeni nel colon (Hayakawa *et al.*, 1990) e sopprimendo la crescita e attività di batteri degradativi (Masai *et al.*, 1987). Per beneficiare di tali proprietà, il latte di soia viene, come accennato precedentemente, addizionato di enzimi quali l' $\alpha$ -galattosidasi, la quale contribuisce alla produzione di latte di soia a basso contenuto di  $\alpha$ -GOS, riducendo così la causa di meteorismo da prodotti di soia.

Tali enzimi vengono prodotti da diversi microrganismi, ognuno dei quali presenta specifici *optimum* di produzione e funzionamento dell'enzima stesso, ad esempio la maggior parte delle  $\alpha$ -galattosidasi fungine raggiungono la loro massima attività al pH estremamente acido (2.7-4.0) e a temperature superiori a 50 °C (Bahl e Agrawal 1969, 1972; Li e Shetlar 1964; Suzuki *et al.*, 1970). L' $\alpha$ -galattosidasi isolato da *L. fermentum* ha mostrato la sua massima attività a pH 5,8 e a temperature tra 35 °C e 45 °C. Da ulteriori studi è emerso che le condizioni ambientali influiscono nella produzione di questo enzima, nello specifico si è osservato che la produzione dell'enzima era influenzato principalmente dalle fonti di carbonio (Garro *et al.* 1996b).

La  $\beta$ -glucosidasi è un altro importante enzima che esercita un effetto sui micronutrienti del latte di soia, quali gli isoflavoni. La  $\beta$ -glucosidasi idrolizza i legami  $\beta$ - (1-4) -glucosidici con conseguente rilascio di glucosio. Gli isoflavoni esistono in diversi tipi di forme: aglicone (daidzeina, genisteina e gliciteina), glucoside (daidzina, genistina e glicitina), malonil glucoside e acetil glucoside (Kudou *et al.*, 1991). I coniugati glucosidici degli isoflavoni sono convertiti in agliconi dalla  $\beta$ -glucosidasi durante la lavorazione della soia (Toda *et al.*, 2001; Yin *et al.*, 2004). Le  $\beta$ -glucosidasi contribuiscono alla bioconversione degli isoflavoni negli agliconi, che possono essere così assimilati dall'uomo. Essi hanno innumerevoli effetti benefici sulla salute umana, quale: hanno un ruolo nella prevenzione dell'osteoporosi (aiutando la mineralizzazione ossea), hanno un effetto ipocolesterolemizzante, svolgendo un ruolo importante nella prevenzione di malattie cardiovascolare e diversi tumori ormone-dipendenti (Adlercreutz 2002; Omoni e Aluko 2005; Setchell e Cassidy 1999).

La principale componente nutritiva della soia e dei suoi derivati è rappresentata dalle proteine. Le più rappresentative sono le globuline, quali la glicinina e la conglucina, sono inoltre presenti amminoacidi essenziali come la fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina (utile

all'assorbimento di vitamine da parate del nostro organismo<sup>7</sup>), treonina, triptofano, valina e, a bassa concentrazione, gli amminoacidi contenenti zolfo (metionina/cisteina).

Il valore nutritivo delle proteine alimentari dipende dalla biodisponibilità degli amminoacidi o dalla digeribilità delle proteine. I miglioramenti nella digeribilità producono piccole catene di peptidi e rilascio di peptidi bioattivi; in generale, il trattamento termico migliora la digeribilità delle proteine della soia grazie alla riduzione degli inibitori della tripsina e altri fattori anti-nutrizionali (Hui, 2012).

La soia ha un contenuto lipidico discreto con una presenza molto bassa di grassi saturi; è priva di colesterolo ed è ricca in acidi grassi omega 6 e omega 3. È possibile trovare calcio (4 milligrammi ogni 100 grammi), varie vitamine (E, A, K, gruppo B) e gli isoflavoni (ormoni vegetali).

Sono inoltre numerosi i benefici che possono derivare dal latte di soia; tra questi vi è:

- 1. Migliorare il profilo lipidico del sangue:** a differenza del latte vaccino, che è ricco di grassi saturi e colesterolo, i grassi del latte di soia sono per lo più insaturi ed è privo di colesterolo. Gli acidi grassi monoinsaturi e polinsaturi presenti nel latte di soia possono inibire il trasporto del colesterolo nel sangue. Gli studi hanno dimostrato che l'assunzione regolare di soia può ridurre significativamente le concentrazioni ematiche di trigliceridi e lipoproteine a bassa densità (LDL) e aumentare il livello delle lipoproteine ad alta densità (HDL)<sup>9</sup>.
- 2. Rafforzare l'integrità dei vasi sanguigni:** gli acidi grassi omega-3 e omega-6 così come i fito-antiossidanti nella soia possono proteggere efficacemente i vasi sanguigni dalle lesioni e dall'emorragia. Questi composti si legano al rivestimento dei vasi sanguigni e difendono le cellule del rivestimento da attacchi dei radicali liberi e depositi di colesterolo. Il legame di questi nutrienti migliora anche la fluidità e la flessibilità dei vasi sanguigni in modo che siano molto più resistenti ai cambiamenti della pressione sanguigna<sup>9</sup>.
- 3. Prevenire l'osteoporosi:** l'osteoporosi è un'altra malattia legata all'età. Il fitoestrogeno presente nella soia può aiutare ad accelerare l'assorbimento del calcio



da parte del corpo e prevenire la perdita di massa ossea. Per il massimo beneficio, è bene acquistare il latte di soia fortificato con calcio e vitamina D<sup>9</sup>.

4. **Prevenire il cancro:** il latte di soia è una ricca fonte di fitoestrogeni, un ormone vegetale unico che può inibire la produzione, a livelli sierici, di estrogeni e testosterone, riducendo così il rischio di cancro al seno e alla prostata<sup>9</sup>.
5. **Agire come antiossidante:** gli effetti antiossidanti degli isoflavoni di soia possono essere utili contro alcune malattie croniche. Il latte di soia o il tofu hanno proprietà antiossidanti ed epatoprotettive, che aiutano a ridurre lo stress ossidativo e i danni da esso causati. Inoltre, i risultati di alcuni studi di ricerca, sugli effetti benefici svolti dal latte di soia, suggeriscono che le proprietà antiossidanti del latte di soia possono aiutare ad aumentare la capacità antiossidante e ridurre i sintomi della menopausa nelle donne<sup>9</sup>.

La bevanda vegetale a base soia può presentare delle controindicazioni, sia a livello di carenze nutrizionali, sia a livello di elementi che in circostanze specifiche potrebbero risultare dannosi all'essere umano. Per quel che riguarda le carenze, è opportuno mettere in evidenza che il latte vaccino e gli alimenti che ne derivano costituiscono una fondamentale fonte di calcio e di vitamina D, che è la sostanza che fa sì che il calcio venga fissato nelle ossa. Occorre ricordare che questo alimento non dovrebbe essere consumato da chi ha carenze di iodio più o meno significative e da chi ha problemi ai reni, in quanto la soia (di conseguenza anche i suoi derivati) presenta un contenuto elevato di un sale, l'ossalato, che può favorire la comparsa di calcoli renali.

## 1.5 Succhi di frutta e bevande a base di frutta e verdura

Il DLGS 151/04 definisce i succhi di frutta come “il prodotto fermentescibile ma non fermentato, ottenuto da frutta sana e matura, fresca o conservata al freddo, appartenente ad una o più specie e avente il colore, l'aroma e il gusto caratteristico della frutta da cui proviene”.

L'estrazione dei succhi di frutta può avvenire mediante centrifuga (a caldo) oppure mediante estrattori a freddo. Partendo dai succhi di frutta si possono poi ottenere, mediante specifici procedimenti: succo di frutta da concentrato, succo di frutta concentrato, succo di frutta disidratato o in polvere. In Figura 5, è schematizzato il processo produttivo dei succhi di frutta.

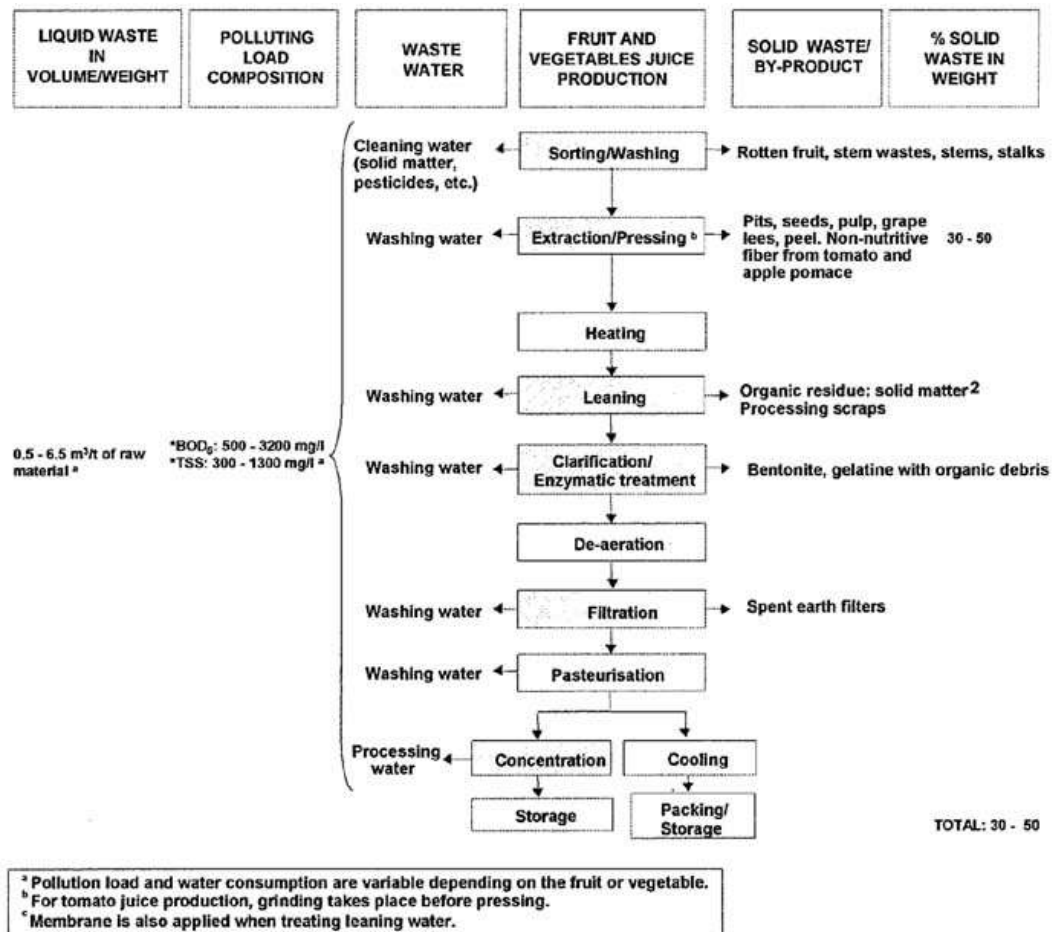


Figura 5: Processo produttivo dei succhi di frutta (BAT for Food, Drink and Milk Industries, June 2005).

I succhi di frutta sono una ricca fonte di vari nutrienti e composti bioattivi, come: fibra, zuccheri, acidi organici, fosfati, minerali, vitamine e antiossidanti. Quasi privi di grassi e proteine, hanno un buon apporto energetico. Il contenuto in vitamine è ridotto rispetto alla frutta fresca, a causa della pastorizzazione, processo indispensabile per la conservazione dei succhi (Stratford e James 2003).

Lo zucchero contenuto in succhi di frutta naturali varia a seconda del tipo di frutta. Tutti i succhi di frutta contengono fruttosio ma varia la quantità di saccarosio, glucosio e sorbitolo.

Oltre a zuccheri, vitamine e minerali, i succhi di frutta contengono un altro componente importante: la fibra. È stato confermato che la fibra nelle diete può migliorare la salute dell'apparato digerente e aiutare a prevenire malattie cardiache, diabete, aumento di peso e alcuni tipi di cancro (Anderson, *et al.*, 2009).

Per questo motivo, alcuni produttori aggiungono i succhi con vitamine, come la vitamina C, che ha un effetto conservante, e fibre<sup>10</sup>.

Per bevande a base di frutta e verdura si intendono invece succhi di frutta e verdura aggiunti di altri ingredienti oltre ai derivati della frutta. Aggiungendo acqua e zuccheri, miele, o entrambi, ai succhi di frutta e loro derivati precedentemente menzionati o alla purea di frutta o ad una miscela di questi prodotti si ottengono i nettari di frutta. L'aggiunta di zuccheri è consentita nel limite massimo del 20% in peso rispetto al peso totale del prodotto finito. Nella produzione dei nettari senza zuccheri aggiunti o con debole apporto energetico, gli zuccheri sono sostituiti totalmente o parzialmente da edulcoranti.

Una delle bevande a base vegetale maggiormente apprezzata e popolare è il succo di carota, usato come naturale fonte di provitamina A, per la sua naturale fonte di betacarotene e sali minerali come ad esempio il potassio.

<sup>7</sup>Cfr:<https://www.greenme.it/mangiare/altri-alimenti/20485-latte-di-soia-proprietà>

<sup>8</sup>Cfr:<https://www.casasuper.it/latte-di-soia-proprietà-benefici-controindicazioni.html>

<sup>9</sup>Cfr:<https://www.fitday.com/fitness-articles/nutrition/healthy-eating/6-health-benefits-of-soy-milk.html>

Il succo di carota è anche una fonte alimentare umana di poliacetileni, metabolita secondario utile alla difesa della pianta stessa e avente effetti positivi sulla salute umana.

Tra i benefici espliciti da succo di carota vi è:

- **Miglioramento del sistema immunitario e prevenzione delle malattie cardiovascolari:** le carote sono una ricca fonte di vitamina A e beta-carotene. L'abbondanza di vitamina A nel succo di carota può prevenire l'insorgenza di malattie cardiache e ictus, essa mantiene inoltre, il rivestimento degli organi interni sano, evitando così che venga infettato da organismi patogeni (Andrew S Potter *et al.*, 2011).
- **Riduzione del colesterolo:** il potassio presente nel succo di carota può ridurre i livelli di colesterolo, riducendo così il rischio di disturbi cardiaci (Stephen Blauer, 1989).
- **Facilita la rimarginazione di ferite esterne:** azione svolta dalla vitamina C, presente in grandi quantità (Sharma, 2005).
- **Previene il cancro:** il succo di carota è considerato come un agente anti-cancerogeno, tale azione viene esplicita dai carotenoidi, i quali aiutano a ridurre l'insorgenza di cancro alla vescica, alla prostata, al colon e al seno (Potter *et al.*, 2011).
- **Migliora la salute delle ossa:** la vitamina K, contenuta nel succo di carota, aiuta a legare il calcio alle ossa, che a sua volta porta alla guarigione più rapida delle ossa rotte. Inoltre, la vitamina K e il potassio, presenti nel succo di carota, sono essenziali per il processo di formazione delle proteine nel corpo e il miglioramento della salute delle ossa (Sharma, 2005).
- **Apporta benefici intestinali:** la natura antifatulenta, diuretica, digestiva e carminativa del succo di carota aiuta ad eliminare il gas presente nello stomaco e nell'intestino, fornendo così sollievo (Sharma, 2016).
- **Aumenta il metabolismo:** il succo di carota contiene una grande quantità di vitamina B, che aiuta a scomporre glucosio, grassi e proteine. Anche il fosforo nel succo di carota aumenta il metabolismo del corpo, assicura un uso ottimale dell'energia nel corpo e diminuisce il dolore dopo un allenamento (Pollot, 2010).

- **Aumenta la capacità di carico dell'ossigeno:** La quantità di ferro nel succo di carota può aiutare ad aumentare la capacità di carico dell'ossigeno del corpo, aiutando così l'allenamento e la perdita di peso (Goel *et al.*, 2007).
- **Controlla i livelli di zucchero:** il magnesio, il manganese e i carotenoidi presenti nel succo di carota possono stabilizzare i livelli di zucchero, prevenendo così l'insorgenza del diabete. È noto infatti che i carotenoidi influenzano inversamente la resistenza all'insulina, riducendo così i livelli di zucchero nel sangue (Calbom, 2010).
- **Aiuta la digestione:** il succo di carota grazie al calcio e al magnesio lenisce il rivestimento dello stomaco e, grazie alla presenza di fibre, accelera il processo di digestione e aumenta il senso di sazietà (Blauer,1989).

Tuttavia, il succo di carota non trattato ha un potenziale di mercato limitato a causa della sua breve *shelf-life* e dovrebbe essere consumato entro uno o due giorni.

La produzione di succo di carota per scopi commerciali comporta: la pulizia delle carote, taglio, lo sbiancamento, trattamento a HPP (High Pressure Processing) e abbassamento del pH, al fine di allontanarlo dal pH iniziale, di circa 6.0, e stabilizzare il prodotto rendendolo meno sensibile alle contaminazioni batteriche.

Le carote vengo pulite con acqua potabile e tagliate a pezzi, viene successivamente effettuato il processo di sbiancamento utilizzando acqua calda a  $90 \pm 1$  °C per 2 minuti con acido citrico allo 0,3% (usata per preservare il colore, prevenire la coagulazione delle proteine nel succo di carota, inattivare enzimi e microbi, rimuovere l'aria intrappolata e fare la proto-pectina solubile).

La carota viene successivamente sminuzzata per pochi minuti ad elevate velocità (viene quindi raccolto il surnatante come prodotto grezzo). Il prodotto così ottenuto viene posto a HPP a 400 MPa / 40 °C / 1 min (Zhang *et al.*,2015).

Il consumo del succo di frutta e delle bevande a base di frutta è aumentato costantemente negli ultimi anni. Le bevande hanno costituito una porzione significativa (33-73%) di nuovi prodotti promotori di salute. Un'ampia varietà di succhi e bevande sono attualmente disponibili sul mercato, in cui rappresentano un importante segmento a livello nazionale ed

internazionale. Tra queste possiamo ricordare i succhi (100% succo), le miscele di succhi (combinazioni di diversi succhi), le bevande di succhi (non 100% succo) e le bevande aromatizzate. Questi prodotti possono essere venduti freschi, refrigerati, concentrati, congelati, concentrati non congelati, sotto forma di sport drinks, energy drinks, ecc <sup>11</sup>.

Come noto i succhi sono bevande composte al 100% da frutta senza zuccheri aggiunti, mentre i nettari sono bevande che contengono almeno il 25% di frutta con aggiunta di zuccheri. I succhi interi rappresentano la parte preponderante dei consumi, mentre in molti paesi dell'Est Europa sono più popolari i nettari <sup>12</sup>.

A parte vengono poi considerati i succhi e nettari biologici, a base di frutta e zuccheri provenienti da coltivazioni biologiche, che al momento però rappresentano solo una nicchia di mercato <sup>11</sup>.

Un altro dei segmenti emergenti è quello degli "smoothies" (frullati), bevande a base di frutta centrifugata con una caratteristica consistenza e morbidezza, grazie alla presenza di purea e pasta di frutta, talvolta in combinazione con latte o yogurt <sup>12</sup>.

## **1.6 Problematiche microbiologiche dei succhi di frutta**

La degradazione dei succhi e delle bevande a base di frutta può dipendere da danni fisici legati ai trattamenti di processo oppure da agenti microbici.

I succhi di frutta e le bevande contengono acqua, zuccheri, acidi organici (citrico, tartarico, malico), vitamine e oligoelementi. La presenza anche di molte sostanze azotate e vitamine crea un ambiente ideale per la crescita dei microrganismi, in particolare lieviti, muffe ed organismi acidofili (batteri lattici). Le alterazioni provocate da questa flora riguardano modificazioni sensoriali ed organolettiche come intorbidimento, odore e sapore di lievito di birra, rigonfiamento della confezione.

Il fattore più importante è il pH, generalmente compreso tra 2.0 e 4.5, i cui valori dipendono dalla percentuale di acidi organici (dallo 0.2% delle pere all'8% degli agrumi) presenti nel succo. Valori bassi di pH limitano la crescita e la sopravvivenza di molti patogeni che solitamente non risultano essere un problema per questo tipo di alimenti (Bevilacqua *et al.*, 2012).

Tuttavia, parecchi episodi di infezioni veicolate da alimenti sono attribuiti al consumo di succhi di frutta e bevande commerciali non pastorizzate o fresche, ma solo un caso ha portato alla morte. Questi episodi sono attribuibili ad agenti patogeni quali *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* e *Cryptosporidium parvum*. Mentre il 98% dei succhi venduti negli Stati Uniti sono pastorizzati o altrimenti trattati per controllare il rischio di contaminazione patogena, circa 151.6 milioni di litri di succo (il restante 2%) non sono pastorizzati e comportano di conseguenza un possibile rischio di contaminazione da batteri patogeni.

I prodotti non pastorizzati causano 6000 casi di malattia all'anno, secondo le valutazioni della FDA (Food and Drug Administration) degli Stati Uniti. Per richiamare il problema di contaminazione patogena dei succhi di frutta e bevande, la FDA richiede l'applicazione del protocollo HACCP che è ideato per identificare i potenziali pericoli e prevenirli, ridurli o eliminarli usando i processi di sanificazione che realizzano una riduzione di circa 5 cicli logaritmici del numero di agenti patogeni nei prodotti finali.

I batteri più comunemente incontrati nel deterioramento dei succhi di frutta e nelle bibite analcoliche includono specie di *Acetobacter*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Saccharobacter*, *Zymomonas* e *Zymobacter* (Tabella 4).

**Tabella 4:** batteri coinvolti nel deterioramento dei succhi di frutti<sup>13</sup>.

MICROORGANISMS	FOOD PRODUCTS	EFFECTS
<b>Acetic acid bacteria</b>		
<i>Acetobacter</i>	Apple cider, Soft drinks	Oxidation of ethanol Fermentation
<i>Gluconobacter</i>	Fruit juice concentrate	Turbidity
<b>Lactic acid bacteria</b>		
<i>Lactobacillus</i>	Orange juice concentrate, Soft drinks	Sour or off-taste Butter milk off-flavor Gummy slime or "ropiness"
<i>Leuconostoc</i>		Acetic acid, gas (CO <sub>2</sub> ), Ethanol
<b>Acidophilic heat resistant bacteria</b>		
<i>Alycyclobacillus acidoterrestris</i>	Apple-cranberry beverage Apple juice Orange juice concentrate Mixed fruit beverages	Phenolic or antiseptic odor or off-flavor with or without light sediment
<i>Bacillus coagulans</i>	Tomato juice Soft drinks	Flat sour spoilage
<i>B. macerans</i> <i>B. polymyxa</i> <i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i>	Tomato juice	Flat sour spoilage
<i>Clostridium pasteurianum</i> <i>C. butyricum</i>	Tomato juice Soft drinks Fruit juice	Increased acidity, gas, strong butyric odor
<b>Ethanol producing bacteria</b>		
<i>Zymomonas</i> <i>Saccharobacter fermentatus</i>	Apple cider Agave leaf juice	Ethanol production Ethanol production
<i>Zymobacter</i>		Ethanol production

I batteri strettamente aerobi e acidofili quali *Acetobacter* e *Gluconobacter* (*Acetomonas*) sono stati riconosciuti come la causa del deterioramento dei concentrati di frutta, del sidro di mela e dei soft drinks. I batteri lattici, *Lactobacillus* e *Leuconostoc spp.*, sono associati al deterioramento del succo di frutta provocando fermentazioni anomale e produzioni di gas, sviluppo di melma o di viscosità, produzione di odori e sapori estranei tipici dei prodotti lattiero-caseari e formazione di opacità e torbidità. Sono fra i microrganismi più significativi nelle trasformazioni dei succhi di agrumi.



Anche ai microrganismi sporigeni (*Bacillus* e *Clostridium ssp.*) sono attribuite cause di deterioramento dei succhi di frutta e nelle bevande. L'azione da parte di *Clostridium ssp.* è caratterizzata dalla produzione di gas, di un forte odore butirrico e dall'aumento dell'acidità

13

<sup>10</sup>Cfr:<http://www.quidanoiblog.it/index.php/2017/01/25/succhi-di-frutta/>

<sup>11</sup>Cfr:[https://www.beverfood.com/documenti/simei-numeri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009\\_zwd\\_9350/](https://www.beverfood.com/documenti/simei-numeri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009_zwd_9350/)

<sup>12</sup>Cfr:[https://www.beverfood.com/documenti/simei-numeri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009\\_zwd\\_9350/](https://www.beverfood.com/documenti/simei-numeri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009_zwd_9350/)

<sup>13</sup>Cfr:<https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2002/non-thermal-alternative-processing-technologies-for-the-control-of-spoilage-bacteria-in-fruit-juices-and-fruit-based-drinks/>

# CAPITOLO 2

## 2. Batteri lattici

I batteri lattici, o LAB, sono un gruppo eterogeneo di batteri Gram-Positivi, immobili, non sporigeni, con forma bastoncellare o coccica.

In natura ne esistono almeno 60 specie e la maggior parte di questi sono non patogeni, infatti alcuni di essi risultano avere una relazione simbiotica con il corpo umano. Sono generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) e/o come probiotici.

Il loro nome deriva dal fatto che hanno come caratteristica comune quella di produrre acido lattico come prodotto primario della fermentazione anaerobica.

I LAB non posseggono i citocromi ed una catena di trasporto degli elettroni, perciò traggono energia dalla sola fosforilazione a livello del substrato durante la fermentazione degli zuccheri.

Questo gruppo di batteri risulta avere esigenze nutrizionali complesse poiché richiedono amminoacidi, purine, pirimidine e vitamine per il loro sviluppo.

### 2.1 Classificazione dei batteri lattici

Sulla base della sequenza dell'rRNA i batteri Gram positivi si dividono rispetto alla quantità di G+C presente nel DNA:

- G+C % <55% del DNA: di questo macrogruppo fanno parte i *Clostridium* e batteri lattici come i *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* ed *Enterococcus*.
- G+C% > 55% del DNA: di questo macrogruppo fanno parte gli Actinomycetes e bifidobatteri.

Come mostrato in Figura 6, i LAB in base alla tipologia di metabolismo vengono suddivisi in:

- **I GRUPPO:** Omofermentanti obbligati: attraverso la via di Embden-Meyerhof-Parnas degradano il glucosio via glicolisi e non sono in grado di utilizzare i pentosi. Il piruvato viene poi ridotto ad acido lattico, unico prodotto della fermentazione. La sequenza metabolica porta alla produzione di due molecole di acido lattico e due molecole di ATP a partire da una molecola di glucosio. Di questo gruppo fanno parte alcuni ceppi di *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Pediococcus*.
- **II GRUPPO:** Eterofermentanti facoltativi: in presenza di esosi i microrganismi, appartenenti al genere *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella* ad alcuni Lattobacilli, fermentano attraverso la via degli esosomonofosfati con produzione equimolare di acido lattico, CO<sub>2</sub> ed etanolo, oppure possono seguire la normale glicolisi comportandosi perciò come omofermentanti. In presenza di pentosi, effettuano l'ossidazione di tali composti attraverso la via dei pentoso fosfati, senza produzione di CO<sub>2</sub>, portando però ad una minor produzione energetica.
- **III gruppo:** Eterofermentanti obbligati: non possono degradare il glucosio via glicolisi in quanto non possiedono l'enzima fruttosio 1,6 difosfato aldolasi che catalizza la scissione del fruttosio 1,6 difosfato in gliceraldeide-3-fosfato e diidrossi-acetone-fosfato. Per tale ragione essi fermentano il glucosio attraverso la via dei pentoso fosfati, ottenendo tre prodotti finali in rapporto equimolare: acido lattico, etanolo e CO<sub>2</sub>. Possono utilizzare anche i pentosi, nel qual caso senza produzione di CO<sub>2</sub>. Sono in grado di produrre anche piccole quantità di acido acetico.

Metabolismo	Ac. lattico	Ac. acetico	CO <sub>2</sub>	Tracce di altri componenti
<b>Omofermentanti</b> <i>Lactobacillus</i> <i>Streptococcus</i> <i>Pediococcus</i>	2 moli	tracce	Per certe specie a partire da pentosi	Acetaldeide, acetoino, di acetile, isobutanolo, 2-3 metilbutanolo
<b>Eterofermentanti</b> <i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i>	1 mole	1 mole il rapporto acetato/etanolo dipende dal potenziale redox del mezzo	1 mole	Idem omofermentanti + Etanolo, mannitolo, propanolo, etilacetato, etanolo, 2,3 butandiolo, ottandiolo

Figura 6: metabolismo omo ed eterofermentante dei batteri lattici.

### 2.1.1 Lattococchi

I batteri appartenenti al genere *Lactococcus lactis* sono dei Gram-positivi, catalasi negativi, mesofili (crescono a 10 °C ma non a 45 °C), anaerobi facoltativi, immobili di forma sferica (cocco) della grandezza di circa 0,5/1,5 µm che tendono a raggrupparsi in corte catene (Figura 7).

Il loro metabolismo è di tipo omofermentante con produzione di L (+) acido lattico, ma è stata riscontrata anche una produzione di D (-) acido lattico in condizioni di pH acido.



**Figura 7:** Cellule di *Lactococcus lactis*.

Essi infatti sono in grado di produrre acido lattico a partire dagli zuccheri (una delle ragioni per cui vengono ampiamente utilizzati nel settore lattiero caseario per la produzione di formaggi, yogurt, latticello, formaggi freschi e creme acide). Questi microrganismi per la crescita sono in grado di utilizzare glucosio, lattosio, maltosio, mannitolo, ribosio, saccarosio e trealosio “come fonti di carbonio”.

Esistono diverse sottospecie di questo genere, di grande interesse tecnologico, tra cui *diacetylactis*, *lactis* e *cremoris* che risultano avere differenze sia da un punto di vista fenotipico, genotipico e di utilizzo tecnologico (Bolotin, 2001).

Questi batteri mesofili, nel settore lattiero-caseario, sono in grado di prendere il sopravvento sulle altre colture ubiquitarie già dopo poche ore.

Successivamente, partendo dalla flora microbica appena stabilita, si avrà una diminuzione del numero di colture microbiche con una conseguente instaurazione di alcuni specifici ceppi di *Lactococcus*, grazie anche alla azione combinata tra produzione di batteriocine e di acidi organici.

Da alcuni studi è emerso che isolando ceppi presenti all'interno della matrice, esiste una maggiore variabilità tra ceppo e ceppo da un punto di vista fenotipico rispetto all'impiego di colture starter.

I Lattococchi sono generalmente caratterizzati da una capacità di idrolizzare l'arginina, metabolizzare gli zuccheri, avere un ottimo di temperatura attorno ai 40 °C e di essere in grado di crescere a queste condizioni (Salama *et al.*, 1991).

I test standard per la caratterizzazione fenotipica possono dare risultati ambigui sui lattococchi, specialmente per quelli isolati dalle matrici naturali.

Questa forte eterogeneità può essere però vista come un dato positivo poiché è proprio grazie alla presenza di batteri lattici non starter (NSLAB), dotati di specifiche caratteristiche metaboliche, che alcuni prodotti ottengono il loro caratteristico flavour (Beresford *et al.*, 2001).

Inoltre, le culture pure isolate da un ecosistema complesso, esprimono una attività metabolica fortemente diversa da un ceppo simile ma non isolato da una matrice complessa (Klijn *et al.*, 2005).

Questa differenza risulta interessante il ceppo non solo da un punto di vista metabolico, ma grazie al suo adattamento al substrato di crescita porta alla manifestazione genetica di diverse tipologie di metaboliti antimicrobici, tra cui le batteriocine, un altrettanto eterogeneo gruppo di molecole con attività inibitoria nei confronti dei microrganismi concorrenti, che verranno perciò prodotte nella forma e nella tipologia che risulterà essere maggiormente attiva nei confronti dei competitor presenti all'interno di quella specifica matrice (Hugas *et al.*, 1995; Ross *et al.*, 2000).

## 2.2 Biocontrollo e batteriocine

Per biocontrollo si intende l'impiego di uno o più microrganismi per inibire o controllare altri microrganismi. Il controllo può essere attuato direttamente da un microrganismo vitale (per esempio un fago) oppure può essere il risultato di azioni o di agenti indiretti (come la produzione di batteriocine). La microflora competitiva è costituita essenzialmente da agenti di biocontrollo. L'antagonismo lattico è un esempio di competizione microbica specifica. Il fenomeno dell'inibizione o dell'uccisione da parte dei batteri lattici di microrganismi strettamente correlati, patogeni o alteranti, che sono presenti in coltura mista è noto da oltre 80 anni. Il meccanismo di tale fenomeno non è ancora chiaro, tra i fattori identificati vi sono la produzione di antibiotici, perossido di idrogeno, diacetile e batteriocine, in aggiunta alla riduzione del pH e al consumo di nutrienti (James M. Jay 2009).

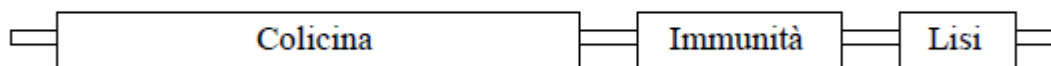
Secondo il concetto avanzato da Holzapfel (1995), ci si riferisce a quei microrganismi che, presenti naturalmente o aggiunti, hanno l'effetto di conservare/proteggere un prodotto alimentare. I microrganismi di cui si è parlato in relazione all'antagonismo lattico rispondono a tale definizione. Le proprietà delle colture protettive, di cui i batteri lattici costituiscono il gruppo più ampio e importante, sono di non presentare alcun pericolo per la salute, avere effetti benefici sul prodotto, non avere effetti negativi sulle proprietà sensoriali e servire come "indicatori" in condizioni di abuso.

I batteri, per loro stessa natura, sono in grado di attivare una straordinaria varietà di meccanismi di difesa. Tra questi sistemi rientrano i classici antibiotici, diversi prodotti secondari del metabolismo (come l'acido lattico prodotto dai lattobacilli), gli agenti litici, le esotossine e le batteriocine. Questo "arsenale biologico" è impressionante non solo per la sua diversità, ma anche per la sua naturale abbondanza.

Il termine batteriocina fu utilizzato per la prima volta negli anni '50 da Francois Jacob (Jacob *et al.*, 1953) per indicare composti proteici di origine batterica, prodotti indifferentemente da batteri Gram-positivi e Gram-negativi, dotati di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici differenti dal ceppo produttore, ma ad esso strettamente correlati. Caratteristica

comune di questa eterogenea famiglia di sostanze è di essere proteine, generalmente non ad ampio spettro battericida, estremamente stabili e resistenti.

La prima batteriocina è stata scoperta da Gratia (1925) come una proteina antibatterica prodotta da *Escherichia coli*, tale sostanza è stata chiamata colina (Figura 8). Il ricercatore André Gratia nel 1925 osservò la capacità di un ceppo di *Escherichia coli*, virulento in infezioni sperimentali, di produrre una sostanza stabile alle oscillazioni di temperatura e di possedere attività inibitoria nei confronti di altri ceppi di *E. coli*. Dal momento che la sostanza era in grado di uccidere *E. coli*, venne denominata “colicina” (Gratia, 1925).



**Figura 8:** Le colicine sono codificate in un operone, situato sul plasmide batterico, formato da tre geni strettamente legati tra loro: un gene che codifica la colicina, un gene immunitario e un gene di lisi (Fredericq, 1957).

Di fatto, quindi, le batteriocine furono scoperte prima della penicillina, ma inizialmente furono poco studiate a causa della straordinaria attività antimicrobica mostrata dagli antibiotici, che spinse la comunità scientifica a focalizzare l’attenzione su tali molecole e a sottostimare il problema dell’insorgenza delle resistenze a tali sostanze, oggi di primaria importanza per la comunità scientifica.

Sebbene in letteratura siano state spesso confuse con i classici antibiotici, le batteriocine mostrano specifiche caratteristiche (Tabella 5) (Drider e Rebuffat, 2011):

- sono sintetizzate a livello ribosomiale, mentre gli antibiotici sono sintetizzati da sistemi multi-enzimatici la cui biosintesi non è bloccata da inibitori della sintesi proteica, al contrario delle batteriocine;
- hanno uno spettro d’azione limitato e generalmente hanno attività battericida solo nei confronti di quei batteri strettamente correlati al ceppo che le produce, mentre gli antibiotici hanno uno spettro d’azione più ampio;
- hanno la capacità di uccidere i batteri a concentrazioni nanomolari, mentre gli antibiotici sono efficaci a concentrazioni maggiori.

**Tabella 5:** Caratteristiche delle batteriocine e degli antibiotici convenzionali (Cleveland et al., 2001).

<b>Caratteristiche</b>	<b>Batteriocine</b>	<b>Antibiotici</b>
<i>Applicazione</i>	Alimentare	Clinica
<i>Sintesi</i>	Ribosomiale	Metabolismo secondario
<i>Attività</i>	Spettro limitato	Ampio spettro
<i>Presenza di cellule immuni nell'ospite</i>	Presenti	Assenti
<i>Modalità d'azione</i>	Generalmente formazione di canali nella membrana	Bersaglio specifico
<i>Tossicità nelle cellule eucariotiche</i>	Assente	Presente

Negli ultimi anni, l'aumentata incidenza di resistenza mostrata dai batteri nei confronti della maggior parte degli antibiotici tradizionali, ha reso necessario comprendere il potenziale ruolo che le batteriocine potrebbero avere come validi sostituti. Si pensa, infatti, che le batteriocine siano una prima linea di difesa ideale nei confronti dei patogeni, in quanto vengono prodotte 100 volte più velocemente degli antibiotici e diffondono molto più rapidamente delle grandi molecole (Boman 1995, 1996).

Tali batteriocine sono sostanze che possiedono proprietà antibiotiche prodotte da batteri sia Gram+ che Gram-, ma le batteriocine normalmente non sono definite antibiotici per evitare confusione con gli antibiotici terapeutici che possono potenzialmente scatenare reazioni allergiche negli esseri umani (Cleveland *et al.*, 2001).

Le batteriocine si differenziano dalla maggior parte degli antibiotici terapeutici di natura proteica, e generalmente possiedono una specificità di azione ristretta contro i ceppi della stessa specie o strettamente correlate (Tagg *et al.*, 1976).

Questi composti sono un gruppo eterogeneo di molecole, tipicamente selezionate per essere impiegate come antagonisti specifici nei confronti di microrganismi degradativi di prodotti alimentari, e quindi come conservanti alimentari (Gillor *et al.*, 2004; Cotter *et al.*, 2005). In particolare, le batteriocine più utilizzate sono quelle prodotte da batteri lattici (LAB) a causa dell'utilizzo di questi ultimi nelle fermentazioni alimentari, ma anche perché considerati Generally Recognized As Safe (GRAS) dalla Food and Drug Administration (FDA). Da



segnalare anche il sempre più crescente interesse nell'uso dei batteri come agenti attivi nella formulazione di prodotti probiotici (Raffi e Ossiprandi, 2006). Le batteriocine prodotte dai LAB hanno quindi suscitato molto interesse per vari motivi: sono ingredienti naturali trovati praticamente in tutti gli alimenti fermentati e nei prodotti caseari, quindi sono stati consumati inconsapevolmente dagli uomini per migliaia di anni e inoltre, essendo in grado di inibire l'accrescimento di batteri degradativi e patogeni nelle derrate alimentari, possono essere utilizzate nell'industria alimentare come conservanti naturali.

Tuttavia, la loro efficacia negli alimenti può diventare limitata per vari motivi, quali resistenza del patogeno al metabolita o non sufficiente produzione della batteriocina a livelli tali da garantire un'inibizione microbica, inoltre il costo elevato rimane una problematica che ostacola il loro utilizzo come additivi alimentari.

In campo alimentare l'uso di antibiotici è vietato, quindi sostanze come le batteriocine, che hanno proprietà antimicrobiche, sono considerate un ottimo sistema per garantire la sicurezza e la conservazione degli alimenti. La ricerca e lo studio di nuove batteriocine da microrganismi GRAS è un campo di studio che ha preso sempre più piede negli ultimi anni, infatti i consumatori sono consapevoli dei pericoli per la salute derivanti dall'uso di additivi chimici alimentari, per questo i benefici derivanti dalla consumazione di alimenti "naturali", che non presentano l'uso di conservanti chimici, stanno diventando sempre più attraenti.

Possiamo quindi affermare che l'uso di conservanti nella lotta ai microrganismi è stata una pratica mantenuta per molti anni, ma l'applicazione delle batteriocine come bioconservanti alimentari è apparsa, nel tempo, come una buona alternativa ad antibiotici e conservanti chimici (Collins *et al.*, 2010).

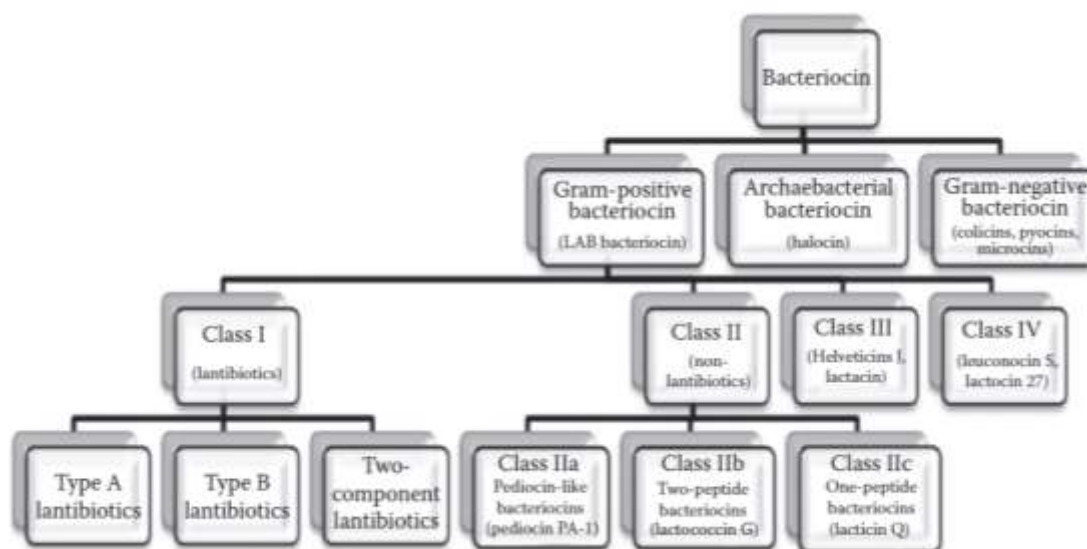
Già nel 1676, Antonie van Leeuwenhoek ha documentato l'antagonismo in cui il prodotto generato da un microrganismo inibiva la crescita di un altro (Jorger *et al.* 2000).

Le diverse batteriocine si distinguono in base alla specificità per l'ospite; i microrganismi che producono tali metaboliti primari sono detti colicinogeni, e sono immuni verso gli effetti letali della batteriocina che producono. Questa capacità di sintesi delle batteriocine, è un carattere che viene trasferito ereditariamente dal battere ai propri discendenti.

## 2.2.1 Classificazione delle batteriocine

La famiglia delle batteriocine comprende una grande varietà di peptidi e proteine facendo riferimento a dimensione, obiettivi microbici, metodologie d'azione ed immunità (Klaenhammer, 1993; Nes *et al.* 1996). Le batteriocine vengono, quindi, suddivise in varie categorie (Figura 9). La classificazione di tali metaboliti, negli anni, è stata rivista diverse volte a causa di nuove scoperte nel suddetto campo di studio. Secondo Klaenhammer (1993) le batteriocine possono essere classificate in quattro classi differenti:

- **Classe 1 o lantibiotici:** Classe rappresentata dalla nisina, raggruppa peptidi termostabili con un peso molecolare molto basso (<5 kDa), sottoposti a modificazioni post-traduzionali sono caratterizzati dalla presenza di lantionina e derivati;
- **Classe 2:** È composta da piccoli peptidi termostabili (<10 kDa), attivi sulla membrana cellulare. Questa classe è suddivisa a sua volta in tre sottoclassi
  - **Ila:** pediocina ed enterocina
  - **Ilb:** lactocina G
  - **Ilc:** lactocina B
- **Classe 3:** è composta da peptidi termolabili ad alto peso molecolare (>30 kDa);
- **Classe 4:** molecole dalla struttura complessa contenente componenti di natura lipidica e/o glucidica.



**Figura 9:** Classificazione delle batteriocine secondo Klaenhammer (1993).

Cotter Hill e Ross (2005) hanno suggerito una nuova classificazione per le batteriocine, in cui esse non sono più suddivise in quattro categorie, bensì in due: classe 1 (lantibiotici) e classe 2 (lantibiotici non contenenti lantionina).

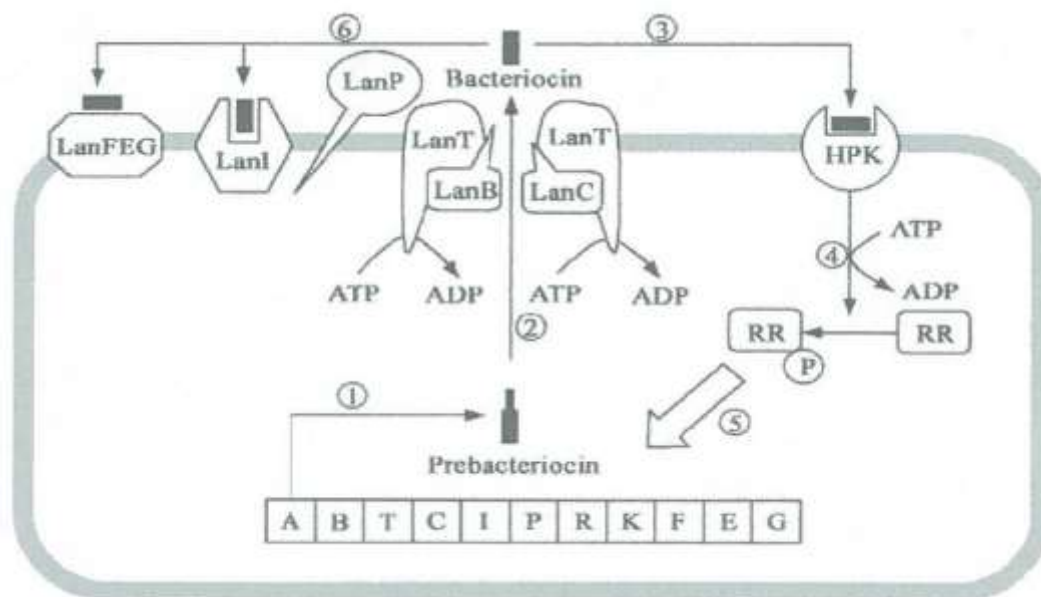
I componenti della classe 3 nella precedente classificazione, sono stati raggruppati a parte con il nome di “batteriolisine”; la classe 4 della classificazione precedente, secondo questi autori, doveva essere eliminata.

Infine, nel 2006, Drider *et al.* hanno suddiviso le batteriocine in tre classi principali in base alle loro caratteristiche genetiche e biochimiche. Tale classificazione è quella attualmente accettata dalla comunità di ricerca, e vede le batteriocine classificate nel modo seguente:

#### ❖ **Classe 1 (o lantibiotici)**

Le batteriocine appartenenti alla classe I vengono anche chiamate lantibiotici per la presenza di caratteristici aminoacidi policiclici, la lantionina e la  $\beta$ -metillantionina, che vengono introdotti a seguito di modificazioni post-trascrizionali. La loro presenza determina la formazione di strutture cicliche, che sembrano coinvolte nella resistenza dei lantibiotici all’azione delle proteasi (Chen e Hoover, 2003). I lantibiotici (Figura 10) sono piccoli peptidi costituiti da una serie di amminoacidi termostabili. Il rappresentante principale di questa

categoria di batteriocine è la nisina, la quale è sintetizzata da molti ceppi di *Lactococcus lactis subsp. Lactis* (Mulders *et al.*, 1991).



**Figura 10:** Un diagramma schematico della biosintesi dei lantibiotici: (1) Formazione della prebatteriocina; (2) La prebatteriocina è modificata a LanB e LanC traslocata attraverso un ABC-transportatore dedicato LanT e processata da LanP risultando in una batteriocina matura; (3) La proteina istidina chinasi (HPK) reagisce alla presenza della batteriocina attraverso un Processo di fosforilazione; (4) Il gruppo fosfato (P) è trasferito a un regolatore (RR); (5) RR attiva la trascrizione del gene regolatore; e (6) produce immunità alle cellule mediante proteine che legandosi alla batteriocina ne impediscono l'attività antibatterica, LanI. (Ross *et al.*, 2002).

I lantibiotici svolgono la propria attività attraverso la formazione di pori nella membrana batterica. Nel 1991, Jung ha proposto un'ulteriore suddivisione di questa classe, in base a struttura e proprietà antimicrobiche (Guder *et al.*, 2000), in "tipo A" e "tipo B", dove i primi sono molecole allungate con carica positiva, mentre i secondi sono molecole globulari non cariche.

I lantibiotici di tipo A sono molecole di forma elicoidale allungata e flessibile, anfipatiche, che agiscono depolarizzando la membrana e favorendo la formazione di pori nelle cellule bersaglio. Appartengono a questa classe la nisina A, nisina Z, pediocina, subtilina ed epidermina (Zacharof e Lovitt, 2012). Nel 1992, l'identificazione di un nuovo lantibiotico ha apportato un'ulteriore modifica a questa sottogruppo: tipo A-I, che comprende i lunghi peptidi, e tipo A-II, che include quei lantibiotici aventi un lungo e lineare dominio amino-terminale ed una porzione carbossi-terminale con conformazione globulare, come la lacticina (Bierbaum e Sahl, 2009). È possibile distinguere la lacticina in: lacticina 481 e lacticina 3147. La lacticina 3147 è una molecola antimicrobica ad ampio spettro, infatti

esibisce un'attività battericida nei confronti di tutti i batteri Gram + testati finora, è termostabile, agisce in un ampio range di pH, ed ha potenziali usi in industria alimentare ed in medicina. La lacticina 481 ha, invece, un medio spettro di inibizione, inibendo una vasta gamma di LAB e *Clostridium tyrobutyricum*, ed ha effetto batteriolitico su microrganismi sensibili (O'Sullivan *et al.*, 2002).

Vi sono poi i lantibiotici di tipo B: peptidi con conformazione globulare, di dimensioni di 2 kDa. Agiscono interferendo con le reazioni enzimatiche essenziali per la crescita e la sopravvivenza della cellula bersaglio, ad esempio impedendo la sintesi della parete cellulare (Sahl *et al.*, 1995). Possono avere carica netta negativa o neutra e appartengono a questa classe la lactocina B, mersacidina, actagardina e mutacina II (Abee, 1995; Cotter *et al.*, 2005).

## ❖ Classe 2

Questa classe comprende la maggior parte delle batteriocine prodotte dai LAB. In questa classe (Figura 11) vengono raggruppati piccoli peptidi termostabili, con peso molecolare inferiore a 10 kDa, anfipatici, cationici, idrofobici, costituiti da un numero variabile da 37 a 48 aminoacidi, con struttura elicoidale; tali caratteristiche consentono loro di inserirsi nella membrana citoplasmatica della cellula bersaglio, così da favorire la morte cellulare.

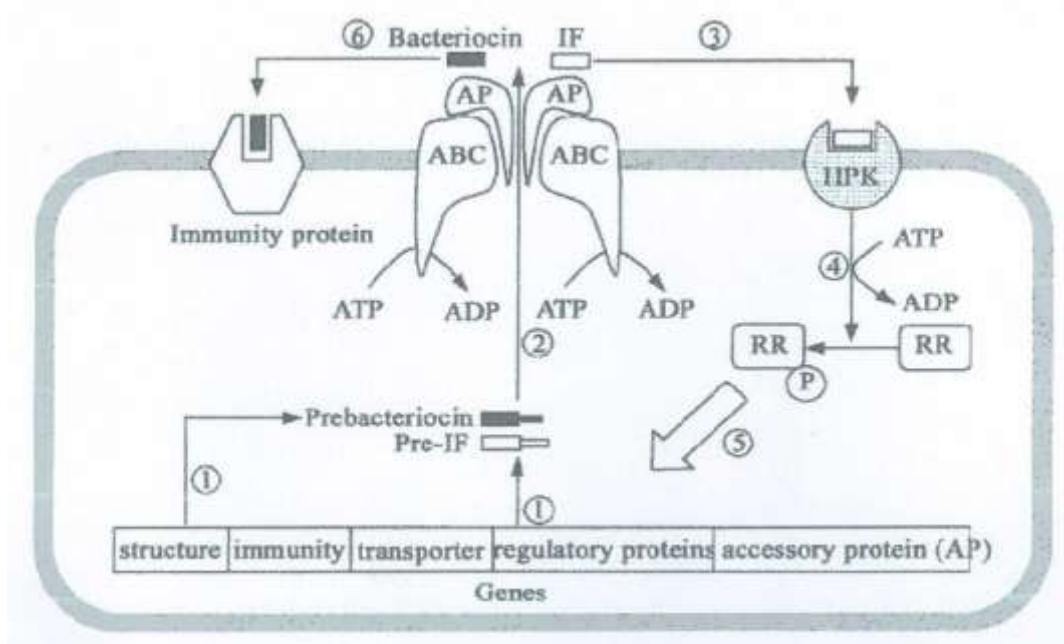
Queste batteriocine hanno uno spettro inibitorio ristretto, infatti inibiscono i microrganismi a basso contenuto di guanina+citosina (G+C). In alcuni casi può però succedere che un unico microrganismo batteriocina-produttore riesca a produrre più batteriocine.

Le batteriocine appartenenti a questa classe, vengono suddivise in ulteriori tre sottoclassi (Drider *et al.*, 2006):

- **Sottoclasse IIA:** comprende batteriocine con un'elevata specificità d'azione nei confronti di *Listeria monocytogenes* e che sono costituite da 37-48 aminoacidi (Fimland *et al.*, 2005). Tra queste la più importante è la pediocina PA-1 che è l'unica batteriocina appartenente alla sottoclasse IIA che viene sintetizzata non solo da diverse specie, ma anche da diversi generi di LAB (Bhunja *et al.*, 1987). Le batteriocine di questa classe penetrano nella membrana cellulare del microrganismo target dal terminale C, favorendo la formazione di pori e conseguente dissipazione

della forza proton-motrice (Kaiser e Montville, 1996). Inoltre, nel tentativo da parte della cellula target di ripristinare o mantenere la forza proton-motrice, si ha un'accelerazione del consumo di ATP, questo porta alla morte della cellula.

- **Sottoclasse IIB:** questa classe comprende batteriocine eterodinamiche, ovvero batteriocine che per agire richiedono l'azione combinata di due peptidi. Tali peptidi, solitamente, agiscono in combinazione evidenziando un'azione sinergica che porta ad avere la perdita del potenziale di membrana nel microrganismo target ed un calo intracellulare di ATP. Se impiegati singolarmente, tali peptidi hanno una scarsa attività (Garneau *et al.*, 2002). Normalmente i geni responsabili della sintesi di questi peptidi sono collocati sullo stesso operone (frammento di DNA in cui sono codificati più geni, e quindi più proteine, che hanno la medesima funzione).
- **Sottoclasse IIC:** le batteriocine appartenenti a questa classe presentano una struttura ciclica (Kawai *et al.*, 2004).



**Figura 11:** Un diagramma schematico della biosintesi delle batteriocine della classe II: (1) Formazione della pre-batteriocina e del pre-peptide del Fattore d'induzione (IF); (2) La prebatteriocina e il pre-IF sono processate e traslocate dal ABC-trasportatore risultando una batteriocina matura e IF; (3) La proteina Istidina chinasi (HPK) reagisce alla presenza dell'IF attivando un processo di fosforilazione; (4) Il gruppo fosfato (P) è trasferito a un regolatore (RR); (5) RR attiva la trascrizione del gene regolatore; e (6) produce immunità alla cellula mediante proteine che legandosi alla batteriocina ne impediscono l'attività antimicrobica. (Ross *et al.*, 2002).

### ❖ Classe 3

Chiamate anche batteriolisine, sono proteine termolabili ad alto peso molecolare (superiore ai 30 kDa), idrofile, che presentano una struttura proteica ciclica. Il loro meccanismo d'azione si distingue da quello di altre batteriocine in quanto provocano la lisi della parete cellulare del microorganismo bersaglio, portando quest'ultimo alla morte. In esse, sia la porzione C-terminale che N-terminale partecipano al fenomeno di rottura: la prima è infatti implicata nel riconoscimento della cellula bersaglio e la seconda, essendo analoga ad una endopeptidasi, promuove l'idrolisi dei legami peptidici, componenti indispensabili per l'integrità della parete.

### ❖ Classe 4

Le batteriocine appartenenti alla classe IV sono macromolecole termostabili idrofobiche, cicliche, caratterizzate dalla presenza nella loro struttura di componenti non proteiche indispensabili per la loro attività, come lipidi o glucidi.

## 2.2.2 Sintesi delle batteriocine

Molti lavori mostrano che specifici mezzi di coltura e fattori fisici ben controllati, come pH e temperatura, sono necessari per ottenere la maggiore produzione di batteriocine. La produzione delle batteriocine è solitamente studiata in terreni ricchi complessi e i parametri che vengono più spesso considerati sono la fonte carboniosa e fonte azotata.

Le batteriocine sono solitamente sintetizzate come pre-peptidi inattivi, dei precursori che vengono trasportati sulla superficie della cellula durante la fase di crescita esponenziale e convertite enzimaticamente nella forma attiva, per alcune classi di batteriocine esistono anche delle proteine che hanno lo scopo di facilitare la traslocazione attraverso la membrana. In generale, la produzione di batteriocine è massima a metà della fase

esponenziale od alla fine della fase di crescita (Villani *et al.*, 1993; Martin-Cuesta *et al.*, 2001; Sarantinopoulos *et al.*, 2002; Aktypis *et al.*, 2003).

Il sistema di regolazione della produzione di batteriocine è costituito da tre componenti:

- un fattore di attivazione (peptide o feromone di induzione),
- un recettore del feromone (l'istidin-chinasi di transmembrana)
- un regolatore di risposta (Nes e Eijsink, 1999).

Il peptide induttore viene sintetizzato nei ribosomi a bassi livelli sotto forma di pre-peptide che viene poi secreto nell'ambiente esterno attraverso il sistema di trasporto transmembrana, quando la concentrazione all'esterno della cellula raggiunge un determinato valore attiva la istidin-kinasi transmembrana che facilita l'auto-fosforilazione del residuo istidinico trasferendo così il gruppo fosfato alla proteina regolatrice che a sua volta attiva la trascrizione della batteriocina insieme a degli elementi che compongono il sistema di regolazione creando così un feedback positivo (Balciunas *et al.* 2012).

Il gene che codifica questo particolare tipo di peptide spesso porta con sé anche altre informazioni come quella di immunità, secrezione, regolazione e modificazione dello stesso.

Possono esistere anche delle modificazioni nell'informazione, sia per il numero di basi, che per il tipo di basi, per le interazioni della struttura secondaria o terziaria e per la specificità del sito attivo, tutto questo permette di diversificare molto il range di azione delle batteriocine (Rink *et al.*, 2007).

Nonostante le differenze strutturali e fisiche tra le batteriocine appartenenti alle quattro classi separate, si può presumere che la formazione di pori e canali ionici nella membrana citoplasmatica della cellula microbica attaccata, sia il tipico modo di azione delle batteriocine dei LAB (Klaenhammer, 1993; Abee *et al.*, 1995; Moll *et al.*, 1999).

Le trasformazioni post-traduzionali sono implicate nella stabilizzazione della molecola stessa e contribuiscono a formare la struttura elementare necessaria per l'attività antimicrobica. La sequenza originale della struttura del gene relativo alla batteriocina può essere modificata enzimaticamente, proteoliticamente processata durante la secrezione e ripiegata in modo



da formare la struttura secondaria e terziaria, questo passaggio è fondamentale per il corretto funzionamento poiché influisce sul meccanismo di azione stesso.

Alcuni lavori effettuati anni fa mostrarono l'inattivazione di batteri patogeni Gram - attraverso l'uso combinato di batteriocine prodotte da batteri Gram + e di agenti chelanti (ad esempio EDTA), che funzionano al diminuire delle proprietà di barriera fornite dalla membrana esterna lipopolisaccaridica propria dei batteri Gram - (Stevens *et al.* 1991; Shefet *et al.* 1995; Scanell *et al.* 1997; Helander *et al.*, 1997). Da ciò si può trarre la conclusione che l'uso combinato in maniera adeguata di batteriocine, processi di trasformazione ad additivi, può ampliare significativamente lo spettro di azione di alcune batteriocine prodotte dai LAB contro batteri Gram -.

Un mezzo comunemente utilizzato per rilevare e valutare l'attività di una batteriocina, è l'uso di substrati agarizzati in piastre petri. Mayr Harting *et al.* (1972) hanno recensito un certo numero di questi metodi, dei quali esistono molte varianti, la maggior parte delle quali deriva dall'approccio "spot-on-lawn".

Kekessy e Piguet (1970) descrissero una procedura nella quale il ceppo produttore di batteriocine ed ogni ceppo indicatore vengono coltivati su mezzi di coltura ottimali e diversi. La coltura produttrice viene spot-inoculata e distesa sulla base di una piastra Petri, e dopo la crescita, la massa di agar viene asetticamente rigirata (con una spatola) dal basso della capsula di petri, e trasferita al coperchio. Una sovrapposizione di soft agar inoculato con l'indicatore viene quindi versato sopra all'agar invertito. A seguito di una incubazione, le colture produttrici di batteriocine sono visualizzate con la formazione di un alone di inibizione nel terreno attorno al punto originale della crescita. È noto però che gli agenti gelificati utilizzati in terreni solidi, possono interferire con la diffusione delle batteriocine, limitando così l'efficacia di questi metodi di screening (Lindgren e Clevstrom, 1978).

### 2.2.3 Fattori che influenzano l'efficacia di una batteriocina

Le batteriocine impiegate nel settore alimentare vengono suddivise in due differenti categorie:

- **BATTERIOCINE IN SITU:** sono batteriocine che vengono prodotte da un microrganismo quando esso è all'interno della matrice;
- **BATTERIOCINE EX SITU:** sono batteriocine che vengono prodotte *in vitro*, ed addizionate direttamente alla matrice.

I fattori che possono influenzare l'efficacia di una batteriocina ex situ sono molti, infatti, oltre ad avere interazione con i vari componenti di un alimento, queste batteriocine possono essere sensibili ai processi di lavorazione di un alimento ed alle sue condizioni di stoccaggio, come pH e temperatura del prodotto.

Anche nel caso della produzione ex-situ di batteriocine, alcuni fattori possono inibirne la produzione e l'efficacia. Un esempio di ciò è NaCl che in determinate concentrazioni può ridurre la crescita dei batteri lattici e di conseguenza la produzione di batteriocine, oltre a proteggere i batteri bersaglio come *L. monocytogenes* della loro azione (Hugas *et al.*, 2002). Secondo Drosinos *et al.* (2005) il pH ottimale per la produzione di una batteriocina (5.5) non corrisponde a quello ottimale per la crescita microbica (6.5). A causa della loro massima stabilità in condizione acide, l'attività della nisina è incrementata quando essa viene usata in alimenti acidi. Dal punto di vista della temperatura, invece, Leroy e Den Vuyst (1999) ha riferito che l'attività di una batteriocina diminuisce con l'aumentare della temperatura a causa della maggiore attività delle proteasi.

L'efficacia inibitoria di una batteriocina, dipende anche dal livello di contaminazione dell'alimento in esame da parte del microrganismo bersaglio; se la contaminazione è troppo alta, infatti, l'attività della batteriocina non risulta sufficiente ad inibire lo sviluppo del contaminante.

Lacticina 3147 è una batteriocina in grado di inibire la crescita di molti patogeni alimentari, quindi sembra essere adatta per fungere da conservante alimentare. Uno dei patogeni alimentari con cui lacticina 3147 può essere utile è *L. monocytogenes* (Berry *et al.*, 1990;

Benkerroum *et al.*, 2002). Un certo numero di studi sono stati anche effettuati per verificare se l'efficacia di lacticina 3147 potrebbe essere migliorata attraverso il suo uso in combinazione con altri trattamenti antimicrobici (Morgan *et al.*, 2000; Scannell *et al.* 2000). Un esempio riguarda l'uso di alta pressione idrostatica a 150-600 MPa (Morgan *et al.*, 2000). Il co-trattamento con alte pressioni e lacticina 3147, ha aumentato la mortalità rispetto ai singoli trattamenti (Morgan *et al.*, 2000).

## 2.2.4 Meccanismi di resistenza alle batteriocine

Poiché la presenza di una sostanza antibatterica in un determinato ambiente può portare ad una selezione delle specie di batteri resistenti alla sostanza medesima, possono verificarsi casi di microrganismi batteriocina-resistenti.

La resistenza di mutanti spontanei alle batteriocine può essere determinata da delle variazioni nella membrana e nella parete cellulare, come alterazioni del potenziale elettrico, della fluidità, della composizione lipidica della membrana, dello spessore della parete cellulare o anche della combinazione di tutti questi fattori (Mantovani e Russel, 2001).

Il meccanismo di resistenza delle cellule alla nisina non è stato ancora ben compreso. Secondo Abee (1995), la resistenza di *L. monocytogenes* alla nisina è correlata alla variazione della composizione in acidi grassi delle membrane cellulari, che riduce la concentrazione di fosfolipidi ed impedisce così, la formazione di pori.

Sono stati identificati due sistemi di immunità dai lantibiotici da parte della cellula produttrice. La protezione può essere mediata da proteine di immunità; LanI, e da proteine ABC di trasposto specifiche, LanFEG (Reis *et al.*, 1994; Siergers e Entian, 1995; Peschel e Gotz, 1996; Saris *et al.* 1996; McAuliffe *et al.*, 2001) (LanI e LanFEG sono proteine coinvolte nella auto-protezione (immunità)). Questi due sistemi di immunità devono lavorare in sinergia per proteggere le cellule dalla propria batteriocina (Klein e Entian, 1994). LanI probabilmente conferisce protezione alle cellule produttrici, prevenendo la formazione di pori nella membrana citoplasmatica ad opera delle batteriocine. Lan FEG, apparentemente,

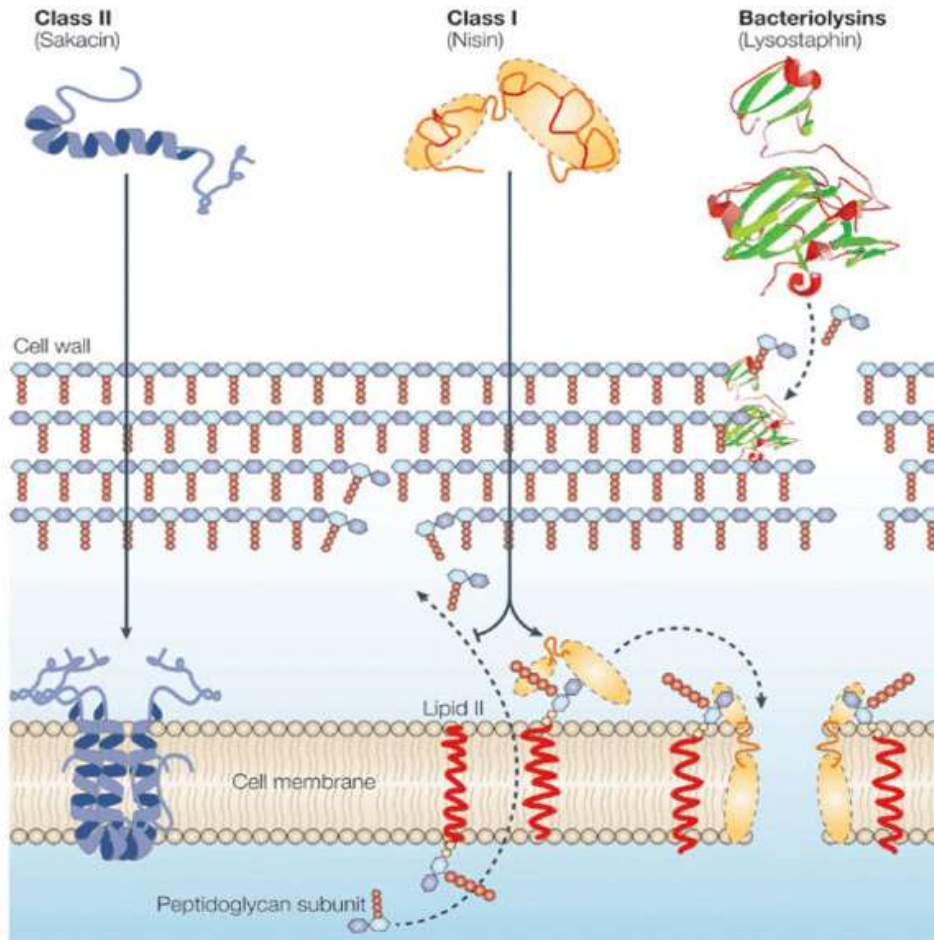
agisce trasportando le batteriocine che si sono inserite nella membrana, all'esterno della cellula, così da mantenere la concentrazione di batteriocine nella membrana al di sotto un livello critico. La proteina dell'immunità, che è cationica ed ha dimensioni comprese tra 51 e 254 aminoacidi, porta all'immunità totale nei confronti della batteriocina.

L'interazione della proteina dell'immunità con la membrana sembra essere il meccanismo attraverso cui il microrganismo produttore protegge sé stesso contro la propria batteriocina (Nissen-Meyer *et al.*, 1993; Venema *et al.*, 1994; Nes e Holo, 2000).

### **2.2.5 Meccanismi di azione delle batteriocine**

Analizzando la struttura delle batteriocine, possiamo andare a valutare quali potrebbero essere i target, la specificità in base al sito attivo e la possibilità che risulti tossica per l'uomo.

Risulta perciò estremamente importante conoscere il meccanismo di azione (Figura 12) di questi peptidi, infatti per manifestare la loro attività nei confronti del microrganismo target devono necessariamente legarsi ad uno specifico recettore posto sulla superficie della cellula e l'eventuale distribuzione di questo recettore sulla superficie delle cellule batteriche antagoniste risulta essere uno dei fattori limitanti.



**Figura 12:** Modalità d'azione di tre differenti batteriocine. La nisina, classe I, presenta una doppia modalità d'azione, potendosi legarsi al lipide II o formare pori nella membrana. Batteriocine di classe II come la sakacina, con struttura a elica, si inseriscono nella membrana portando a depolarizzazione e morte cellulare. Le batteriolisine di classe III possono agire direttamente sulla parete, portando a lisi e morte cellulare (Cotter et al., 2005).

Ad esempio, nella colicina, circa la metà della struttura del peptide ha lo scopo di riconoscere il recettore per esplicare la sua attività, mentre la nisina si lega ai lipidi, distribuiti lungo la membrana utilizzati per la sintesi della parete cellulare batterica (Riley e Wertz, 2002).

Sono stati studiati due diversi tipi di azioni svolte dalla nisina, uno di interferenza nei confronti della sintesi della parete cellulare e l'altro nella promozione della formazione di pori all'interno della membrana cellulare, questi due effetti fanno perciò sì che ci sia un cambio nella permeabilità della cellula con conseguente fuoriuscita dei composti essenziali per la cellula come gli ioni potassio, aminoacidi ed ATP attraverso i pori e con conseguente morte della cellula.

Il meccanismo primario di attacco ad opera della nisina è rappresentato principalmente dalla permeabilizzazione della membrana cellulare, che se presente ad elevate concentrazioni può portare anche ad una inibizione della sintesi della parete cellulare.

L'iniziale interazione tra batteriocine e la cellula è mediata dall'attrazione di carica tra il peptide cationico e la superficie della cellula carica negativamente, perciò andando a diminuire l'intensità di carica si avrà una diminuzione della stessa attività antimicrobica.

La carica positiva della nisina è data dal segmento C-terminale, questo risulta attratto dalla carica negativa della membrana fosfolipidica, in seguito, attraverso un legame specifico tra l'estremità N-terminale ed il recettore posto sulla superficie della cellula (lipid II), si ha la formazione di vari cerchi nella membrana cellulare grazie ai legami fatti dalla lantionina che portano alla formazione di una sorta di spirale e quindi di pori.

La mancata azione nei confronti delle cellule umane è dovuta al fatto che la parete di queste è composta da fosfatidilcolina e sfingomieline che determinano una carica positiva sulla superficie mentre quella dei batteri essendo formata da acidi teicoici, lipolisaccaridi e fosfolipidi, ha una carica superficiale negativa. Questa differenza di carica però risulta strettamente necessaria per il solo meccanismo di azione non mediato da un recettore sulla parete ma dalla interazione ionica (Moll, 1999).

L'altro meccanismo di azione ad opera della nisina è osservabile ad alte concentrazioni e a lunghi periodi di incubazione, durante la divisione cellulare la nisina impedisce la sintesi della parete, questo fa sì che le cellule figlie mostrino delle malformazioni nella parete.

Come precedentemente accennato, la medesima sequenza amminoacidica può dare origine a varie forme tridimensionali che avranno perciò una diversa attività, inoltre singoli aminoacidi risultano implicati nella formazione di legami specifici nel sito attivo della proteina, perciò la sostituzione di un particolare residuo amminoacidico può portare ad una diminuzione dell'attività (Rink *et al.*, 2007).

Le varianti della nisina prodotte sono state create andando a selezionare dei mutanti che presentavano delle sostituzioni con aminoacidi tali da mantenere inalterata la carica cationica della superficie peptide, questo risulta molto importante poiché è proprio questa carica che determina l'attività della batteriocina poiché la rende affine alla carica del microrganismo target.

La morte della cellula dovuta alla formazione dei pori può essere attribuita alla fuoriuscita di sostanze indispensabili per la vita della cellula come ioni fosfato, amminoacidi, ATP o altri metaboliti.

Esistono però casi in cui la specificità della batteriocina permette anche il passaggio di composti dotati di una carica, in questo caso la morte potrà avvenire a causa della dissipazione del gradiente transmembrana di pH o del potenziale elettrico, è il caso dei pori creati dalla nisina i quali risultano non specifici e portano perciò alla fuoriuscita di protoni ed altre molecole dotate di carica, andando così ad impedire la produzione di energia attraverso processi biosintetici, poiché basati sulla differenza di potenziale transmembrana (Oren *et al.*, 1999).

I modelli di formazione dei pori nella membrana cellulare dei microrganismi target proposti vedono l'interazione della batteriocina con la membrana attraverso i suoi due siti attivi, uno risulta essere responsabile per il legame con il recettore target ed il secondo è quello che porta alla vera e propria formazione del poro, la formazione richiede però un cambio di conformazione del peptide che passerà infatti dall'ambiente idrofilo a quello idrofobico della membrana, questo può avvenire in seguito allo slittamento dei peptidi in modo da ottenere una più affine superficie di contatto, in questo modo si avrà che i peptidi idrofili saranno al centro del canale mentre quelli idrofobici saranno all'esterno e cioè a contatto con la membrana (Abigail *et al.*, 2013).

L'azione di formazione del poro può però essere diversa, infatti questi possono essere temporanei o avere un tempo di vita più o meno variabile, si può però avere anche una formazione di micelle all'interno della membrana o una vera e propria dissoluzione di questa.

I modelli di formazione fino ad ora presi in considerazione sono i seguenti:

- **Il modello a botte:** questo è il più semplice proposto e venne coniato per spiegare l'azione della nisina, risulta specifico per quei composti che contengono una forma ad alfa-elica anfipatica, i peptidi vengono attratti dalla membrana cellulare attraverso interazioni elettrostatiche, l'aggregazione della batteriocina con la membrana porta ad un assottigliamento dello strato di fosfolipidi, in seguito si ha la formazione di un legame che porta all'integrazione all'interno

della membrana idrofobica della struttura ad alfa-elica. Secondo questo modello i pori formati dovrebbero avere una grandezza consistente.

- **Il modello a cuneo:** questo risulta essere una variante del modello a botte che meglio spiega il meccanismo della nisina e dei lantibiotici. Questo è stato sviluppato in seguito ad analisi svolte con NMR che indicavano che la nisina risultava essere parallela alla doppia membrana fosfolipidica, perciò non si aveva una vera e propria penetrazione del peptide nella membrana, ma che i fosfolipidi stessi, in seguito alla formazione del legame con la batteriocina, si riorientavano, questo fa sì che il poro formato non sia stabile ma che tenda a tornare al suo stato di doppio strato, concordemente con la breve durata misurata dei pori mediati dalla presenza di nisina (stimati nell'ordine dei millisecondi) e con la grandezza dei pori che risulta essere circa 1 nm di diametro.
- **Il modello toroidale:** questo può essere considerato come un ibrido tra i primi due modelli, infatti come nel modello a botte, i peptidi si orientano perpendicolarmente rispetto alla membrana e come nel modello a cuneo, l'orientazione dei fosfolipidi viene modificata ad opera delle interazioni con la batteriocina che facilita così la formazione del poro andando ad assumere una carica positiva che induce dei movimenti transmembrana conosciuti come flip-flop lipidici. Il poro toroidale risulta avere un lume formato da linee sfalsate di peptidi e lipidi della membrana. Si ha la formazione di un poro di grandi dimensioni.
- **Il modello a tappeto:** questo risulta essere il primo a prendere in considerazione la formazione di micelle all'interno della membrana cellulare, il peptide in questo caso si allinea parallelamente attraverso delle interazioni elettrostatiche, in seguito si ha una rottura della regione della membrana interessata ad opera di una azione "detergente" solta dalla batteriocina stessa, si ha così una copertura totale del peptide e la formazione della micella.
- **Il modello del canale aggregato:** anche questo risulta incorporare la formazione di micelle, nello specifico la modificazione della membrana non è dovuta solamente all'interazione della batteriocina con la membrana ma anche con lo spostamento di cationi che competono con l'interazione tra batteriocina-membrana. L'aggregazione del peptide avviene in maniera random, senza cioè un



orientamento e porta alla formazione di canali di varia dimensione in seguito alla formazione di micelle nella membrana. In questo modello non è perciò necessaria la penetrazione all'interno della doppia membrana (Yoneyama *et al.*, 2009; Oren *et al.*, 1999).

Perciò i meccanismi di azione per la formazione dei pori risultano essere imputabili a peptidi unici o ad aggregati di questi con formazione di oligopeptidi che cooperano alla formazione del poro.

I geni associati all'espressione delle batteriocine sono spesso presenti all'interno di operoni collocati in diversi punti del genoma batterico, la regolazione di questi avviene ad opera di promotori multipli, per esempio quella legata all'espressione della nisina, avviene ad opera di tre diversi distretti promotori, i quali a loro volta vengono regolati dalla presenza di nisina nell'ambiente esterno alla cellula.

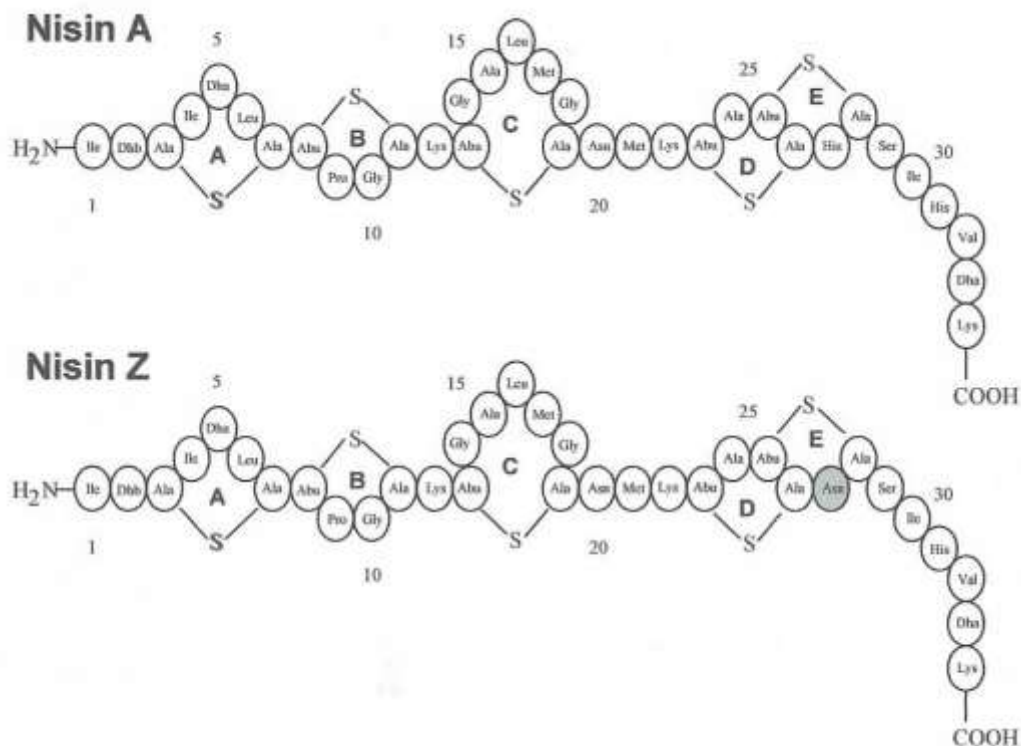
Ponendo la struttura della batteriocina e i geni di modificazione sotto il controllo di un solo promotore, o di un regulone, si favorisce l'induzione dell'espressione solamente sotto condizioni nelle quali la produzione avviene ad opera della batteriocine stesse quando queste raggiungono livelli elevati (Balciunas *et al.*, 2012).

## 2.3 Nisina

La nisina è una batteriocina prodotta da ceppi di *Lactococcus lactis*, sottospecie *lactis* e *cremoris* non è tossica presenta una struttura pentalicitica composta da 43 residui di amminoacidi. È dotata di un'attività inibitoria contro i microrganismi Gram+, tra cui molte specie di batteri lattici e alcuni patogeni di interesse alimentare quali *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, mentre, solitamente, non ha alcuna attività nei confronti dei batteri Gram-, lieviti e muffe.

La nisina appartiene alla classe 1 delle batteriocine e ne è la principale rappresentante. Oltre ad essere stata classificata come batteriocina di classe 1, è stata classificata anche come antibiotico tipo-A (peptidi allungati con carica positiva). Esistono almeno 6 forme diverse di nisina, ma le due varianti principali sono nisina A e nisina Z (Figura 13). La nisina A è il tipo più attivo e le due forme differiscono strutturalmente per un solo aminoacido, ma hanno attività simile (Mildres *et al.*, 1991).

Queste molecole mature contengono ciascuna: una lantionina (Lan), 4 metil-lantionina (MeLan), 2 deidroalalina (Dha) e acido deidro-amminobutirrico (Dhb prodotti per modificazioni post-traduzione del polipeptide precursore). Le lantionine formano cinque strutture ad anello (A, B, C, D e E) e due di questi anelli (D e E) sono fusi insieme per creare una doppia struttura ad anello.

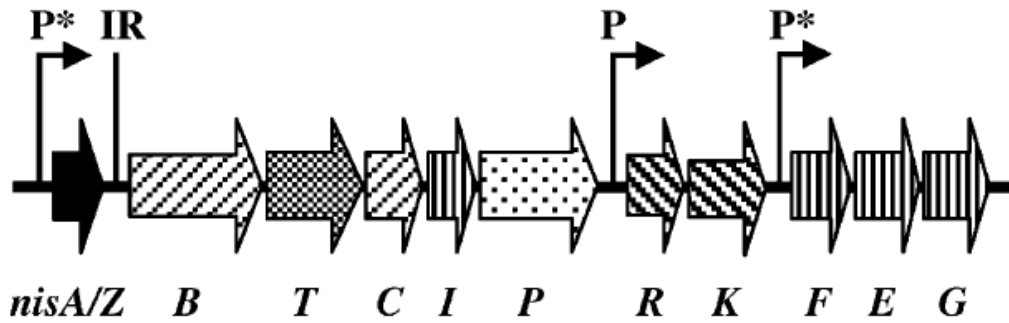


**Figura 13:** Strutture delle 2 varianti principali di nisina. Gli aminoacidi differenti rispetto a quelli presenti nella sequenza della nisina A sono rappresentati in grigio.

Il peso molecolare della nisina è di circa 3350 Dalton, è una molecola acida per natura, per questo motivo è stabile a pH=2.0 e può essere conservata a lungo a temperature di 2-7 °C, ma a pH=7.0 l'inattivazione avviene anche a temperature ambiente (Delves-Broughton, 1990). Vista la sua propensione a pH acidi, la nisina risulta particolarmente attiva ai pH caratteristici di frutta e di alcuni ortaggi (Leverentz *et al.*, 2003). È una molecola stabile al calore, resta attiva anche in seguito a pastorizzazione e sterilizzazione presentando un'eccellente stabilità durante la conservazione. La nisina risulta insolubile in condizioni neutre o alcaline. Un'altra caratteristica importante è che non contribuisce alla formazione di odori o sapori sgradevoli. Si tratta di un composto cationico e idrofobo che può essere degradato da certi additivi alimentari quali: metabisolfato di sodio (antiossidante, antimicrobico ad ampio spettro) e ossido di titanio (sbiancante) e da alcuni enzimi proteolitici. La nisina è più efficace alla temperatura di refrigerazione che non ad elevate temperature (Chung *et al.*, 1989). La produzione di nisina da ceppi batterici viene ridotta dall'areazione quindi la biosintesi della nisina avviene meglio in condizioni anaerobiche (Ray e Daeschel, 1992).

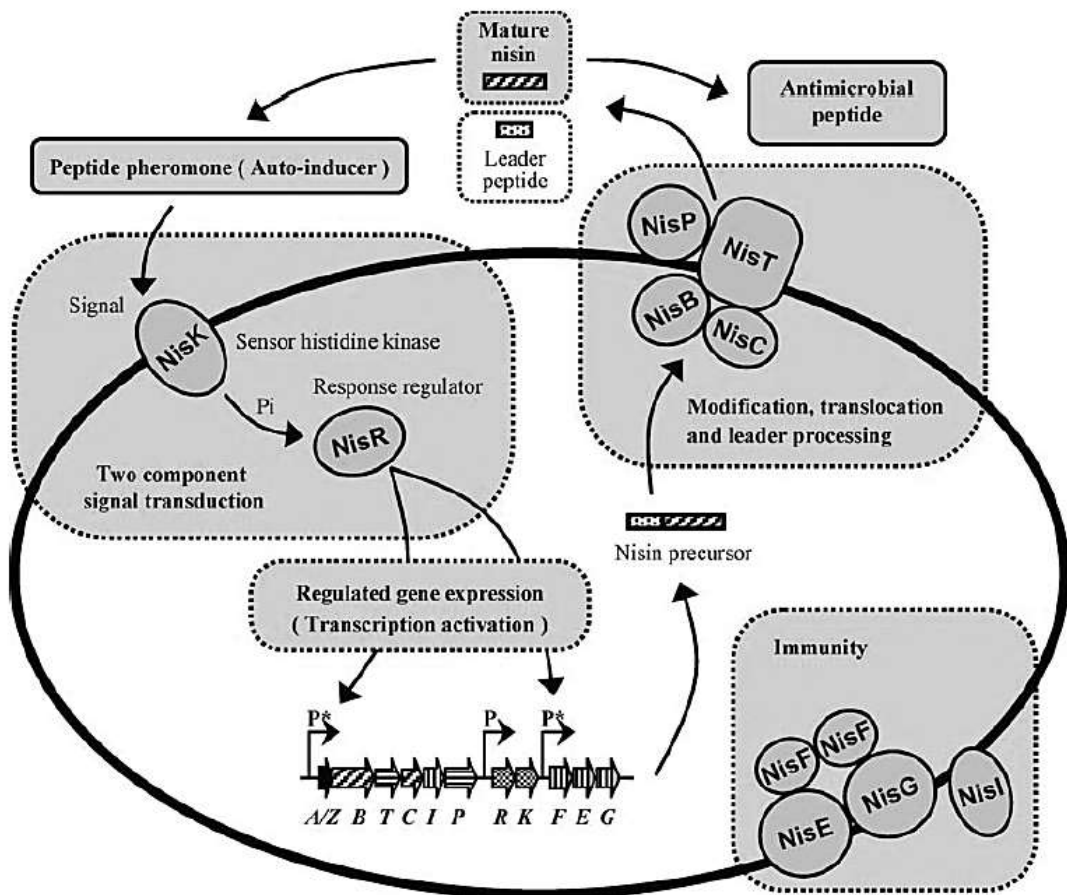
Recenti studi sulla biosintesi e regolazione della nisina hanno mostrato che questa batteriocina è prodotta in maniera dipendente alla densità cellulare e la sua biosintesi è sotto il controllo di un sistema a due componenti: una istidina chinasi e un regolatore della risposta. I geni che codificano per entrambi questi componenti sono stati individuati nel cluster genico della nisina *nisR* e *nisK*) (Engelke *et al.*, 1994).

Come mostrato in Figura 14, in risposta al segnale esterno portato dalla nisina matura, che funge da peptide autoinduttore, la chinasi NisK porta alla fosforilazione un residuo di istidina nel dominio C-terminale della proteina. Il gruppo fosfato viene poi trasferito su un residuo di acido aspartico del corrispondente NisR intracellulare, che generalmente è un attivatore trascrizionale, che si lega e attiva i promotori NisA e NisF all'interno del cluster genico della nisina.



**Figura 14:** Cluster genico della nisina. La funzione dei prodotti genici è la seguente: *nisA/Z*, peptide precursore della nisina; *nisB* e *nisC*, modifiche post-traduzionale; *nisT*, traslocazione; *nisP*, proteasi; *nisR* e *nisK*, regolazione della biosintesi della nisina; *nisl* e *nisFEG*, immunità. I promotori regolati sono indicati da P\* e i promotori costitutivi da P. IR indica una sequenza ripetuta invertita (Cheigh e Pyun, 2005).

La nisina si è dimostrata capace di indurre l'autolisi (Figura 15) in cellule stafilococche suscettibili (Ouweland e Vesterlund, 2004). La sensibilità alla nisina sia da parte delle cellule vegetative che delle spore, può variare tra generi e anche tra ceppi della stessa specie (Delves-Broughton *et al.*, 1996). I ceppi produttori di batteriocine presentano sistemi di difesa dall'attività antimicrobica delle loro stesse batteriocine. Tuttavia, anche i ceppi bersaglio possono sviluppare resistenze alle batteriocine.



**Figura 15:** Rappresentazione schematica della biosintesi e regolazione della nisina in *Lactococcus lactis*. Il precursore della nisina (codificato da *nisA/Z*) è sintetizzato a livello ribosomiale, modificato (NisB e NisC) e traslocato (NisT), fino a formare la molecola matura. La nisina matura extracellulare agisce sia come peptide antimicrobico, sia da feromone attivando la sua stessa biosintesi tramite un sistema a due componenti composto da NisK e NisR. La cellula produttrice è protetta dall'attività della nisina grazie all'immunità conferita da NisI e NisFEG (Cheigh e Pyun, 2005).

Klaenhammer ha definito tre categorie di resistenza alla nisina:

- I. **Immunità:** caratteristica espressa in concomitanza con la produzione del peptide antimicrobico, associata ai geni *nisI* e *nisFEG*, che rendono il batterio produttore immune.
- II. **Resistenza geneticamente non legata alla sintesi:** produce resistenza nei ceppi non produttori attraverso nisiasi o enzimi disattivatori della nisina (*B. cereus* si è dimostrato ceppo in grado di disattivare nisina).
- III. **Mutazione "nisina-resistenza":** può essere acquisita in presenza di concentrazioni sub-letali di nisina.

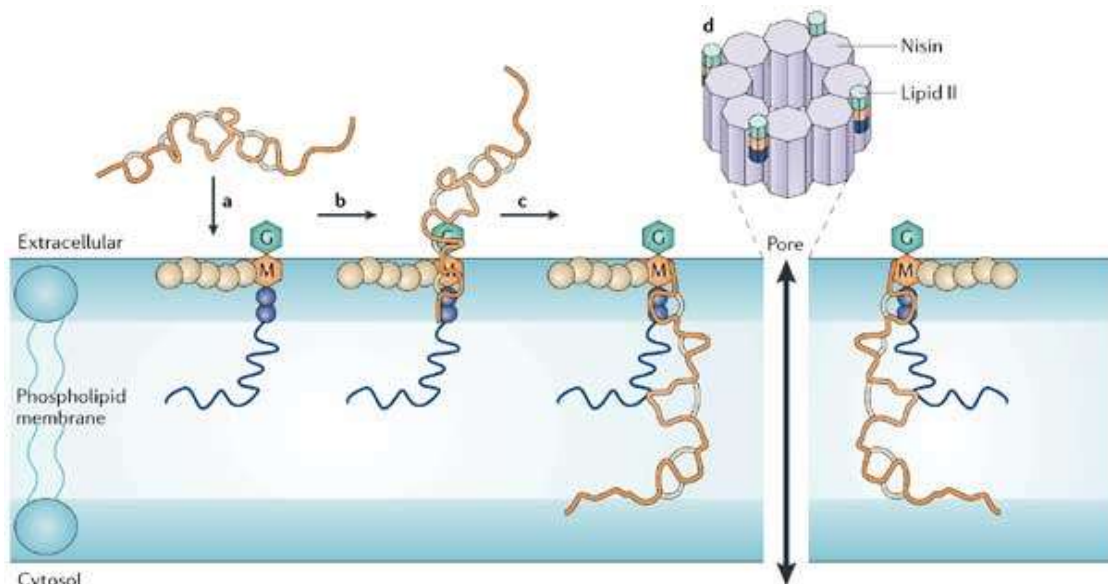
Secondo Abee (1959), la resistenza di alcuni microrganismi alla nisina sarebbe correlata alla variazione della composizione in acidi grassi della membrana cellulare. In particolare, riducendo la concentrazione di fosfolipidi e ostacolando così la formazione di pori. D'altra parte, Ming (1995), ha dimostrato come ceppi mutati di alcuni microrganismi (*L. monocytogenes*) risultati resistenti alla nisina, contenessero quantità inferiori di fosfolipidi nella membrana citoplasmatica. Infatti, si ipotizza che il bersaglio principale della nisina siano proprio i fosfolipidi di membrana. La produzione di nisina è un meccanismo di resistenza, messo in atto da alcuni batteri Gram-positivi, in grado di inattivare la nisina.

Uno svantaggio di aggiungere direttamente nisina da sola negli alimenti è il potenziale rischio di sviluppare resistenza o di creare condizioni favorevoli allo sviluppo di batteri Gram-negativi mediante l'eliminazione della microflora Gram-positiva indigena (Stiles, 1996). La produzione di nisina è influenzata da diversi fattori colturali, inclusi il ceppo produttore, la composizione naturale del mezzo, il pH, la temperatura, l'agitazione, l'aerazione e da altri fattori come l'inibizione esercitata sul substrato o sull'alimento, l'adsorbimento della nisina da parte delle cellule produttrici e la degradazione enzimatica (Parente e Ricciardi, 1999).

### **2.3.1 Meccanismo d'azione della nisina**

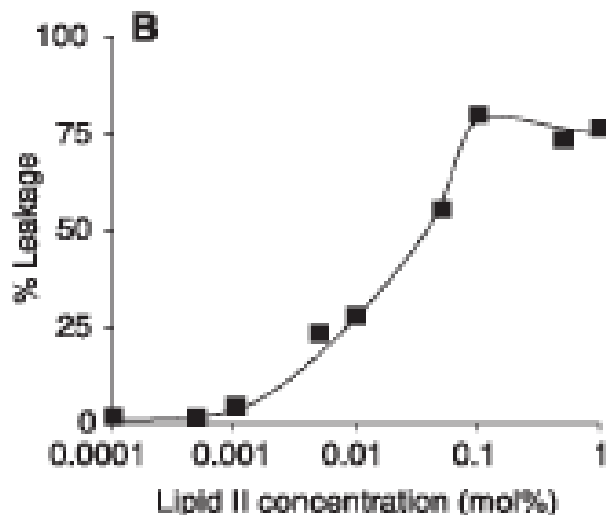
La modalità con cui tale batteriocina agisce nei confronti dei microrganismi precedentemente elencati, è basata su una doppia azione la quale comprende l'interferenza con la sintesi della parete cellulare e la stimolazione della formazione di pori nella membrana cellulare. Infatti, tale batteriocina agisce sui liposomi e presenta un'azione recettore-indipendente (Sahl, 1991), a differenza di alcune batteriocine della classe 2 che richiedono un recettore specifico per l'adsorbimento (Moll *et al.*, 1996). Le conseguenti variazioni di permeabilità, con fuoriuscita di composti essenziali (ioni  $K^+$ , amminoacidi e ATP) attraverso i pori, sono responsabili della morte cellulare (Breukink *et al.*, 1999).

Per quanto riguarda le spore, alcuni studi hanno dimostrato che queste sono più sensibili alla nisina rispetto alle cellule vegetative, ma l'antagonismo è sporostatico e non sporicida, e per questo si richiede la continua presenza di nisina per inibire le spore. I danni che tali spore possono subire e dovuti al calore, ne aumentano la sensibilità alla nisina. Il meccanismo mediante il quale la nisina inibisce l'accrescimento delle spore non è chiaro, anche se è stato dimostrato che l'azione sporostatica della nisina è causata dal suo legame con i gruppi sulfidrilici di residui proteici della spora (Morris *et al.*, 1984). Il meccanismo primario di attacco della nisina (Figura 16) è rappresentato dalla permeabilizzazione.



**Figura 16:** Attacco da parte della nisina alla doppia membrana fosfolipidica della cellula batterica (Breukink *et al.*, 2006).

della membrana cellulare, che se presente ad elevate concentrazioni può portare anche ad inibizione della sintesi della parete cellulare. L'interazione iniziale tra la batteriocina e la cellula è mediata dall'attrazione di carica tra il peptide cationico e la superficie della cellula carica negativamente, perciò andando a diminuire l'intensità di carica si avrà una diminuzione della stessa attività antimicrobica (Figura 17).



**Figura 17:** Attività della nisina in funzione della presenza di "Lipid II" all'interno della membrana cellulare, questa viene misurata attraverso la valutazione della fuoriuscita (leakage) di metaboliti dalla cellula batterica (Breukink et al., 2006).

La carica positiva della nisina è data dal segmento C-terminale, questo risulta attratto dalla carica negativa della membrana fosfolipidica, in seguito ad un legame specifico tra l'estremità N-terminale ed il recettore posto sulla superficie della cellula (lipid II), si ha così la formazione di vari cerchi grazie ai legami fatti dalla lantionina che formano una spirale.

La mancata azione nei confronti delle cellule umane è dovuto al fatto che la parete di queste è costituita da fosfatidilcolina e sfingomieline che determinano una carica positiva sulla superficie mentre quella dei batteri essendo formata da acidi teicoici, lipopolisaccaridi e fosfolipidi ha carica superficiale negativa. Questa differenza di carica perciò risulta necessaria per il meccanismo d'azione non mediato da un recettore sulla parete ma dalla interazione ionica (Moll, 1999).

### 2.3.2 Utilizzo della nisina in campo alimentare

L'uso di antibiotici nel settore alimentare è vietato, quindi, l'utilizzo di antimicrobici, come sistema alternativo per contrastare le contaminazioni microbiche in un alimento, è una buona alternativa.



La nisina è l'unica batteriocina approvata per utilizzi nel settore alimentare, infatti è considerata sicura da FAO (Food and Agriculture Organization) ed OMS (World Health Organization) dal 1969. Tale batteriocina è stata, inoltre, introdotta come bio-conservante nell'elenco degli additivi alimentari europei, ed è identificata con il numero E234 (CEE, 1983). L'autorizzazione all'uso di questa batteriocina ha molti motivi:

1. Il peptide si degrada facilmente grazie alla tripsina e alla pancreatina
2. Non presenta alcun rischio per la salute umana
3. Non altera le proprietà organolettiche e sensoriali degli alimenti

La legislazione relativa alla quantità massima di nisina da utilizzare differisce da un paese ad un altro: per esempio, la nisina può essere aggiunta al formaggio senza alcun limite nel Regno Unito, in Australia e in Francia mentre non deve superare le 100 UI/g in Belgio, le 500 UI/g in Argentina e le 10.000 UI/g negli Stati Uniti (Cleveland *et al.*, 2001). Ulteriori dati relativi ai livelli massimi di nisina autorizzati sono riportati in (Tabella 6).

La nisina poiché impiegata in concentrazioni superiori a quelle trovate naturalmente in alimenti fermentati, con ceppi produttori di nisina, non può essere considerata come conservante "naturale", per tale motivo la sua aggiunta in un alimento deve essere riportata in etichetta.

**Tabella 6:** impiego di nisina a livello mondiale e su diverse matrici alimentari

STATO	Alimenti in cui è permessa l'aggiunta di <u>nisina</u>	LIVELLI MASSIMI (IU/g)
Argentina	Formaggi processati	500
Australia	Formaggio, Formaggi processati, Pomodori in scatola	Nessun limite
Belgio	Formaggio	100
UE	E234, etichettato come "conservante naturale"	Può variare in funzione del prodotto e dello stato membro
Francia	Formaggio processato	Nessun limite
Italia	Formaggio	500
Olanda	Formaggi industriali, formaggio fuso, formaggio in polvere	800
Russia	Formaggi dietetici, verdure in scatola	8.000
UK	Formaggio, cibo in scatola, panna rappresa	Nessun limite
USA	Creme di formaggio pastorizzate	10.000

I prodotti alimentari possono essere integrati con preparati di batteriocine (nisina, pediocina) ottenuti dalla coltivazione del ceppo produttore in un fermentatore industriale, seguito da un adeguato recupero (Simha *et al.*, 2012). Sono comunemente usati tre approcci nell'applicazione di batteriocine (nisina e pediocina) per la bio-conservazione degli alimenti (Schillinger *et al.*, 1996):

- Aggiunta di nisina purificata o semi-purificata come conservante alimentare.
- L'uso di un prodotto precedentemente fermentato con un ceppo produttore di nisina, come ingrediente di trasformazione alimentare.
- Semina dell'alimento con LAB produttori di nisina. La capacità dei LAB di crescere e produrre nisina nei prodotti è fondamentale per il buon funzionamento.

Per quanto riguarda la nisina, Yang e Ray (1994) hanno trovato che nella crescita media dei microrganismi che producono tale batteriocina, i fattori chiave erano il mantenimento del pH ottimale e la supplementazione del mezzo con nutrienti specifici per ogni ceppo o specie. Hirsch *et al.* (1951) hanno esaminato per primi il potenziale della nisina come conservante alimentare mentre nel 1957 Aplin e Berrett svilupparono preparazioni commerciali per uso negli alimenti (Delves-Broughton, 1996).

Per vedere se una batteriocina è idonea all'utilizzo come additivo alimentare si deve valutare la sua resistenza al calore, infatti nel settore alimentare vengono effettuati numerosi processi termici sugli alimenti.

Modi et al., (2000) hanno valutato la resistenza alla nisina da parte di *L. monocytogenes* e si sono chiesti se la resistenza spontanea alla nisina porta ad una maggiore resistenza al calore rispetto a ceppi selvatici. In assenza di nisina, non vi era alcuna differenza significativa nella resistenza al calore. Quando invece cellule di *L. monocytogenes* resistenti alla nisina sono state coltivate in presenza di nisina a 55 °C le cellule sono diventate più sensibili al calore. Si è quindi visto che, quando le cellule resistenti alla nisina sono state sottoposte ad un trattamento combinato di nisina e calore, c'era un effetto sinergico di inattivazione. Dopo l'esposizione al calore, cellule nisina-resistenti divennero nuovamente sensibili agli effetti della nisina.

La nisina è usata principalmente nei prodotti derivati dal latte, quali: formaggi, formaggi fusi, ricotta, yogurt, ma anche per la preparazione di creme, dessert preparati con del latte. È infine impiegata nei succhi di frutta, ketchup e maionese. La nisina, in particolare, espleta la propria azione antimicrobica a pH acidi ed elevate concentrazioni saline, mentre viene inattivata già in condizioni di leggera basicità<sup>14</sup>.

Sulla base dei microrganismi target, le aree di utilizzo della nisina possono essere classificate in tre categorie:

1. la prevenzione alla contaminazione da LAB,
2. l'inibizione dei batteri Gram-positivi patogeni quali *Listeria monocytogenes*,
3. la prevenzione della contaminazione da spore formate da batteri Gram-positivi come *Clostridium botulinum*.

La nisina deve essere aggiunta come soluzione acquosa e mescolata con l'alimento durante la sua produzione. Quando la nisina è aggiunta in polvere, si deve assicurare la sua distribuzione nell'alimento; in alternativa la nisina può essere utilizzata per decontaminare le superfici alimentari mediante spruzzatura. Durante la produzione in più stadi di un alimento

la nisina deve essere aggiunta durante la fase finale per permetterle di mantenere la sua piena attività.

Quando si utilizza la nisina, bisogna però fare attenzione alla presenza di alcuni composti chimici che possono alterare la sua attività biologica. Infatti, è stato dimostrato che il biossido di titanio e il sodiometa-bisolfato degradano la nisina e inibiscono la sua attività per l'ossidazione dei ponti di solfuro. Inoltre, l'attività antibatterica della nisina è più potente in mezzo liquido che in terreno solido (Delves-Broughton, 2005).

<sup>14</sup>Cfr:<https://ilsalvagente.it/2017/12/13/lefsa-autorizza-luso-di-nisina-nel-formaggio-stagionato/>

## CAPITOLO 3

### Obiettivi

I succhi vegetali sono attualmente bevande molto popolari consumate da persone di ogni età per le loro qualità nutrizionali e sensoriali. Infatti, sono percepiti dai consumatori come alimenti “salutari” per via del loro basso contenuto di sodio, colesterolo, grassi e in quanto ricchi in vitamina C, polifenoli e flavonoidi che contribuiscono alle buone proprietà antiossidanti di questi prodotti (Kumar *et al.*, 2009; Patrignani *et al.*, 2009). Secondo recenti report, la domanda dei consumatori per bevande vegetali è triplicata dal 2011 al 2013, passando da 36 milioni di litri a 92 milioni di litri. Il tasso di crescita annuale dei prodotti non lattiero caseari è pari a circa il 15.5%, una percentuale, che tradotta in termini economici, dovrebbe raggiungere circa 20 miliardi di dollari statunitensi nel 2020 (Naziri *et al.*, 2017).

Tra le bevande vegetali il latte di soia e i prodotti a base di soia sono sicuramente quelli più richiesti e diffusi tra i consumatori occidentali (Terhaag *et al.*, 2013). Il latte di soia è un alimento facilmente digeribile, e generalmente caratterizzato da un elevato contenuto proteico, un rapporto moderato di  $\beta$ -conglucina (7 S) e glicina (11 S) nonché da un elevato contenuto zuccherino (Kaneko *et al.*, 2011).

Nonostante la sempre maggior diffusione di latti vegetali, in particolare quello di soia, la loro stabilizzazione, sicurezza e shelf-life rappresentano una sfida tecnologica non completamente risolta. Infatti, la composizione del latte di soia che contiene proteine (3.0-3.6%), zuccheri (2.9-3.5%), grassi (2.0-2.5%) e valori di pH attorno a 7.0 può consentire lo sviluppo di un'ampia gamma di microrganismi sia patogeni che degradativi (Garro e Savoy, 2012). Pertanto, allo stato attuale, la sicurezza e la stabilizzazione di questi prodotti vengono perseguite con trattamenti termici molto severi che determinano un deperimento, più o meno accentuato, delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali dei prodotti. Infatti, nonostante l'aumento dei consumi, lo sviluppo di prodotti che siano ampiamente accettati dai consumatori rimane una sfida (Callou *et al.*, 2010; Felberg *et al.*, 2009). L'aroma di latte di soia sterilizzato, spesso non mascherato dagli agenti aromatizzanti addizionati, è ancora il principale fattore di rifiuto da parte del consumatore (Potter *et al.*, 2007).

Tra le bevande a base vegetale anche il succo di carota ha incrementato i consumi in vari paesi negli ultimi anni (Schieber *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2012). Il succo di carota rappresenta infatti una delle più popolari bevande non alcoliche consumate in Germania e in altri paesi del nord Europa. Esso rappresenta una importante fonte naturale di antiossidanti come l' $\alpha$  e il  $\beta$ -carotene, precursori della vitamina A, e poliacetilene che presentano attività benefiche per la salute e antitumorali (Pferschy-Wenzig *et al.*, 2009; Sharma *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016). Tuttavia, il succo di carota non trattato termicamente presenta limitate potenzialità di mercato per via della breve shelf-life e del rapido decadimento qualitativo. Infatti, il prodotto non trattato dovrebbe essere consumato entro e non oltre i due giorni dalla produzione (Zhang *et al.*, 2016; Alkint *et al.*, 2004). Inoltre, bevande a base vegetale, per via del loro elevato pH possono favorire lo sviluppo di microrganismi sia degradativi che patogeni (Patrignani *et al.*, 2009). Infatti, recenti epidemie di malattie di origine alimentare sono state attribuite a succhi non pastorizzati contaminati da agenti patogeni come *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157: H7 e *Listeria monocytogenes* dimostrando come succhi non pastorizzati possono essere un veicolo per malattie di origine alimentare (Briñez *et al.*, 2006). La produzione di succo di carota per scopi commerciali necessita di una sterilizzazione termica, il blanching e l'abbassamento del pH in quanto il suo pH naturale è circa 6.0, che espone il prodotto ad un alto rischio di contaminazione e sviluppo microbico (Park *et al.*, 2002; Patrignani *et al.*, 2009). Tuttavia, il blanching in condizioni acide e i trattamenti termici a temperature comprese tra 105 e 121 °C inevitabilmente distruggono i nutrienti sensibili al calore, e portano ad un deperimento di parametri reologici e organolettici quali la consistenza, il colore e il sapore del prodotto (Kim *et al.*, 1988; Zhang *et al.*, 2016).

Inoltre, negli ultimi anni è aumentata la domanda da parte dei consumatori di alimenti con sapori e colori più naturali, con alta qualità nutrizionale e una shelf-life sufficiente per la loro distribuzione e consumo in mercati sempre più globalizzati e distanti dal luogo di produzione (Dede *et al.*, 2007). Questo ha generato, a livello industriale, un crescente interesse verso le tecnologie non termiche per la stabilizzazione microbiologica di succhi e bevande che comportino trascurabili effetti sulle caratteristiche organolettiche e nutrizionali della materia prima (Diels *et al.*, 2005). Le tecnologie non termiche proposte per la loro stabilizzazione includono trattamenti UV (Koutchma *et al.*, 2004), campi elettrici pulsati (Evrendilek *et al.*,

1999), alte pressioni idrostatiche (Houska *et al.*, 2006), alte pressioni di omogeneizzazione (HPH) (Pathanibul *et al.*, 2009; Patrignani *et al.*, 2013) e fermentazione lattica delle matrici vegetali di partenza (Karovicova e Kohajdova, 2003; Mauro *et al.*, 2016; Tamminen *et al.*, 2013).

Tra questi metodi alternativi, la fermentazione condotta da batteri lattici di prodotti vegetali, applicata come metodo di conservazione per la produzione di prodotti finiti e semilavorati, è considerata una tecnologia importante a causa della crescente quantità di materie prime utilizzate nell'industria alimentare. Le ragioni principali di questo interesse sono gli aspetti nutrizionali, fisiologici e igienici del processo e i relativi costi di utilizzo e produzione (Karovicova e Kohajdova, 2003). Dati di letteratura indicano come negli ultimi anni ci sia stato un incremento di succhi vegetali pre-fermentati prodotti principalmente da cavoli, barbabietole rosse, carote, sedano e pomodori (Karovicova e Kohajdova, 2003). Per la fermentazione dei succhi e bevande a base vegetale, della massima importanza sono ceppi commerciali appartenenti delle specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus xilosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillum reuteri*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum* (Karovicova e Kohajdova, 2003; Mauro *et al.*, 2016; Kun *et al.*, 2008). Le proprietà organolettiche desiderabili dei succhi vegetali fermentati possono essere ottenute selezionando ceppi di batteri lattici adatti al processo fermentativo applicato ed ottimizzato in rapporto alle singole materie prime. I criteri utilizzati per valutare l'idoneità di un ceppo sono i seguenti: cinetica e produzione totale di acidi, variazione del pH, perdita di sostanze ad elevato valore nutrizionale, diminuzione della concentrazione di nitrati e produzione di ammine biogeniche (Karovicova e Kohajdova, 2003), capacità della coltura microbica di sviluppare sul substrato, il tipo di metabolismo e l'influenza sulle proprietà sensoriali del prodotto fermentato (Holzapfel, 2002). Negli ultimi anni interessanti risultati sono stati ottenuti con l'impiego di colture starter costituite da batteri lattici produttori di batteriocine che hanno permesso di ottenere fermentazioni vegetali più controllate e riproducibili (Omar *et al.*, 2006). In particolare, ceppi appartenenti alla specie *Lactococcus lactis* produttori di nisina sono stati proposti come promettenti biopreservanti in diversi alimenti quali prodotti lattiero-caseari, carni e frutta e verdura di IV gamma (Ho *et al.*, 2018; Siroli *et al.*, 2016). La nisina è stata la prima batteriocina caratterizzata ed il cui utilizzo è regolato e consentito come conservante alimentare nell'Unione Europea in specifiche

categorie di prodotti alimentari (Jones *et al.*, 2005; Siroli *et al.*, 2016). Infatti, la nisina, e in particolare la variante naturale Z, ha un'elevata solubilità e stabilità in diversi sistemi alimentari e un ampio spettro antimicrobico, essendo efficace in particolare contro i batteri Gram-positivi, tra cui *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp. e *Staphylococcus aureus*, sia in condizioni di laboratorio che in alimenti (Gharsallaoui *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2012) inclusi succhi e bevande a base vegetale (Settanni e Corsetti, 2008; Zhao *et al.*, 2013).

In questo contesto, l'obiettivo della mia tesi è stato quello di valutare le potenzialità di 3 ceppi appartenenti alla specie *Lactococcus lactis* e produttori di nisina (LBG2, FBG1P e 3LC39), isolati da prodotti lattiero caseari, per il miglioramento della shelf-life e della sicurezza di latte di soia e succo di carota. Più specificatamente sono stati considerati sia ceppi produttori della variante A (FBG1P e 3LC39) che Z (LBG2) della nisina. A tale scopo, i ceppi sono stati inoculati nelle matrici alimentari considerate ad un livello di circa 6.0 log ufc/mL e successivamente sono state valutate le cinetiche di crescita e di acidificazione a 20 °C. È stato valutato l'effetto di questi ceppi sul profilo in molecole volatili di latte di soia e succo di carota fermentato. Inoltre, sono state valutate le cinetiche di produzione di nisina nel tempo e l'effetto antimicrobico nei confronti di un patogeno alimentare frequentemente associato a questa tipologia di prodotti quale *Listeria monocytogenes* quando deliberatamente inoculato.



# CAPITOLO 4

## Materiali e metodi

### 4. Ceppi utilizzati

In questa sperimentazione sono stati utilizzati 3 ceppi (elencati in tabella 7), appartenenti al genere *Lactococcus* specie *lactis* di diverse sub-specie. I ceppi impiegati in questa sperimentazione appartengono in parte al Dipartimento di Biologia Sperimentale sezione di Igiene dell'Università di Cagliari (3LC39), e in parte appartengono al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna (FBG1P e LBG2).

**Tabella 7:** Ceppi impiegati nella sperimentazione e tipologia di nisina prodotta.

Ceppo	Specie	Tipo di nisina
3LC39	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	A
FBG1P	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis/cremoris</i>	A
LBG2	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis/cremoris</i>	Z

Nelle prove per valutare la produzione di batteriocine sono stati impiegati i ceppi nisina sensibili *Listeria monocytogenes* SCOTT A e *Lactobacillus plantarum* V7B3 entrambi appartenenti al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) dell'Università di Bologna. I ceppi di *Lactococcus lactis* impiegati sono stati stoccati in eppendorf con glicerolo al 25% (v/v) e conservati ad una temperatura di -40 °C per mantenerli vitali per tutto il periodo della sperimentazione. Tutti i ceppi sono stati pre-coltivati inoculando sterilmente 500µl della coltura stoccata a -40 °C in 9 mL di brodo di coltura specifico per i lattococchi M-17 (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) e fatti crescere a 30 °C per 24 ore e ripresi almeno due volte nel medesimo brodo di coltura prima del loro inoculo.

I ceppi *Listeria monocytogenes* SCOTT A e *Lactobacillus plantarum* V7B3 sono stati ripresi da congelato e fatti crescere rispettivamente su brodo di coltura Brain Heart Infision (BHI) (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) e De Man, Rogose, and Sharpe (MRS) (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) e Pre-coltivati per 24 ore a 37 °C. Anche questi prima di essere utilizzati sono stati ripresi almeno due volte su brodo di coltura BHI e MRS rispettivamente per *Listeria* e *Lb. plantarum*.

#### 4.1 Prove di fermentazione in bevanda vegetale di soia

Per le prove di fermentazione di latte di soia, i 3 ceppi di *Lactococcus lactis* sono stati pre-coltivati come riportato precedentemente nel capitolo 3. Per la realizzazione di queste prove abbiamo utilizzato un latte di soia commerciale che aveva un pH iniziale di circa 6,8 e la cui composizione è riportata in figura 18.



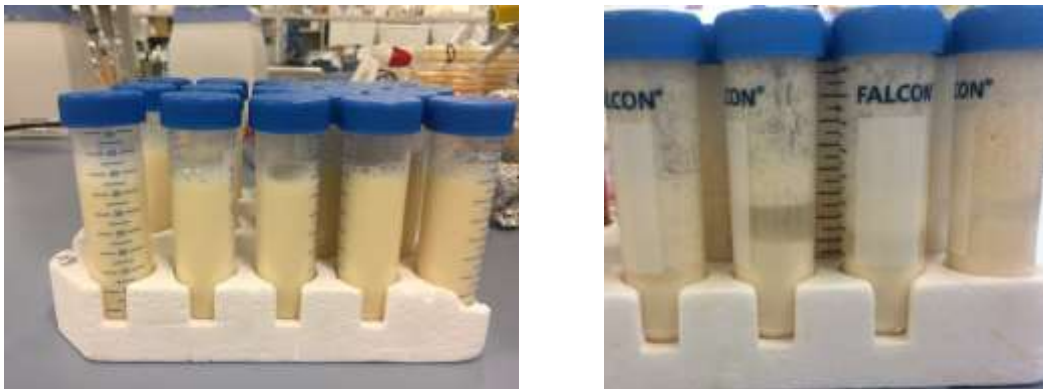
**INGREDIENTI:** acqua, semi di soia decorticati (5,9%), zucchero, fosfato tricalcico, correttore di acidità (fosfato monopotassico), sale marino, aroma, stabilizzante (gomma di gellano), vitamine (riboflavina (B2), B12, D2).  
Senza derivati di latte, glutine e frumento.

**Figura 18:** Bevanda vegetale di soia utilizzato nella sperimentazione e relativo elenco degli ingredienti presenti.

Successivamente falcon sterili da 50 mL sono stati riempiti con 40 mL di latte di soia e poi inoculati con i ceppi di lattococchi 3LC39, FBG1P E FBG2 ad un livello compreso tra 5.5 e 5.7

log ufc/mL. Nello specifico 3 falcon per ognuno dei ceppi considerati sono stati preparati (Figura 19). I campioni inoculati sono poi stati messi ad incubare in termostato a 20 °C. In tutti i campioni si è proceduto con l'effettuare la conta microbica per valutare l'andamento della crescita dei lattococchi immediatamente dopo l'inoculo e dopo 7, 24, 48, 72 e 144 ore di incubazione a 20 °C. La determinazione del carico cellulare dei lattococchi è stata eseguita dopo opportuna diluizione del campione in soluzione fisiologica sterile, e successivo inoculo su piastre agarizzate di terreno di coltura M17 (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito).

Sono state inoltre valutate le cinetiche di acidificazione dei vari ceppi di *Lactococcus lactis* attraverso misurazione del pH con pH-metro (pH Meter Basic 20, Crison) immediatamente dopo l'inoculo e dopo 5, 24, 31, 48, 72 e 144 ore di incubazione a 20 °C.

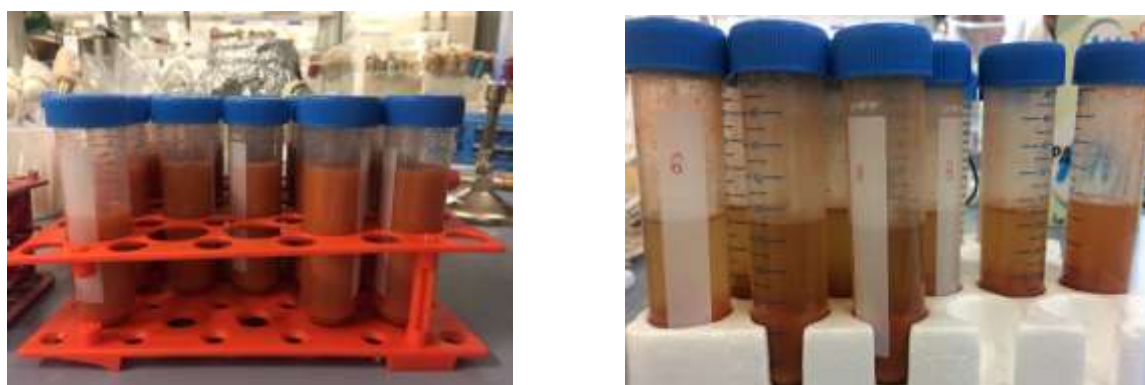


**Figura 19:** Bevanda vegetale di soia appena inoculato con i lattococchi (sinistra) e dopo 144 ore (destra) di conservazione a 20 °C.

Dopo 24, 48, 72 e 144 ore di conservazione sono stati raccolti i campioni per le prove di quantificazione della nisina le cui procedure e metodiche sono riportate nei paragrafi successivi.

## 4.2 Prove di fermentazione in estratto di carota

Anche per le prove di fermentazione di estratto di carota, i 3 ceppi di *Lactococcus lactis* sono stati ripresi da congelato e pre-coltivati come riportato precedentemente; in questo caso sono stati acquistati 2 Kg di carote presso un rivenditore locale lo stesso giorno della prova. Successivamente le carote sono state sanizzate con lavaggio in acqua contenente 100 ppm di ipoclorito di sodio per 2 minuti dopo di che le carote sono state asciugate e tagliate. Il succo di carota è stato ottenuto utilizzando un estrattore domestico (Russel Hobbs) e raccolto all'interno di bottiglie da 750 mL precedentemente sterilizzate in autoclave. Il succo di carota è stato poi pastorizzato ad una temperatura di 72 °C per 15 minuti. Successivamente sono stati preparati tre falcon sterili da 50 mL contenenti 40 mL di succo di carota per ogni ceppo di *Lactococcus lactis* da utilizzare nella sperimentazione. Questi falcon sono poi stati inoculati con i ceppi di lattococchi corrispondenti ad un livello compreso tra 5.5 e 5.7 log ufc/mL (Figura 20). I campioni inoculati sono poi stati messi ad incubare in termostato a 20 °C. In tutti i campioni si è proceduto con l'effettuare la determinazione della carica microbica per valutare l'andamento della crescita dei lattococchi immediatamente dopo l'inoculo e dopo 7, 24, 48, 72 e 144 ore di incubazione a 20 °C.



**Figura 20:** Estratto di carota appena inoculato (sinistra) e dopo 144 ore (destra) dall'inoculo dei lattococchi.

La determinazione del carico cellulare dei lattococchi è stata eseguita dopo opportuna diluizione del campione in soluzione fisiologica sterile, e successivo inoculo su piastre

agarizzate di terreno di coltura M17 (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito). Sono state inoltre valutate le cinetiche di acidificazione dei vari ceppi di *Lactococcus lactis* attraverso misurazione del pH con pH-metro (pH Meter Basic 20, Crison) immediatamente dopo l'inoculo e dopo 5, 24, 31, 48, 72 e 144 ore di incubazione a 20 °C.

Dopo 24, 48, 72 e 144 ore di conservazione sono stati raccolti i campioni per le prove di quantificazione della nisina le cui procedure e metodiche sono riportate nei paragrafi successivi.

### **4.3 Quantificazione della nisina presente nei campioni**

La procedura per l'estrazione e la successiva quantificazione della nisina prodotta dai lattococchi nelle diverse matrici alimentari prese in considerazione in questa sperimentazione, è stata ottimizzata con lo scopo di massimizzare l'estrazione della nisina dalla matrice alimentare. In particolare, i metodi riportati da de Oliveira Junior *et al.* (2015), Pongtharangkul e Demirci (2004) sono stati utilizzati e migliorati sulla base delle caratteristiche delle matrici da noi considerate.

Per tutte le matrici alimentari considerate (latte di soia e succo di carota) le prove di quantificazione della nisina sono state eseguite dopo 24, 48, 72 e 144 ore di stoccaggio a 20 °C del prodotto inoculato con i lattococchi. Nella prima fase sono stati raccolti i surnatanti cellulari procedendo nel modo seguente:

- 10 mL di campione sono stati raccolti in falcon sterili da 15 mL.
- Indipendentemente dal pH del campione, questo è stato aggiustato sino al valore di 3.0 tramite HCl 4 N.
- I campioni acidificati a pH 3.0 sono stati poi centrifugati utilizzando una centrifuga ROTOFIX 32A (Hettich zentrifugen) a 6000 rpm per 20 minuti a temperatura ambiente.

- I surnatanti cellulari sono stati poi raccolti con pipette sterili (circa 4-5 mL) filtrati con filtri da 0.45 µm e trasferiti in nuovi falcon sterili da 15 mL.
- Al fine di eliminare ogni possibile forma di cellule vegetative sono stati poi bolliti a 100 °C per 10 min.
- Infine, i surnatanti filtrati, bolliti e raffreddati sono stati stoccati in congelamento a -20 °C sino al momento della prova di quantificazione della nisina presente.

Le prove di quantificazione della nisina prodotta dai ceppi di *Lactococcus lactis* nelle diverse matrici alimentari si sono svolte nel modo seguente:

- MRS soft agar (ovvero preparato con lo 0.8% di agar) è stato inoculato con il ceppo indicatore nisina sensibile *Lactobacillus plantarum* V7B3 ad un carico di circa 7 log ufc/mL partendo da una coltura overnight del ceppo.
- Il terreno di coltura MRS soft agar inoculato con il ceppo indicatore è stato poi versato in piastre petri nel volume di 20 mL tramite pipette sterili e lasciato asciugare sotto cappa a flusso laminare per 30 min.
- Nelle piastre asciugate sono stati poi scavati pozzetti con un carotatore, questi sono stati poi riempiti con 50 µl dei surnatanti cellulari precedentemente preparati e congelati da testare per la quantità di nisina presente (Figura 21).
- Le piastre sono poi state incubate alla temperatura ottimale del ceppo indicatore ovvero 37 °C per 24 ore e trascorso questo tempo sono stati osservati e misurati gli aloni di inibizione.



**Figura 21:** Preparazione delle piastre con MRS soft agar inoculato con il ceppo indicatore *Lactobacillus plantarum* sensibile a nisina.

- Parallelamente alla prova con i surnatanti cellulari raccolti dalle diverse matrici alimentari considerate (latte di soia e succo di carota) inoculate con i ceppi di lattococchi da testare dopo 24, 48, 72 e 144 h di conservazione a 20 °C; sono state costruite delle rette di taratura al fine di quantificare la nisina prodotta sulla base dell'alone di inibizione osservato (Figura 22).



**Figura 22:** Esempi di aloni di inibizione.

Per la costruzione delle rette di taratura si è proceduto nel modo seguente:

- Nisina al 2.5% (Sigma-Aldrich) è stata introdotta nelle matrici alimentari considerate a diverse concentrazioni (1000, 500, 400, 300, 200, 100, 50 e 0 UI/mL), sono stati ripetuti i processi precedentemente descritti di raccolta dei surnatanti cellulari e l'agar-spot test con ceppo indicatore sensibile a nisina e osservazione degli aloni di inibizione (Figura 23 e 24). In questo modo è stato possibile costruire una retta di taratura considerando anche la quantità di nisina trattenuta dal sistema alimentare considerato e verificando eventuali effetti di attività antimicrobica additiva e ascrivibile al sistema alimentare.
- Oltre alla costruzione della retta di taratura di nisina standard ottenuta inoculando nisina nel sistema alimentare testato, sono state costruite anche curve di taratura di nisina preparata attraverso la diluizione della soluzione stock di nisina in HCl 0.02M. In particolare, sono state preparate soluzioni di nisina a diversa concentrazione (2000; 1000; 500; 250; 100; 50 e 0 UI/mL) e utilizzate direttamente nell'agar-spot test sopra descritto. Sono state poi costruite le curve di taratura sulla base della quantità di nisina ed il relativo alone di inibizione osservato.



**Figura 23:** Esempi di aloni di inibizione ottenuti inoculando diverse concentrazioni standard di nisina in bevanda vegetale di soia.





**Figura 24:** Esempi di aloni di inibizione ottenuti inoculando diverse concentrazioni standard di nisina in succo di carota.

Infine, gli aloni di inibizione osservati per i vari campioni sono stati confrontati con le rette di taratura di nisina standard, costruite come descritto precedentemente, sia costruite con il sistema alimentare considerato che in HCl ed è stato così possibile estrapolare le quantità di nisina prodotta dai lattococchi nelle diverse matrici alimentari ed espresse sia come UI/mL che come mg/L.

#### **4.4 Analisi del profilo aromatico mediante GC/MS SPME.**

I profili aromatici dei campioni sono stati analizzati attraverso l'impiego della tecnica di microestrazione in fase solida combinate con gascromatografia e spettrometria di massa (GC-MS/SPME). I campioni sia di latte di soia che di estratto di carota inoculati con i diversi ceppi sono stati raccolti immediatamente dopo l'inoculo e dopo 24, 48, 72 e 144 ore di stoccaggio a 20 °C. Per l'analisi si è proceduto nel modo seguente: 5 mL di campione sono stati posti in vials, del volume di 10 mL, sigillati con setti di politetrafluoroetilene/silicone,

parafilm e chiusi con ghiera metalliche. In ogni vials sono stati aggiunti 10µl di standard interno 4-metil-2pentanolo.

Prima dell'analisi i campioni sono stati condizionati a 45 °C per 10 minuti al fine di accelerare il raggiungimento dell'equilibrio liquido-vapore. In seguito, è stata inserita nello spazio di testa una fibra di silice fusa ricoperta da una fase fissa mista di Carboxen-polidimetilsilossano (CAR/PDMS, 75 µm, SUPELCO, Bellafonte, PA, Stati Uniti d'America) idonea per la pre-concentrazione sia delle molecole polari che di quelle apolari. La fibra è stata lasciata assorbire per 30 minuti alla temperatura di 45 °C. Successivamente i composti sono stati desorbiti nel blocco di iniezione a 250 °C per 10 minuti in condizioni di splitless. Per la separazione dei composti volatili è stato usato un gascromatografo Agilent Technology 6890N, Network GC System abbinato ad uno spettrometro di massa MS 5970 MSD (Hewlett-Packard, Geneva, Switzerland). Per la separazione dei picchi è stata utilizzata una colonna capillare Chrompack CP-Wax 52 CB (50 m×320 µm×1.2 µm). Il programma di temperatura è stato il seguente: 50 °C per 1 minuto, seguito da un aumento a 65 °C con una velocità di incremento della temperatura di 1.5 °C/minuto; da 65- 43 220 °C con un incremento di 5 °C/min ed infine una permanenza di 25 minuti a 230 °C. Il gas di trasporto usato è stato l'elio con un flusso di 1.0 mL/min. La frammentazione a livello dello spettrometro di massa è avvenuta tramite impatto elettronico a 70 eV. I composti sono stati identificati confrontando gli spettri di massa con quelli di composti puri contenuti nelle librerie.

#### **4.5 Challenge test in presenza di *Listeria monocytogenes***

In questa fase è stata valutata l'attività antagonista dei ceppi di lattococchi 3LC39, LBG2 e FBG1P nei confronti di *Listeria monocytogenes* in sistema reale (latte di soia e estratto di carota).

Sia per le prove in latte di soia che in estratto di carota, il prodotto è stato preparato come riportato nei paragrafi 4.1 e 4.2. Per ogni lattococco considerato, sono stati preparati 3 falcon contenenti 40 mL di sia per latte di soia che per l'estratto di carota. Il prodotto è poi

stato inoculato con il lattococco previsto inoculato ad un livello di circa 5.5 log ufc/mL a partire da colture overnight dei ceppi. I prodotti addizionati dei lattococchi sono stati successivamente inoculati con *Listeria monocytogenes* ad un livello pari a 4.27 log ufc/mL. Campioni di latte di soia e estratto di carota inoculati con ogni singolo lattococco e con sola *Listeria* sono stati considerati come controlli. Tutti i campioni sono stati poi stoccati a 20 °C.

Nel tempo sono state monitorate le cinetiche di crescita dei lattococchi e di disattivazione di *Listeria* tramite campionamenti microbiologici eseguiti immediatamente dopo gli inoculi e dopo 7, 24, 48 e 72 ore di conservazione.

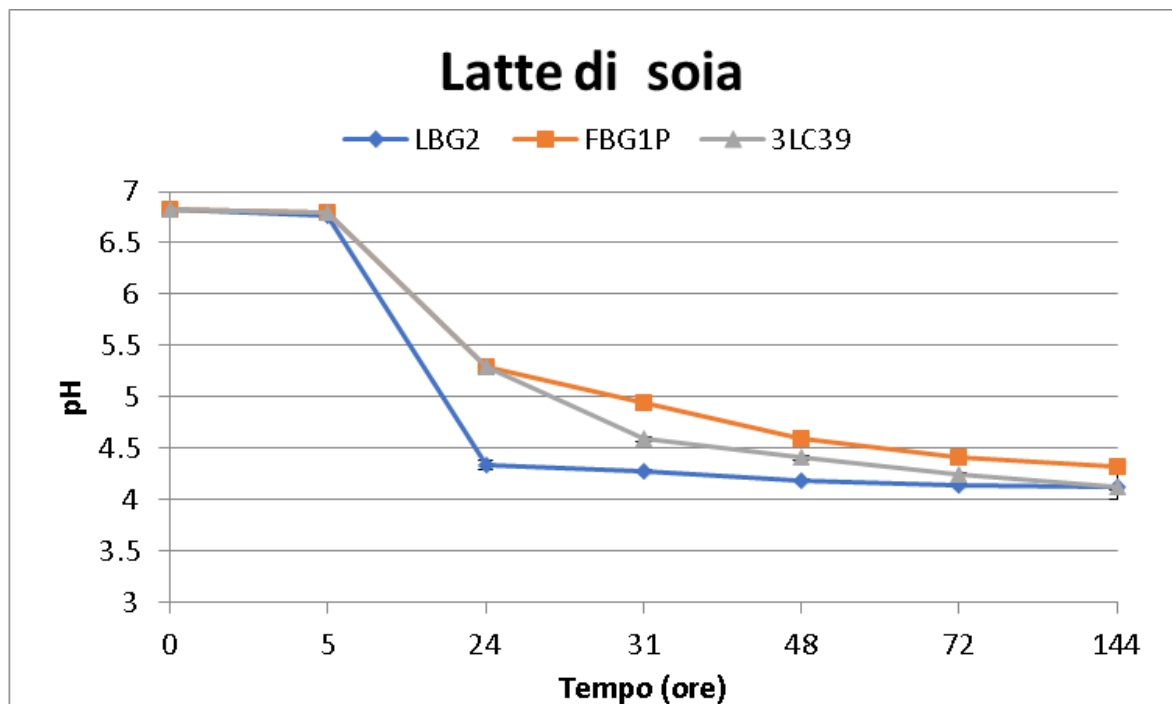
Per la ricerca di *Lactococcus lactis* è stato utilizzato il terreno di coltura specifico per lattococchi M17, mentre per la ricerca di *Listeria monocytogenes* è stato utilizzato il terreno selettivo Listeria Agar Base (LSO, Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) addizionato di supplemento selettivo per Listeria (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito).

## CAPITOLO 5

### Risultati

Nella mia tesi sono state valutate le potenzialità di tre lattococchi nisina produttori di essere impiegati come agenti fermentanti e di bio-controllo per la produzione di bevande vegetali fermentate. In particolare, sono stati testati tre ceppi di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (LBG2, FBG1P, 3LC39) su succo di carota e latte di soia. Per ognuno dei ceppi testati sono state valutate le cinetiche di acidificazione, il carico cellulare, la produzione di batteriocine, la produzione di molecole volatili e l'attività anti *Listeria* su entrambe le matrici alimentari conservate a 20 °C.

In Figura 25 sono riportate le cinetiche di acidificazione di latte di soia a 20 °C, espresse come diminuzione di pH nel tempo, da parte dei tre lattococchi considerati.



**Figura 25:** Cinetica di acidificazione del latte di soia espressa come diminuzione di pH nel tempo da parte dei ceppi di *L. lactis* LBG2, FBG1P e 3LC39.

Come evidenziato in Figura 25 il pH iniziale del latte di soia risultava 6.83. Le cinetiche di acidificazione dei tre lattococchi considerati hanno portato il pH dopo 144h a valori compresi tra 4.12 e 4.32. Tuttavia, le cinetiche sono risultate diverse sulla base del ceppo considerato. Infatti, dopo 5 ore nessuno dei tre ceppi aveva mostrato significativi abbassamenti di pH, mentre a partire dalle 24h il ceppo LBG2 ha portato ad un'acidificazione maggiore del latte di soia rispetto agli altri due ceppi considerati. Infatti, per questo ceppo dopo 24h il valore di pH risultava 4.34 e quindi del tutto simile al valore determinato al termine dello stoccaggio (144h). Gli altri due ceppi hanno invece mostrato una più lenta acidificazione; infatti il pH dopo 24h risultava 5.03 per entrambi i ceppi e solamente dopo 31h questi hanno determinato una diminuzione del pH al di sotto di 5.0. Il ceppo 3LC39 ha mostrato un maggiore decremento di pH rispetto al ceppo FBG1P a partire dalle 31h.

Le differenti cinetiche di acidificazione di latte di soia osservate per i tre ceppi sono state confermate dai carichi cellulari determinati durante lo stoccaggio a 20 °C (Tabella 8).

**Tabella 8:** Evoluzione del carico dei lattococchi (log ufc/mL) LBG2, FBG1P e 3LC39 in latte di soia nel tempo.

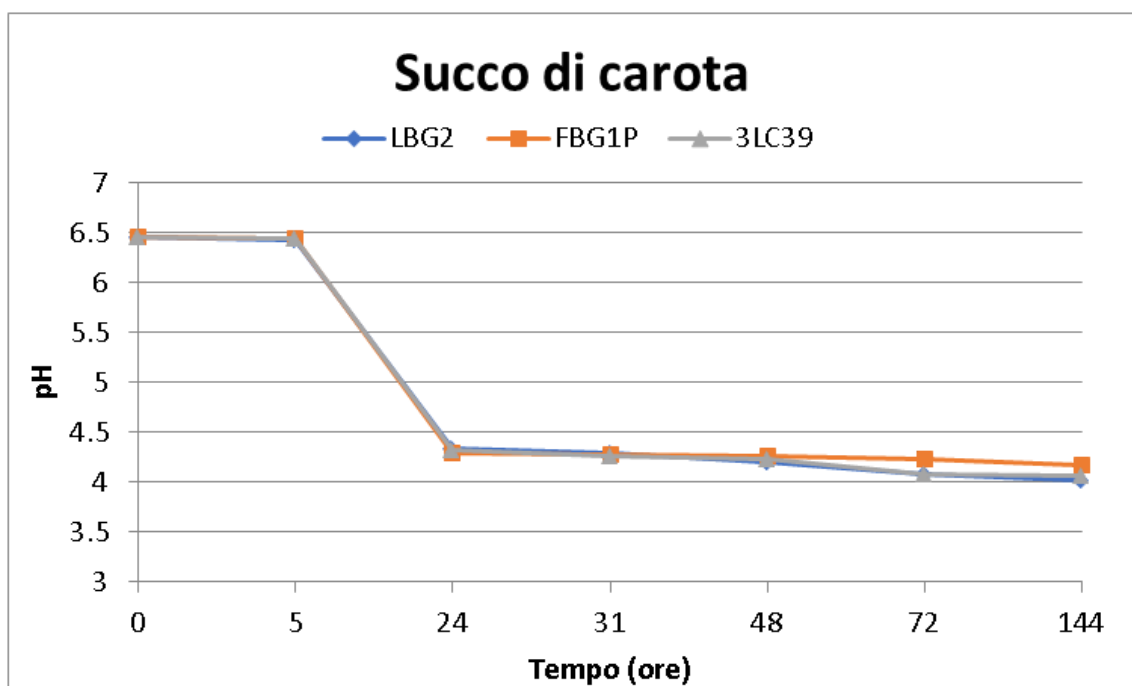
	lattococchi in soia log ufc/mL $\pm$ DS					
	0h	7h	24h	48h	72h	144h
LBG2	5.70 $\pm$ 0.11	7.66 $\pm$ 0.05	8.64 $\pm$ 0.13	8.60 $\pm$ 0.05	8.75 $\pm$ 0.09	8.73 $\pm$ 0.14
FBG1P	5.59 $\pm$ 0.09	7.15 $\pm$ 0.08	8.24 $\pm$ 0.07	8.48 $\pm$ 0.16	8.38 $\pm$ 0.13	8.46 $\pm$ 0.12
3LC39	5.63 $\pm$ 0.14	7.26 $\pm$ 0.12	8.95 $\pm$ 0.11	8.67 $\pm$ 0.06	8.71 $\pm$ 0.06	8.66 $\pm$ 0.15

Come evidenziato in Tabella 8 il ceppo LBG2 ha mostrato un più rapido incremento del carico cellulare rispetto agli altri due ceppi considerati. Per tutti i ceppi il carico iniziale risultava compreso tra 5.59 e 5.70 log ufc/mL, ma dopo 7h il campione LBG2 mostrava un carico cellulare superiore di circa 0.5 log ufc/mL rispetto agli altri due ceppi. Tutti i lattococchi hanno raggiunto la fase stazionaria di crescita dopo 24h di stoccaggio con carichi cellulari in tutti i casi superiori a 8 log ufc/mL.

Questi dati hanno messo in luce ottime potenzialità di tutti i ceppi testati, soprattutto del ceppo LBG2, infatti l'acidificazione è risultata, anche se con diverse cinetiche, estremamente rapida. Questi risultati vanno a confermare come le caratteristiche compositive del latte di

soia (elevati valori di pH, disponibilità di macro e micronutrienti) siano ottimali per lo sviluppo dei lattococchi (Beasley *et al.*, 2003). La più rapida cinetica di acidificazione osservata per il ceppo LBG2 può essere attribuita al fatto che le capacità di utilizzare nutrienti e di conseguenza la velocità di sviluppo sono fattori ceppo dipendenti (van Niel e Hahn-Hägerdal, 1999; Stuart *et al.*, 1999).

In Figura 26 sono invece riportate le cinetiche di acidificazione di succo di carota a 20 °C da parte dei tre lattococchi selezionati.



**Figura 26:** Cinetica di acidificazione del succo di carota espressa come diminuzione di pH nel tempo da parte dei ceppi di *L. lactis* LBG2, FBG1P e 3LC39.

Come osservabile in Figura 26, il pH iniziale del succo di carota risultava 6.46 ed in questo caso le cinetiche di acidificazione sono risultate pressoché identiche per tutti e tre i ceppi considerati nella sperimentazione. Infatti, se per il ceppo LBG2 la cinetica è risultata simile a quella osservata in latte di soia, per i ceppi FBG1P e 3LC39, rispetto a quanto osservato nella matrice alimentare precedente, le cinetiche di acidificazione sono risultate più rapide e simili a quella mostrata dal ceppo LBG2. In questo caso tutti e tre i ceppi hanno portato ad un'acidificazione abbondantemente al di sotto di valori di pH 5.0 già dopo 24h e

successivamente i valori di pH non sono scesi ulteriormente. Infatti, dopo 144h per tutti i ceppi i valori di pH rilevati sono risultati compresi tra 4.01 e 4.17. Anche i carichi cellulari osservati per i lattococchi in succo di carota hanno mostrato un rapido incremento del carico cellulare già nelle prime ore di fermentazione del succo a 20 °C (Tabella 9).

**Tabella 9:** Evoluzione del carico dei lattococchi (log ufc/mL) LBG2, FBG1P e 3LC39 in succo di carota nel tempo.

	lattococchi in carota log ufc/mL $\pm$ DS					
	0h	7h	24h	48h	72h	144h
LBG2	5.70 $\pm$ 0.15	6.86 $\pm$ 0.11	9.13 $\pm$ 0.06	8.98 $\pm$ 0.12	9.02 $\pm$ 0.05	6.65 $\pm$ 0.09
FBG1P	5.59 $\pm$ 0.09	7.00 $\pm$ 0.09	8.24 $\pm$ 0.14	8.05 $\pm$ 0.08	7.85 $\pm$ 0.09	6.90 $\pm$ 0.07
3LC39	5.63 $\pm$ 0.16	7.42 $\pm$ 0.07	9.18 $\pm$ 0.13	8.82 $\pm$ 0.06	8.65 $\pm$ 0.15	7.27 $\pm$ 0.13

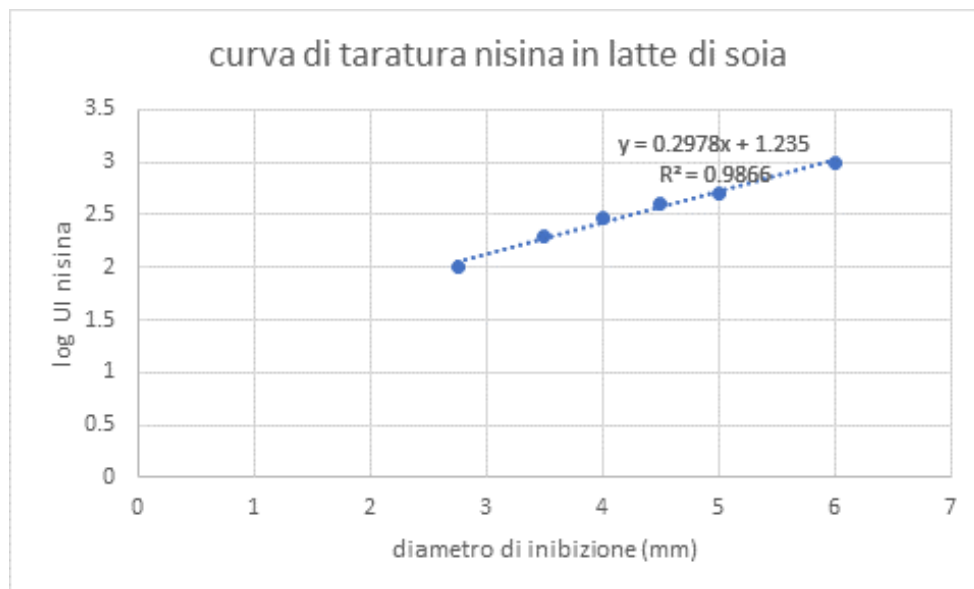
Dopo 7h i tre lattococchi, seppure con qualche differenza, hanno mostrato un incremento del carico cellulare di circa 1-1.5 cicli logaritmici rispetto al carico iniziale. Similmente a quanto osservato in latte di soia i ceppi avevano raggiunto la fase stazionaria di crescita già dopo 24h di stoccaggio. Tuttavia, in questo caso i carichi cellulari osservati superavano anche i 9.0 log ufc/mL per i ceppi LBG2 e 3LC39. Rispetto a quanto osservato in latte di soia in cui il carico cellulare risultava pressoché costante a partire dalle 24h sino alle 144h di stoccaggio, in succo di carota è stato osservato un suo decremento significativo dopo 144h di stoccaggio. Infatti, per tutti e tre i ceppi è stato determinato un decremento del carico cellulare di circa 2 cicli logaritmici rispetto a quanto osservato nelle rilevazioni precedenti.

Anche su succo di carota i lattococchi considerati in questa sperimentazione hanno mostrato delle buone potenzialità come agenti fermentanti e di biocontrollo. La velocità di crescita dei ceppi è risultata molto rapida e di conseguenza anche le cinetiche di acidificazione sono state veloci. Questo è un aspetto molto importante in quanto un ceppo potenzialmente applicabile per una pre-fermentazione di bevande vegetali deve possedere come prerequisito l'elevata velocità di fermentazione in quanto è fondamentale per prevenire l'eventuale sviluppo di altri microrganismi degradativi e/o patogeni potenzialmente presenti nella matrice (Buruleanu *et al.*, 2013; Di Cagno *et al.*, 2013). Da questo punto di vista l'abbassamento di pH, la produzione di acidi organici e quella di batteriocine fatti registrare

da questi lattococchi già nelle prime ore di fermentazione rappresentano un ostacolo al possibile sviluppo di microorganismi indesiderati (O'Sullivan *et al.*, 2002). Inoltre, cinetiche di fermentazione rapide sono essenziali anche per l'applicazione a livello industriale dei ceppi selezionati. Infatti, processi produttivi rapidi riducono significativamente i costi di produzione sia in termini di energia che di lavoro.

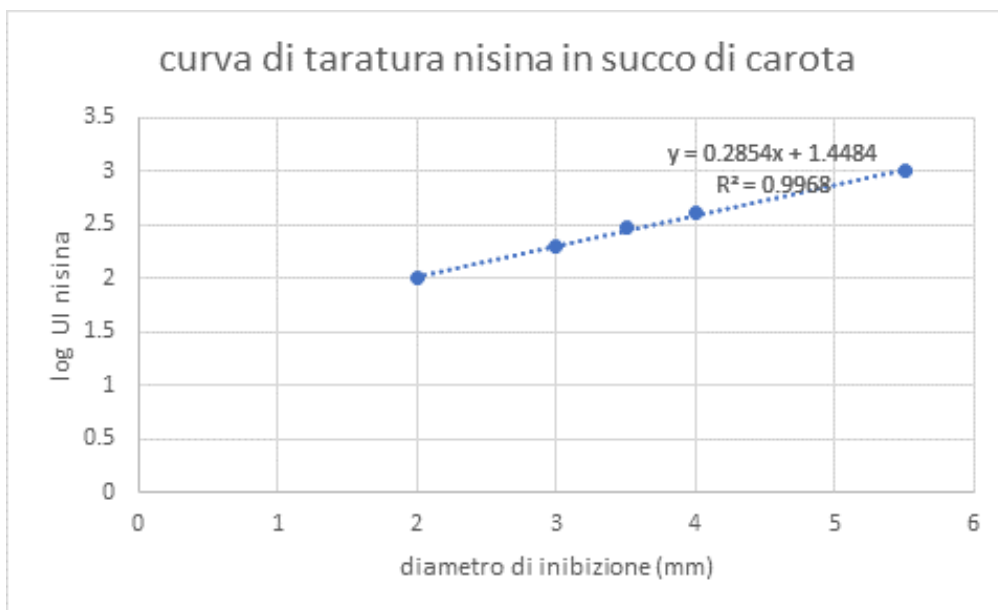
Durante lo stoccaggio a 20 °C, sia in succo di carota che in latte di soia, è stata monitorata la produzione di nisina da parte dei tre lattococchi considerati nella sperimentazione e quantificata con rette di taratura costruite con concentrazioni standard di batteriocina nelle matrici alimentari considerate. Queste rette di taratura sono state poi costruite confrontando le concentrazioni note con i relativi diametri degli aloni di inibizione in piastra nei confronti del ceppo *Lactobacillus plantarum* V7B3 nisina sensibile secondo il metodo riportato da Siroli *et al.* (2015).

In Figura 27 e 28 sono riportate rispettivamente le rette di taratura costruite con concentrazioni standard di nisina e relativi diametri di inibizione in latte di soia e succo di carota.



**Figura 27:** Retta di taratura nisina in latte di soia e relativo coefficienti di determinazione  $R^2$ .





**Figura 28:** Retta di taratura nisina in succo di carota e relativo coefficienti di determinazione  $R^2$ .

Come osservabile dalle due Figure 27 e 28 i coefficienti di determinazione  $R^2$  che esprimono la proporzione tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato sono risultati molto positivi. Infatti, nel caso del latte di soia questo valore è risultato 0.9866 mentre nel caso di succo di carota  $R^2$  è risultato ancora maggiore e pari a 0.9968.

In Tabella 10 e 11 sono riportate rispettivamente le quantità di nisina prodotta dai tre lattococchi testati in questa sperimentazione in latte di soia e succo di carota a 20 °C dopo 24, 48, 72 e 144h di stoccaggio ed espresse sia come unità internazionali di attività enzimatica (UI) che in mg/L.

**Tabella 10:** Nisina prodotta dai ceppi di lattococchi in latte di soia espressa in unità internazionale (UI)  $\pm$  deviazione standard e convertito in mg/L  $\pm$  deviazione standard.

soia	24h	48h	72h	144h	24h	48h	72h	144h
Ceppo	UI	UI	UI	UI	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
LBG2	1055 $\pm$ 6	1055 $\pm$ 6	581 $\pm$ 7	531 $\pm$ 3	26.4 $\pm$ 0.2	26.4 $\pm$ 0.2	14.5 $\pm$ 1.8	13.3 $\pm$ 0.1
FBG1P	322 $\pm$ 2	267 $\pm$ 8	267 $\pm$ 2	267 $\pm$ 2	8.1 $\pm$ 0.4	6.7 $\pm$ 1.9	6.7 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1
3LC39	531 $\pm$ 3	531 $\pm$ 3	531 $\pm$ 3	267 $\pm$ 2	13.3 $\pm$ 0.1	13.3 $\pm$ 0.1	13.3 $\pm$ 0.1	6.7 $\pm$ 0.1

**Tabella 11:** Nisina prodotta dai ceppi di lattococchi in succo di carota espressa in unità internazionale (UI)  $\pm$  deviazione e convertito in mg/L  $\pm$  deviazione standard.

Carota	24h	48h	72h	144h	24h	48h	72h	144h
Ceppo	UI	UI	UI	UI	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
LBG2	396 $\pm$ 6	246 $\pm$ 1	205 $\pm$ 5	140 $\pm$ 5	9.90 $\pm$ 1.6	6.15 $\pm$ 0.3	5.13 $\pm$ 0.1	3.52 $\pm$ 1.3
FBG1P	365 $\pm$ 3	396 $\pm$ 1	246 $\pm$ 5	140 $\pm$ 6	9.14 $\pm$ 0.8	9.90 $\pm$ 0.3	6.15 $\pm$ 1.3	3.52 $\pm$ 1.6
3LC39	396 $\pm$ 1	396 $\pm$ 1	246 $\pm$ 6	205 $\pm$ 5	9.90 $\pm$ 0.3	9.90 $\pm$ 0.3	6.15 $\pm$ 1.6	5.13 $\pm$ 0.1

I dati ottenuti evidenziano come la quantità di batteriocine prodotte sia risultata variabile sia in funzione della matrice considerata (latte di soia e succo di carota) che del ceppo testato.

In particolare, in latte di soia il ceppo LBG2 ha prodotto una maggiore quantità di nisina rispetto agli altri ceppi considerati; infatti dopo 24h la quantità di nisina prodotta da questo ceppo risultava 26.4 mg/L mentre i ceppi 3LC39 e FBG1P producevano rispettivamente 13.3 e 8.1 mg/L. Nel caso del ceppo LBG2 la concentrazione di nisina rilevata è risultata simile dopo 48h mentre nei tempi successivi è stato osservato un decremento della nisina presente nel substrato. Infatti, dopo 72 e 144h le concentrazioni di nisina risultavano quasi dimezzate rispetto a quelle osservate nei tempi precedenti (14.5 e 13.3 mg/L rispettivamente). Al contrario, per il ceppo 3LC39 le quantità di nisina prodotta in latte di soia sono risultate simili sino alle 72h di conservazione mentre dopo 144h è stata osservata una diminuzione della quantità di nisina presente che risultava pari a 6.7 mg/L. Nel caso del ceppo FBG1P le quantità di nisina presenti nel sistema sono risultate comprese tra 8.1 e 6.7 mg/L per tutto il periodo di stoccaggio.

Nel caso del succo di carota tutti i ceppi hanno mostrato una produzione di nisina simile tra loro. Per i ceppi 3LC39 e LBG2 le quantità di nisina prodotta sono risultate inferiori rispetto a quanto osservato in latte di soia. Al contrario il ceppo FBG1P è stato in grado di produrre una quantità di nisina superiore, almeno nei primi tempi di rilevazione, rispetto a quanto aveva prodotto in latte di soia. Tutti i ceppi in succo di carota hanno prodotto una quantità di nisina compresa tra 9.1 e 9.9 mg/L dopo 24h.

Per il ceppo LBG2 è stata poi osservata già a partire dalle 48h di stoccaggio una diminuzione della quantità di nisina presente che risultava pari a 3.5 mg/L dopo 144h. Gli altri due ceppi hanno mostrato delle cinetiche simili; infatti per entrambi è stata rilevata una quantità di

nisina in succo di carota dopo 48h simile a quella rilevata dopo 24h. Tuttavia, per entrambi i ceppi è stato poi rilevato un decremento della quantità di nisina presente dopo 72 e 144h.

I dati ottenuti confermano come la produzione di nisina in un sistema alimentare sia estremamente variabile in funzione del ceppo di lattococco considerato e soprattutto della composizione della matrice alimentare (De Vuyst e Vandamme, 1992; de Arauz *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2002). Infatti, il ceppo LBG2, nonostante cinetiche di crescita simili in succo di carota e latte di soia, ha prodotto una quantità di nisina tre volte superiore in quest'ultima matrice. D'altra parte, dati di letteratura evidenziano come la presenza di micronutrienti quali sali di potassio e calcio e vitamine, come la B2 e la B12, di cui il latte di soia è arricchito sono fattori essenziali in grado di influenzare quantitativamente la capacità di produrre nisina da parte di lattococchi (Li *et al.*, 2002). Li *et al.* (2002) hanno rilevato come un incremento del 2.84% di  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  nella composizione del substrato di crescita portava ad una produzione di batteriocine doppia da parte di ceppi di *Lactococcus lactis*.

Tutti i ceppi considerati hanno mostrato un più o meno accentuato decremento della quantità di nisina nel tempo in entrambe le matrici. Questo trend va a confermare i dati di letteratura che indicano la tarda fase esponenziale di crescita e l'inizio della fase stazionaria come le fasi in cui avviene la maggiore produzione di nisina. Successivamente si ha una riduzione del processo metabolico che porta alla produzione della batteriocina dal momento che la sua biosintesi è inibita dall'accumulo della batteriocina nel substrato di crescita (Cheing *et al.*, 2002; De Vuyst e Vandamme, 1992; Kim *et al.*, 1997). Inoltre, le condizioni chimico-fisiche e compositive del substrato sono notoriamente in grado di modificare la stabilità e l'attività della batteriocina nel tempo. Ad esempio, quest'ultima può interagire con altre macromolecole presenti nel substrato perdendo di attività antimicrobica. D'altra parte, l'effetto della matrice sulla stabilità e sull'attività della nisina è evidente anche nei dati ottenuti in questa sperimentazione. Infatti, la nisina risulta molto più stabile nel succo di carota rispetto a quanto osservato nel latte di soia, nonostante la produzione fosse maggiore in quest'ultima matrice.

Per quanto riguarda l'attività anti *Listeria* in soia e carota, i lattococchi considerati hanno mostrato come la loro presenza e la conseguente produzione di nisina fosse in grado di inibire lo sviluppo di *L. monocytogenes* in modo più o meno accentuato in base al ceppo e alla matrice considerata. Come evidenziato nelle Tabelle 12 e 13 i lattococchi sono stati in

grado di crescere e sviluppare indipendentemente dalla presenza di *Listeria* su entrambe le matrici alimentari. Infatti, le cinetiche di crescita dei lattococchi sono risultate del tutto simili a quelle che avevano mostrato nelle medesime matrici ma in assenza di *Listeria* (Tabelle 8 e 9).

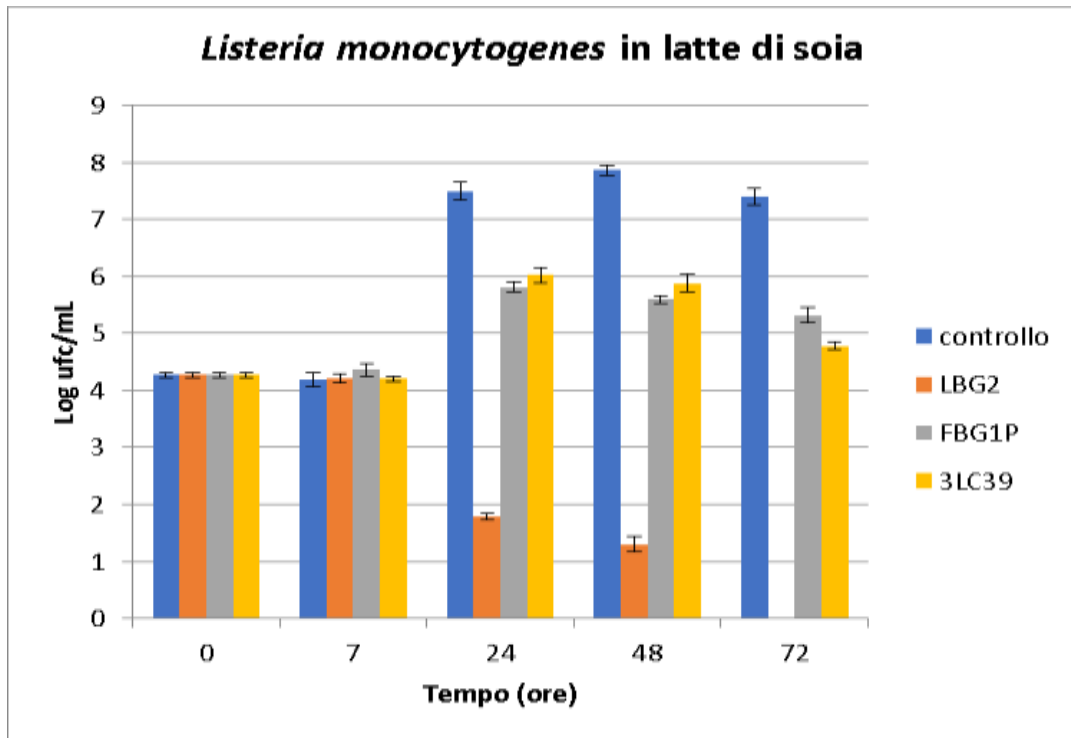
**Tabella 12:** Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo dei tre ceppi di lattococchi LBG2, FBG1P e 3LC39 in presenza di *L. monocytogenes* in latte di soia.

	lattococchi in soia log ufc/mL $\pm$ DS				
	0h	7h	24h	48h	72h
LBG2	5.70 $\pm$ 0.10	7.66 $\pm$ 0.28	8.58 $\pm$ 0.27	8.89 $\pm$ 0.16	8.27 $\pm$ 0.22
FBG1P	5.59 $\pm$ 0.15	7.15 $\pm$ 0.23	8.52 $\pm$ 0.19	8.61 $\pm$ 0.17	8.06 $\pm$ 0.29
3LC39	5.63 $\pm$ 0.12	7.26 $\pm$ 0.15	8.86 $\pm$ 0.30	8.77 $\pm$ 0.27	8.40 $\pm$ 0.23

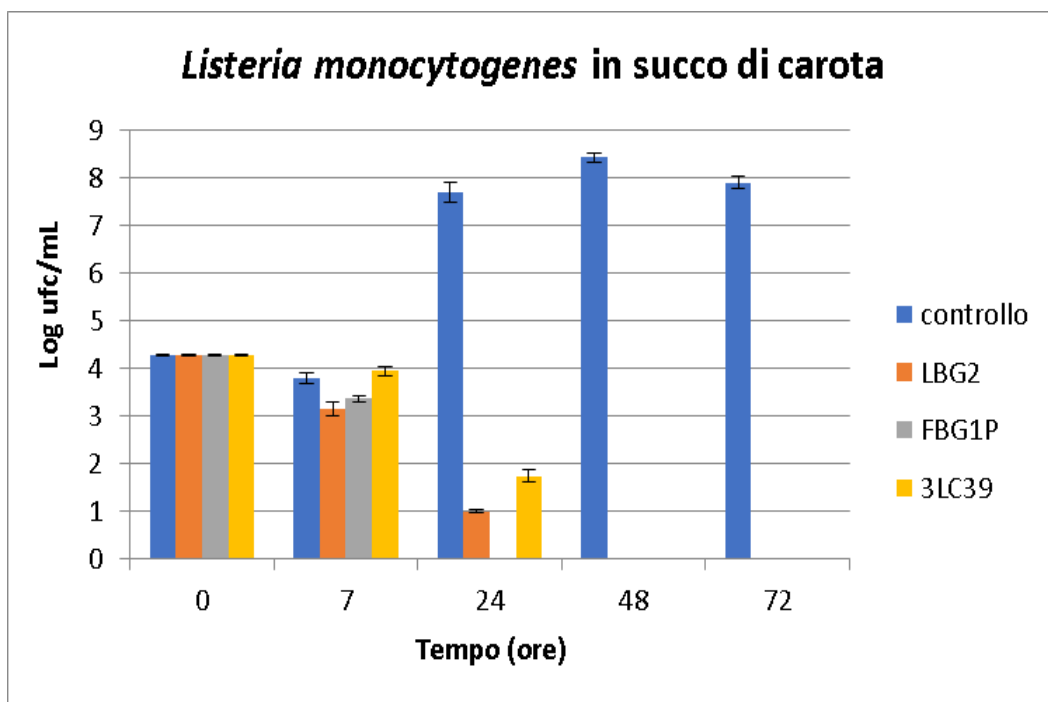
**Tabella 13:** Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo dei tre ceppi di lattococchi LBG2, FBG1P e 3LC39 in presenza di *L. monocytogenes* in succo di carota.

	lattococchi in carota log ufc/mL $\pm$ DS				
	0h	7h	24h	48h	72h
LBG2	5.70 $\pm$ 0.15	6.86 $\pm$ 0.22	9.00 $\pm$ 0.25	9.17 $\pm$ 0.15	8.98 $\pm$ 0.27
FBG1P	5.59 $\pm$ 0.19	7.00 $\pm$ 0.22	8.22 $\pm$ 0.28	8.12 $\pm$ 0.30	8.01 $\pm$ 0.19
3LC39	5.63 $\pm$ 0.26	7.42 $\pm$ 0.18	9.10 $\pm$ 0.26	9.15 $\pm$ 0.17	8.78 $\pm$ 0.25

Nelle Figure 29 e 30 sono riportate le cinetiche di sviluppo di *L. monocytogenes* in latte di soia e succo di carota in presenza di ognuno dei lattococchi considerati in questa sperimentazione, mentre il campione di controllo era rappresentato da succo di carota o latte di soia inoculati esclusivamente con il patogeno considerato. Indipendentemente dalla matrice alimentare considerata il carico iniziale di *Listeria* era circa 4.3 log ufc/mL.



**Figura 29:** Cinetiche di sviluppo (log ufc/mL) di *L. monocytogenes* in latte di soia in presenza o meno (controllo) dei lattococchi.



**Figura 30:** Cinetiche di sviluppo (log ufc/mL) di *L. monocytogenes* in succo di carota in presenza o meno (controllo) dei lattococchi.

Come evidenziato in Figura 29 il carico di *Listeria* in latte di soia è risultato per tutti i campioni, dopo 7h ore di stoccaggio a 20 °C, simile all'inoculo iniziale. Successivamente, dopo 24h di stoccaggio, nel campione di controllo *Listeria* aveva già raggiunto la fase stazionaria di crescita, con carichi cellulari superiori a 7.0 log ufc/mL. Anche i campioni con i ceppi di lattococchi FBG1P e 3LC39 hanno mostrato un incremento del carico di *Listeria* dopo 24h che risultava pari a 5.81 e 6.02 log ufc/mL, rispettivamente. Nei tempi successivi è stata rilevata una diminuzione del carico cellulare del patogeno che risultava pari a 5.32 e 4.78 log ufc/mL dopo 72h rispettivamente nei campioni in cui erano presenti i lattococchi FBG1P e 3LC39. Al contrario, una notevole attività anti *Listeria* in latte di soia è stata rilevata per il lattococco LBG2. Infatti, in questo caso già dopo 24h il carico di *Listeria* era sceso di circa 2.5 cicli logaritmici rispetto al carico iniziale, ed è stato osservato un'ulteriore decremento del carico del patogeno dopo 48 e 72h, quando scendeva al di sotto del limite di rilevabilità.

Questi risultati vanno a confermare quanto osservato nelle rilevazioni del carico cellulare e della quantificazione delle batteriocine in latte di soia. Infatti, il ceppo LBG2 era quello che aveva mostrato, in latte di soia, le più rapide cinetiche di crescita e di acidificazione nonché la maggiore quantità di nisina prodotta. Infatti, dopo 24h questa risultava doppia rispetto al ceppo 3LC39 e tripla rispetto al ceppo FBG1P. Nonostante fosse stata rilevata una buona produzione di nisina anche da parte dei ceppi 3LC39 e FBG1P, questa non è stata in grado di inibire totalmente *Listeria*. Infatti, per questi ceppi è stata osservata solo una inibizione parziale. Infatti, rispetto al ceppo LBG2 che portava ad una acidificazione del latte di soia a valori di pH al di sotto di 4.5 dopo 24h, i ceppi FBG1P e 3LC39 hanno mostrato una più lenta diminuzione del pH che dopo 24h risultava ancora al di sopra di 5.0. Si tratta di valori di pH non in grado di inibire *Listeria* che dunque grazie anche alla composizione del latte di soia estremamente ricca in micro e macronutrienti fondamentali per lo sviluppo microbico risultava in grado di sviluppare anche in presenza dei ceppi nisina produttori 3LC39 e FBG1P.

Al contrario, come osservabile in Figura 30, *Listeria* in succo di carota ha mostrato delle cinetiche di crescita completamente differenti rispetto a quanto osservato in latte di soia. Infatti, dopo 7h tutti i campioni, incluso il controllo, hanno mostrato un leggero decremento del carico cellulare del patogeno. Successivamente nel campione di controllo *Listeria* raggiungeva la fase stazionaria di crescita dopo 24h a 20 °C. Tutti i campioni in presenza di lattococchi hanno fatto registrare dopo 24h un decremento di *Listeria* superiore a tre cicli

logaritmici per i ceppi LBG2 e FBG1P e di 2.5 cicli logaritmici per il ceppo 3LC39. In tutti i campioni in cui erano presenti i lattococchi il carico di *Listeria* è sceso al di sotto del limite di rilevabilità già a partire dalle 48h di stoccaggio a 20 °C.

L'attività anti *Listeria* da parte dei lattococchi osservata in succo di carota è risultata estremamente elevata per tutti i ceppi testati, nonostante le quantità di nisina rilevate nel tempo fossero inferiori a quelle rilevate in latte di soia. Tuttavia, la maggiore efficacia dei lattococchi in succo di carota, rispetto al latte di soia, può essere ascrivibile al fatto che l'acidificazione del prodotto, in particolare per i ceppi FBG1P e 3LC39, è risultata molto più rapida in succo di carota rispetto al latte di soia. Nel caso del succo di carota tutti i lattococchi hanno fatto registrare valori di pH al di sotto di 4.5 già dopo 24h di stoccaggio a 20 °C. Questa maggiore acidità raggiunta dai campioni di carota rappresenta sicuramente il fattore maggiormente limitante per lo sviluppo di *L. monocytogenes* sia in sistemi modello che in sistemi alimentari (Sorrels *et al.*, 1989; Rohani *et al.*, 2011; Dal Bello *et al.*, 2012; Aryani *et al.*, 2015). Inoltre, l'efficacia e la stabilità della nisina come riportato da diversi autori risulta maggiore a pH più acidi (Rollema *et al.*, 1995; Gharsallaoui *et al.*, 2016). Questi fattori hanno sicuramente contribuito alla maggiore efficacia dei lattococchi nei confronti di *Listeria* in succo di carota rispetto al latte di soia, nonostante la quantità di nisina prodotta risultasse maggiore in quest'ultima matrice alimentare. Anche le concentrazioni di nisina rilevate nel tempo confermano la maggiore stabilità della batteriocina nel succo di carota rispetto al latte di soia.

I campioni sia di latte di soia che di succo di carota fermentati con i lattococchi nisina produttori sono stati anche sottoposti ad analisi delle molecole volatili mediante GC/MS SPME dopo 24, 48, 72 e 144h di stoccaggio a 20 °C. In Tabella 14 e 15 sono riportate rispettivamente le quantificazioni espresse come ppm di tutte le molecole identificate dai latti di soia e succhi di carota fermentati. Come possibile osservare dalle Tabelle, in latte di soia è stato possibile identificare 53 diverse molecole mentre dal succo di carota 67 diverse molecole tutte appartenenti alle classi chimiche degli idrocarburi, aldeidi, chetoni, alcoli, acidi ed esteri. A livello quantitativo i campioni di succo di carota hanno evidenziato una maggiore presenza di molecole volatili. Infatti, i campioni di controllo, al tempo iniziale, di succo di carota avevano una concentrazione totale di molecole volatili pari a circa 581 ppm.

Al contrario il latte di soia al tempo iniziale aveva una concentrazione totale di molecole pari a 17 ppm. Questa enorme differenza era dovuta alla massiccia presenza nei campioni di succo di carota di molecole terpeniche componenti dell'olio essenziale di carota; infatti oltre il 90% delle molecole rilevate era rappresentato da questi composti. In particolare, le molecole più rappresentative del succo di carota erano  $\beta$ -phellandrene, D-limonene,  $\gamma$ -terpinene, o-cymene, terpinolene,  $\alpha$ -cariophyllene,  $\beta$ -trans-Ocimene, elemicina e miristicina. La presenza di queste molecole è in accordo con quanto riportato in letteratura infatti questi composti sono quelli caratterizzanti la carota e il suo olio essenziale (Patrignani *et al.*, 2009; Fukuda *et al.*, 2013; Güler *et al.*, 2015; Kjeldsen *et al.*, 2003). Alcuni di questi sono riportati avere una buona attività antimicrobica (limonene e terpinolene), mentre altri presentano caratteristiche anti-nutrizionali, come la miristicina e l'elemicina (Gupta *et al.*, 2013; Narasimhan e Dhake 2006; Sharma *et al.*, 2012).

Al contrario il latte di soia presentava una bassissima quantità di molecole volatili, principalmente aldeidi, d'altra parte si tratta di un prodotto preventivamente sottoposto a sterilizzazione UHT e di conseguenza con ridotte quantità di molecole ad impatto organolettico (Ferragut *et al.*, 2015; Kaneko *et al.*, 2011; Poliseli-Scopel *et al.*, 2013).

Come possibile osservare dalle Tabelle 14 e 15, sia in latte di soia che in succo di carota la fermentazione con i ceppi di lattococchi 3LC39, FBG1P e LBG2 ha portato a specifici profili in molecole volatili in base alla matrice, al ceppo e al tempo di conservazione considerato. Come atteso, in latte di soia è stato osservato un incremento quali-quantitativo delle molecole volatili durante il processo fermentativo. In particolare, per tutti i ceppi considerati, è stato riscontrato un incremento significativo di acidi, come acido acetico, di alcoli, soprattutto etanolo, 3 metil 1 butanolo e 1 esanolo, chetoni, quali diacetile e acetoino, ed aldeidi. Alcune delle molecole di neoformazione, come diacetile e acetoino, sono riportate come caratteristiche di formaggi e latti fermentati, dove rappresentano molecole chiave del profilo organolettico (Clark e Winter, 2015; Siroli *et al.*, 2017). Nonostante tutti i lattococchi abbiano portato ad un incremento quali-quantitativo delle molecole volatili dei latti di soia fermentati, questi profili sono risultati influenzati dal ceppo considerato. Il ceppo LBG2 ha portato ad una maggiore produzione di aldeidi (3-metil-butanale, ottanale, nonanale), acidi (acido acetico e acido pentanoico) e alcoli (3-metil-1 pentanolo) rispetto agli altri ceppi sin dai tempi iniziali di fermentazione. Al contrario i latti di



soia fermentati con il ceppo FBG1P risultavano caratterizzati da maggiori quantità di chetoni, in particolare diacetile, acetoino ed esteri. Il ceppo 3LC39 è risultato infine quello che ha portato ad una minore produzione quantitativa di molecole volatili rispetto agli altri ceppi e per tutto il periodo di conservazione (144h).

Anche i succhi di carota fermentati hanno mostrato un profilo in molecole volatili differente in funzione del ceppo considerato. In generale è stata osservata una notevole riduzione quantitativa delle molecole terpeniche inizialmente presenti, dovuta principalmente ad una detossificazione microbica di molecole come terpinolene, limonene e miristicina. Questa diminuzione è in accordo con quanto osservato da diversi autori che hanno rilevato il decremento di molecole terpeniche in succo di carota durante il processo fermentativo e lo stoccaggio refrigerato (Kjeldsen et al., 2003; Fukuda et al., 2013). Al contrario è stato osservato un notevole incremento di aldeidi, chetoni, alcoli, acidi. La cinetica di riduzione quantitativa delle molecole terpeniche nel tempo di conservazione è risultata simile per tutti i lattococchi considerati. Tuttavia, l'incremento quantitativo delle altre classi di molecole è risultato ceppo dipendente. In particolare, le maggiori differenze quali-quantitative tra i ceppi hanno riguardato la classe chimica dei chetoni. Il ceppo LBG2 è risultato caratterizzato dalla maggiore quantità di diacetile, mentre il ceppo 3LC39 era caratterizzato da elevate quantità di acetoino. Al contrario il ceppo FBG1P era caratterizzato dalla più bassa quantità di chetoni e in particolare dall'assenza di acetoino.

**Tabella 14:** Composizione espressa in ppm del profilo di molecole volatili nel tempo di latti di soia fermentati dai diversi ceppi di lattococchi.

molecole	T0 ppm	3LC39				FBG1P				LBG2			
		T24 ppm	T48 ppm	T72 ppm	T144 ppm	T24 ppm	T48 ppm	T72 ppm	T144 ppm	T24 ppm	T48 ppm	T72 ppm	T144 ppm
Acetaldeide	0.00	0.09	0.10	0.14	0.06	0.08	0.09	0.10	0.06	0.06	0.07	0.02	
2-metil-butanale	0.02	0.02	0.13	0.12	0.15	0.02	0.08	0.13	0.21	0.21	0.42	0.34	0.31
3-metil-butanale	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	1.00	3.10	2.89	2.86
Esanale	2.32	0.50	1.02	0.88	0.96	0.49	1.16	1.23	1.78	0.91	0.91	0.85	1.31
Eptanale	0.23	0.16	0.23	0.05	0.33	0.10	0.71	0.71	0.50	0.58	0.36	0.44	0.38
Ottanale	0.30	0.36	0.56	0.40	0.50	0.27	0.57	0.83	0.84	1.21	1.25	1.12	1.02
Nonanale	0.26	0.47	0.63	0.46	0.52	0.33	0.66	0.67	0.95	1.61	1.12	1.31	0.99
Decanale	0.09	0.20	0.34	0.16	0.17	0.18	0.16	0.25	0.27	0.47	0.37	0.34	0.22
furfurale	0.00	0.00	0.00	0.18	0.11	0.00	0.11	0.22	0.32	0.00	0.00	0.10	0.36

benzaldeide	0.07	0.35	0.51	0.23	0.49	0.29	0.24	0.42	0.67	0.32	0.24	0.38	1.11
benzeneacetaldeide	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.20	0.28	0.29	0.50
<b>Totale aldeidi</b>	<b>3.30</b>	<b>2.16</b>	<b>3.53</b>	<b>2.62</b>	<b>3.28</b>	<b>1.76</b>	<b>3.79</b>	<b>4.57</b>	<b>5.66</b>	<b>6.56</b>	<b>8.11</b>	<b>8.13</b>	<b>9.10</b>
Furan 2-Etil	0.15	0.04	0.09	0.04	0.12	0.03	0.09	0.09	0.15	0.08	0.06	0.07	0.10
Furan 2-Butil	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.05	0.04	0.13	0.03	0.03
2-pentil-furano	0.34	0.22	0.38	0.39	0.45	0.18	0.47	0.47	0.67	0.39	0.36	0.28	0.58
2,4,4,6,6,8,8-eptametil-1-nonene	0.25	0.33	0.44	0.07	0.44	0.26	0.46	0.51	0.69	0.51	0.45	0.43	0.40
2,4,4,6,6,8,8-eptametil-2-nonene	0.27	0.34	0.66	0.57	0.47	0.21	0.39	0.44	0.70	0.43	0.54	0.60	0.21
<b>Totale idrocarburi</b>	<b>1.01</b>	<b>0.92</b>	<b>1.57</b>	<b>1.07</b>	<b>1.48</b>	<b>0.69</b>	<b>1.45</b>	<b>1.56</b>	<b>2.25</b>	<b>1.46</b>	<b>1.54</b>	<b>1.40</b>	<b>1.33</b>
2-Butanone	0.00	0.00	0.12	0.16	0.36	0.00	0.31	0.35	0.33	0.00	0.00	0.07	0.20
2-Pentanone	0.21	0.06	0.11	0.13	0.16	0.05	0.16	0.28	0.38	0.07	0.14	0.14	0.19
Diacetile	0.00	0.39	0.99	1.70	2.38	0.23	1.36	1.70	4.55	0.29	0.88	0.99	1.78
metil isobutil chetone	0.42	0.57	0.67	0.55	0.54	0.75	0.70	0.49	0.37	0.56	0.73	0.62	0.42
4-metil-2-esanone	0.29	0.42	0.46	0.32	0.34	0.37	0.48	0.42	0.41	0.46	0.26	0.43	0.34
4-metil-3-penten-2-one	0.41	0.71	0.78	0.78	0.40	0.99	1.01	0.83	0.76	1.22	0.75	0.82	0.55
2,6-dimetil-4-eptanone	0.11	0.39	0.33	0.32	0.29	0.28	0.33	0.24	0.26	0.40	0.27	0.22	0.22
2-Eptanone	0.00	0.06	0.11	0.15	0.20	0.09	0.13	0.12	0.22	0.12	0.13	0.15	0.23
2-Eptanone, 4-metil	0.00	0.03	0.06	0.06	0.15	0.00	0.07	0.09	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00
3-Ottanone	0.00	0.00	0.06	0.09	0.13	0.00	0.13	0.14	0.20	0.00	0.00	0.00	0.09
acetoino	0.00	0.53	0.94	1.84	2.04	0.12	0.73	2.09	3.51	1.18	2.29	3.33	3.10
2-Nonanone	0.00	0.00	0.09	0.14	0.54	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.11	0.10	0.08
<b>Totale chetoni</b>	<b>1.4</b>	<b>3.2</b>	<b>4.7</b>	<b>6.2</b>	<b>7.5</b>	<b>2.9</b>	<b>5.4</b>	<b>6.8</b>	<b>11.2</b>	<b>4.4</b>	<b>5.6</b>	<b>6.9</b>	<b>7.2</b>
Etanolo	1.05	1.34	1.82	1.99	2.41	1.25	1.68	1.84	2.39	1.43	1.51	1.76	2.01
2 Esanolo 2,3 dimetil	0.31	0.20	0.69	0.56	0.84	0.13	0.74	0.86	1.08	0.76	0.66	0.70	0.60
3-metil-1-butanolo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.15	0.22	0.52	0.79	2.98	2.63	4.79
2-Esanolo	0.18	0.27	0.28	0.21	0.11	0.29	0.30	0.24	0.19	0.28	0.15	0.14	0.18
5-metil-3-esanolo	0.13	0.27	0.18	0.18	0.16	0.21	0.26	0.18	0.13	0.22	0.17	0.17	0.19
1-pentanolo	0.12	0.07	0.19	0.17	0.24	0.12	0.21	0.24	0.46	0.22	0.25	0.15	0.27
pentafluoropropionato 2,4,4-trimetil-1-pentanolo	0.12	0.27	0.60	0.00	0.00	0.23	0.36	0.35	0.56	0.40	0.37	0.80	0.27
1-esanolo	0.19	0.58	1.19	2.05	2.32	0.56	1.31	1.90	4.33	0.77	0.94	1.22	2.01
3-Ottanolo	0.00	0.00	0.00	0.11	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.23	0.19	0.18	0.00
1-octen-3-olo	0.57	0.59	0.59	1.35	1.54	0.52	0.98	1.05	1.70	0.64	0.83	0.90	1.50
Eptanolo	0.00	0.00	0.00	0.09	0.10	0.00	0.09	0.10	0.15	0.06	0.08	0.09	0.10
1-Esanolo, 2-Etil	0.00	0.00	0.00	0.12	0.16	0.00	0.10	0.12	0.16	0.00	0.00	0.08	0.16
3-Nonanolo	0.00	0.25	0.39	0.25	0.20	0.19	0.21	0.25	0.33	0.49	0.38	0.42	0.14
1-Ottanolo	0.00	0.12	0.26	0.08	0.15	0.08	0.16	0.21	0.28	0.26	0.21	0.20	0.13
1,2- Decandiolo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.21	0.24	0.05
3,6,9,12-tetraoxatetradecan-1-olo	0.04	0.25	0.29	0.00	0.28	0.12	0.18	0.22	0.24	0.33	0.27	0.24	0.15
2-metil-3-ottanolo	0.00	0.08	0.15	0.13	0.11	0.00	0.10	0.34	0.25	0.26	0.29	0.20	0.21
Benzil alcol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.14	0.15
feniletil alcol	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.37	0.26	0.84	0.81	0.51
<b>Totale alcoli</b>	<b>2.7</b>	<b>4.3</b>	<b>6.6</b>	<b>7.3</b>	<b>8.8</b>	<b>3.7</b>	<b>6.8</b>	<b>8.1</b>	<b>13.4</b>	<b>7.7</b>	<b>10.3</b>	<b>11.1</b>	<b>13.4</b>
Etil acetato	0.00	0.03	0.03	0.03	0.04	0.00	0.11	0.05	0.04	0.00	0.02	0.02	0.04
ciclohesilmetil tetradecil estere	1.21	1.12	1.30	1.73	1.82	1.18	1.26	1.86	2.44	1.88	1.17	1.31	1.41
<b>Totale esteri</b>	<b>1.21</b>	<b>1.15</b>	<b>1.33</b>	<b>1.76</b>	<b>1.86</b>	<b>1.18</b>	<b>1.37</b>	<b>1.90</b>	<b>2.48</b>	<b>1.88</b>	<b>1.18</b>	<b>1.33</b>	<b>1.45</b>
Acido acetico	0.00	0.52	1.77	2.09	2.50	0.52	0.61	2.02	3.20	2.28	5.20	4.95	3.19

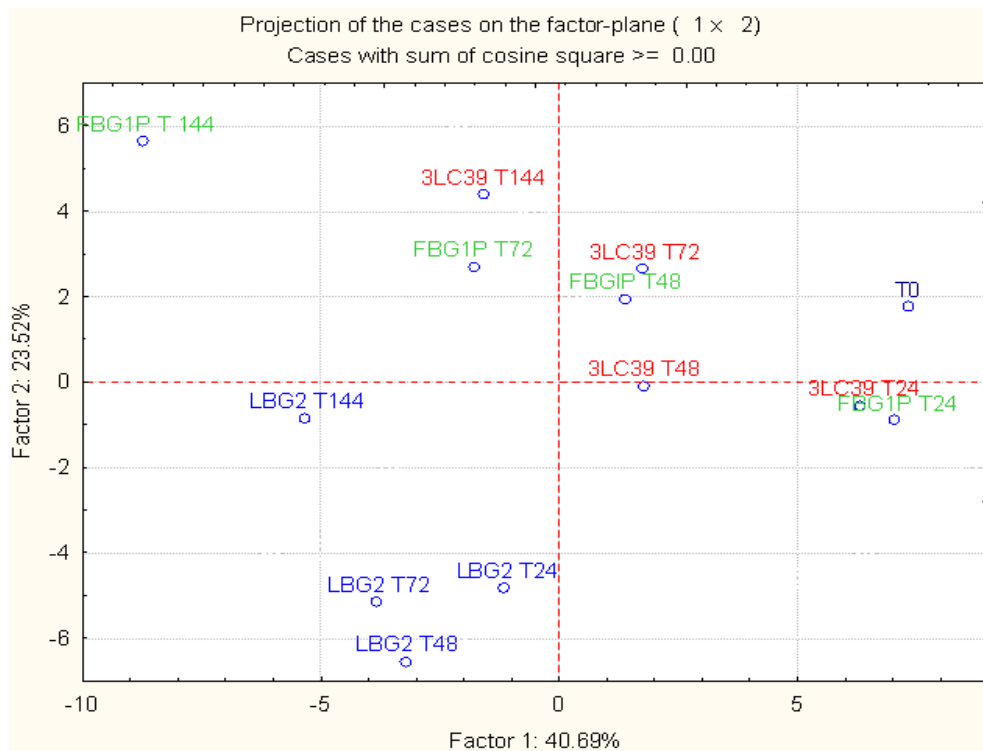
metil estere acido pentanoico, 4-metil-2-oxo	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.16	0.04	0.00	0.00	1.22	0.89	1.05
acido pentanoico, 2-idrossi, 4-metil	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.70	2.33	3.51
Acido esanoico	0.00	0.00	0.45	0.34	0.27	0.10	0.21	0.30	0.83	0.53	0.70	0.61	0.41
<b>Totale acidi</b>	<b>0.0</b>	<b>0.5</b>	<b>2.2</b>	<b>2.4</b>	<b>2.8</b>	<b>0.6</b>	<b>1.0</b>	<b>2.4</b>	<b>4.0</b>	<b>5.5</b>	<b>9.5</b>	<b>8.7</b>	<b>8.2</b>
<b>Totale molecole</b>	<b>17.2</b>	<b>15.2</b>	<b>31.4</b>	<b>18.7</b>	<b>30.9</b>	<b>13.4</b>	<b>25.9</b>	<b>30.9</b>	<b>48.8</b>	<b>38.6</b>	<b>43.4</b>	<b>44.4</b>	<b>42.9</b>

**Tabella 15:** Composizione espressa in ppm del profilo di molecole volatili nel tempo di succhi di carota fermentati dai diversi ceppi di lattococchi.

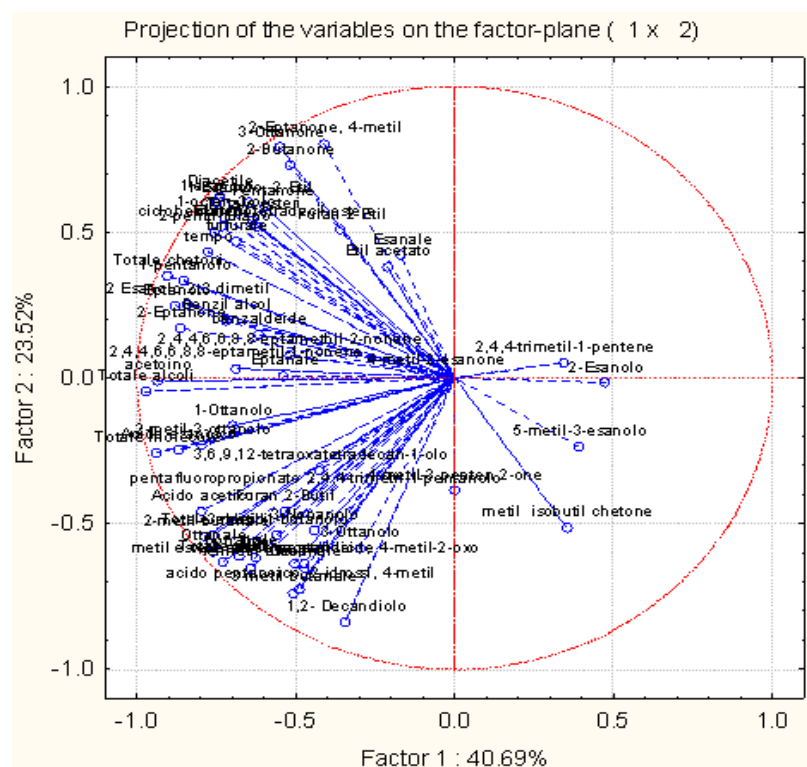
molecole	T0 ppm	FBG1P				3LC39				LBG2			
		T24 ppm	T48 ppm	T72 ppm	T144 ppm	T24 ppm	T48 ppm	T72 ppm	T144 ppm	T24 ppm	T48 ppm	T72 ppm	T144 ppm
2-pentil-furano	0.36	0.18	0.42	0.45	0.57	0.27	0.39	0.47	0.30	0.23	0.50	0.36	0.40
2,4,4,6,6,8,8-epitametil-1-nonone	0.59	0.43	1.01	1.14	1.13	0.30	1.03	1.02	0.72	0.25	0.78	0.80	0.54
4,5,6,7-tetraidro-3,6-dimetil-benzofurano	0.00	0.42	0.82	1.70	1.94	0.25	1.12	1.62	1.68	0.14	1.03	1.21	2.44
$\alpha$ -pinene	6.45	2.83	2.66	2.42	1.94	5.86	3.20	2.64	1.52	5.48	2.63	1.91	1.20
camphene	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.57	0.00	0.34	0.22	0.18	0.28	0.28	0.10
$\beta$ -pinene	4.63	2.18	2.05	1.89	1.83	4.91	2.82	1.89	1.23	3.48	2.59	1.40	1.28
$\beta$ -phellandrene	9.37	3.34	2.72	2.29	1.28	4.59	2.63	2.02	0.86	5.07	2.78	1.56	1.28
$\alpha$ -phellandrene	4.15	3.03	1.98	1.73	1.48	4.04	3.29	2.43	1.83	3.55	2.88	2.22	1.95
$\alpha$ -terpinene	2.40	1.80	1.49	1.12	1.05	2.14	1.42	1.26	0.87	1.89	1.58	1.11	1.01
D-limonene	19.2	12.88	9.77	8.65	7.04	17.41	9.36	8.66	5.76	12.26	9.92	9.88	8.22
$\beta$ -phellandrene	1.17	0.65	0.91	0.92	0.99	1.05	0.89	0.81	0.86	0.95	0.92	0.76	0.75
Ocimene	1.10	0.29	0.23	0.47	0.34	0.58	0.46	0.41	0.25	0.47	0.40	0.17	0.53
$\gamma$ -terpinene	46.7	31.1	27.3	24.6	20.1	41.7	29.1	26.1	17.6	36.4	33.2	28.54	23.17
o-cymene	13.7	11.6	10.6	10.2	9.5	12.5	10.9	8.9	7.7	10.5	9.69	9.16	8.61
terpinolene	85.7	78.9	75.9	65.9	57.1	82.1	75.7	70.2	53.6	77.9	71.9	62.1	60.8
1,3,8- <i>p</i> -mentatriene	1.97	1.11	0.93	0.98	0.60	1.49	1.22	0.97	0.33	0.90	0.89	0.55	0.53
<i>p</i> , $\alpha$ -Dimetilstirene	5.45	5.17	5.04	4.42	3.51	5.28	4.95	4.98	2.85	4.45	3.93	3.56	3.77
caryophyllene	87.9	79.5	71.6	68.9	62.5	85.5	72.9	67.5	64.3	82.9	76.1	68.5	66.2
$\beta$ -bisabolene	3.34	3.03	2.32	2.02	1.53	3.10	2.50	2.64	1.73	3.25	2.86	1.79	1.55
$\alpha$ -cariophyllene	11.9	8.88	7.86	6.87	6.92	10.9	7.15	6.22	6.15	9.67	8.08	6.73	6.88
$\alpha$ -bisabolene	2.00	1.09	0.95	1.33	1.85	1.83	1.04	1.79	1.03	1.31	1.15	1.01	1.01
$\beta$ -trans-Ocimene	22.3	22.3	20.5	18.4	16.9	23.2	20.5	17.5	14.6	18.9	17.4	15.5	14.0
$\alpha$ -curcumene	0.89	0.65	0.54	0.55	0.52	0.98	0.43	0.69	0.59	0.79	0.53	0.58	0.80
Cariophyllene oxide	0.00	0.00	0.64	1.90	3.03	0.54	1.64	1.99	2.57	0.66	1.59	1.89	2.47
Elemicina	13.5	12.3	12.5	12.2	11.9	8.8	8.3	7.9	7.58	8.85	8.56	8.13	8.22
Miristicina	204	198	178	159	145	197	193	182	158	191	185	175	167
<b>Totale idrocarburi</b>	<b>549</b>	<b>482</b>	<b>438</b>	<b>400</b>	<b>360</b>	<b>517</b>	<b>456</b>	<b>423</b>	<b>354</b>	<b>482</b>	<b>448</b>	<b>406</b>	<b>385</b>
Acetaldeide	0.00	0.14	0.12	0.13	0.12	0.12	0.15	0.16	0.15	0.12	0.13	0.13	0.14
2-metil-butanale	0.03	0.06	0.13	0.14	0.16	0.07	0.09	0.11	0.13	0.09	0.11	0.14	0.17
3-metil-butanale	0.00	0.76	1.02	1.40	1.46	0.03	0.04	0.04	0.04	0.73	0.77	1.00	1.14
esanale	0.71	0.33	0.56	0.59	1.18	0.52	0.69	1.07	1.15	0.35	0.54	0.98	1.34

eptanale	0.36	0.45	0.77	1.39	1.19	0.73	1.60	1.77	1.16	0.20	1.20	1.11	1.22
nonale	2.21	2.98	2.28	2.19	1.38	2.81	2.24	2.02	1.40	2.17	1.89	1.82	1.66
decanale	0.00	0.55	0.51	0.62	0.87	0.11	0.42	0.61	1.02	0.30	0.67	0.57	0.64
3-nonale	0.00	0.69	0.83	0.85	0.81	0.37	0.94	1.11	1.17	0.59	0.72	0.86	0.89
2-nonenal, (e)	1.32	1.31	1.49	1.72	1.73	1.56	1.61	1.37	1.03	0.78	0.98	1.44	1.71
Benzenacetaldede	0.00	0.44	0.65	0.98	0.94	0.43	0.37	0.32	0.34	0.32	0.38	0.24	0.67
<b>Totale aldeidi</b>	<b>4.6</b>	<b>7.7</b>	<b>8.4</b>	<b>10.0</b>	<b>9.8</b>	<b>6.7</b>	<b>8.1</b>	<b>8.6</b>	<b>7.6</b>	<b>5.7</b>	<b>7.4</b>	<b>8.3</b>	<b>9.6</b>
2-Butanone	0.17	0.29	0.35	0.38	0.36	0.27	0.33	0.35	0.35	0.17	0.29	0.36	0.37
Diacetile	0.00	0.45	0.55	1.12	1.64	0.42	0.59	1.10	2.38	0.30	0.75	1.09	4.31
metil isobutil chetone	0.23	0.30	0.34	0.29	0.27	0.25	0.23	0.31	0.36	0.34	0.30	0.33	0.31
4-metil-3-penten-2-one	0.41	0.48	0.54	0.51	0.47	0.58	0.86	0.95	0.81	0.33	0.51	0.88	0.61
2,6-dimetil-4-eptanone	0.00	0.00	0.45	0.57	0.96	0.00	0.59	0.71	0.68	0.24	0.75	0.79	0.89
2,2 dimetil-3-Ottanone	0.46	0.10	0.13	0.25	0.27	0.00	0.11	0.17	0.13	0.00	0.30	0.14	0.24
acetoino	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.47	1.14	1.54	2.18	0.00	0.00	0.68	0.85
5-epten-2-one, 6-metil	0.00	0.00	0.00	0.49	0.95	0.00	0.48	0.56	0.66	0.00	0.44	0.34	0.69
2-nonanone	0.00	0.39	0.53	0.66	0.86	0.52	0.58	0.61	0.64	0.23	0.46	0.37	0.72
Geranil acetone	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01	0.00	0.55	0.71	0.81	0.00	0.78	0.64	0.78
<b>Totale chetoni</b>	<b>1.3</b>	<b>2.0</b>	<b>2.9</b>	<b>4.3</b>	<b>6.8</b>	<b>2.5</b>	<b>5.5</b>	<b>7.0</b>	<b>9.0</b>	<b>1.6</b>	<b>4.6</b>	<b>5.6</b>	<b>9.8</b>
etanolo	0.86	2.12	1.89	1.85	1.71	2.27	1.95	1.71	1.78	1.87	1.83	1.98	2.09
ciclopentanolo	0.06	0.07	0.07	0.00	0.00	0.08	0.12	0.22	0.21	0.06	0.08	0.19	0.39
3-metil-1-butanolo	0.00	0.39	1.04	1.33	1.41	0.00	0.14	0.18	0.23	0.83	0.98	1.00	1.47
1-eptanolo	0.00	0.34	0.45	0.68	1.13	0.36	0.77	0.77	0.86	0.25	0.43	0.46	0.72
2-etil-1-esanolo	0.00	0.16	0.17	0.17	0.32	0.12	0.23	0.46	0.44	0.12	0.18	0.18	0.38
2,6-dimetil-4-eptanolo	0.00	1.25	1.09	1.19	1.28	0.12	0.00	0.00	0.68	0.91	1.06	0.72	0.86
1-octanolo	0.00	1.73	1.94	2.30	3.91	1.70	2.75	2.70	2.84	1.12	1.96	2.09	3.14
terpinen-4-olo	0.18	1.96	3.89	5.44	6.89	2.13	4.48	5.99	6.09	0.90	4.32	5.50	7.21
2-Cicloesen-1-olo	0.18	0.29	0.87	0.95	1.30	0.18	0.83	1.00	1.45	0.14	0.53	0.57	0.57
p-Cimen-8-olo	0.00	1.02	1.16	1.66	3.02	1.71	1.58	1.81	1.72	0.59	1.35	1.43	1.78
eugenolo	5.01	4.64	4.53	4.12	3.65	4.51	3.92	3.15	2.33	3.73	2.58	2.64	2.67
2-Metossi-4-vinilfenolo	0.00	0.80	0.68	0.53	0.09	0.00	0.30	0.00	0.00	0.41	0.36	0.32	0.20
4-(1,1-dimetiletil)- $\alpha$ -metil-benzenemetanolo	0.75	1.23	1.65	1.75	1.40	0.51	1.49	1.32	0.93	0.34	1.06	1.08	0.50
metileugenolo	1.15	1.40	1.39	1.47	1.35	1.41	1.50	1.29	0.90	1.65	1.36	1.10	0.96
<b>Totale alcoli</b>	<b>8.2</b>	<b>17.4</b>	<b>20.8</b>	<b>23.4</b>	<b>27.5</b>	<b>15.1</b>	<b>20.1</b>	<b>20.6</b>	<b>20.5</b>	<b>12.9</b>	<b>18.1</b>	<b>19.3</b>	<b>23.0</b>
acido acetico	0.00	1.14	1.63	1.83	2.12	1.45	1.91	2.25	2.22	0.78	1.59	1.90	1.56
cicloesilmetil tetradecil estere acido ossalico	2.44	2.31	3.36	3.36	3.96	1.79	3.39	2.92	2.14	1.15	2.57	2.43	1.73
dodec-9-ynyl ester thiophene-2-acetic acid	5.45	5.82	7.19	8.97	9.10	5.78	8.62	9.06	7.96	5.07	8.08	8.73	7.75
acido ottanoico	0.00	0.00	0.00	0.00	0.66	0.00	0.00	0.00	0.30	0.23	0.63	0.40	0.39
<b>Totale acidi</b>	<b>7.9</b>	<b>9.3</b>	<b>12.2</b>	<b>14.2</b>	<b>15.8</b>	<b>9.0</b>	<b>13.9</b>	<b>14.2</b>	<b>12.6</b>	<b>7.2</b>	<b>12.9</b>	<b>13.5</b>	<b>11.4</b>
Timol metil estere	4.56	2.57	2.60	2.57	2.52	3.98	2.96	2.67	1.65	2.66	2.65	1.98	2.21
L- $\alpha$ -bornil acetato	4.84	4.15	3.82	4.24	3.21	5.37	5.31	5.17	2.47	3.96	3.99	2.80	2.99
Linalil 3-metilbutanoato	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.71	0.58	1.12	0.51	0.26	0.59	0.50	0.63
<b>Totale esteri</b>	<b>9.4</b>	<b>6.7</b>	<b>6.4</b>	<b>6.8</b>	<b>5.7</b>	<b>11.1</b>	<b>8.9</b>	<b>9.0</b>	<b>4.6</b>	<b>6.9</b>	<b>7.2</b>	<b>5.3</b>	<b>5.8</b>
<b>Totale molecole</b>	<b>580</b>	<b>525</b>	<b>489</b>	<b>458</b>	<b>426</b>	<b>561</b>	<b>513</b>	<b>482</b>	<b>408</b>	<b>516</b>	<b>498</b>	<b>458</b>	<b>445</b>

I dati GC-MS SPME sono stati poi sottoposti ad un'analisi delle componenti principali (PCA) al fine di meglio evidenziare le differenze dei profili delle molecole volatili in latte di soia e succo di carota in rapporto al ceppo di lattococco utilizzato. In Figura 31 è riportata la proiezione dei casi sul piano fattoriale (1 x 2) relativa ai campioni di latte di soia. La proiezione dei campioni sul piano risulta influenzata dal ceppo e dal tempo di conservazione considerato. Tutti i campioni fermentati con il ceppo LBG2 risultano chiaramente separati dagli altri sia lungo la componente principale 1, che spiega il 40.69% della varianza, che lungo la componente principale 2, che spiega il 23.52% della varianza. Inoltre, i campioni fermentati con quest'ultimo ceppo risultano molto simili tra loro dopo 24, 48 e 72h. Solo il campione a 144h è risultato distante dagli altri, prevalentemente lungo la componente principale 2. Per quel che riguarda i ceppi 3LC39 e FBG1P i campioni sono risultati simili tra loro ma differenti in base al tempo di conservazione considerato. Infatti, dopo 24h risultavano entrambi molto vicini al campione di controllo (T0). Nei tempi successivi entrambi i ceppi hanno portato ad uno spostamento dei campioni prevalentemente lungo la componente principale 1. La proiezione delle variabili che hanno permesso la clusterizzazione nello spazio dei campioni lungo il piano fattoriale (1-2) sono riportate in Figura 32. In particolare, i campioni fermentati con il ceppo LBG2 erano caratterizzati da aldeidi (3-metil-butanale, ottanale, nonanale), acidi (acido acetico e acido pentanoico) e alcoli (3-metil-1-pentanololo). Al contrario i latti di soia fermentati con i ceppi FBG1P e 3LC39 risultavano invece clusterizzati principalmente sulla base dei chetoni presenti.

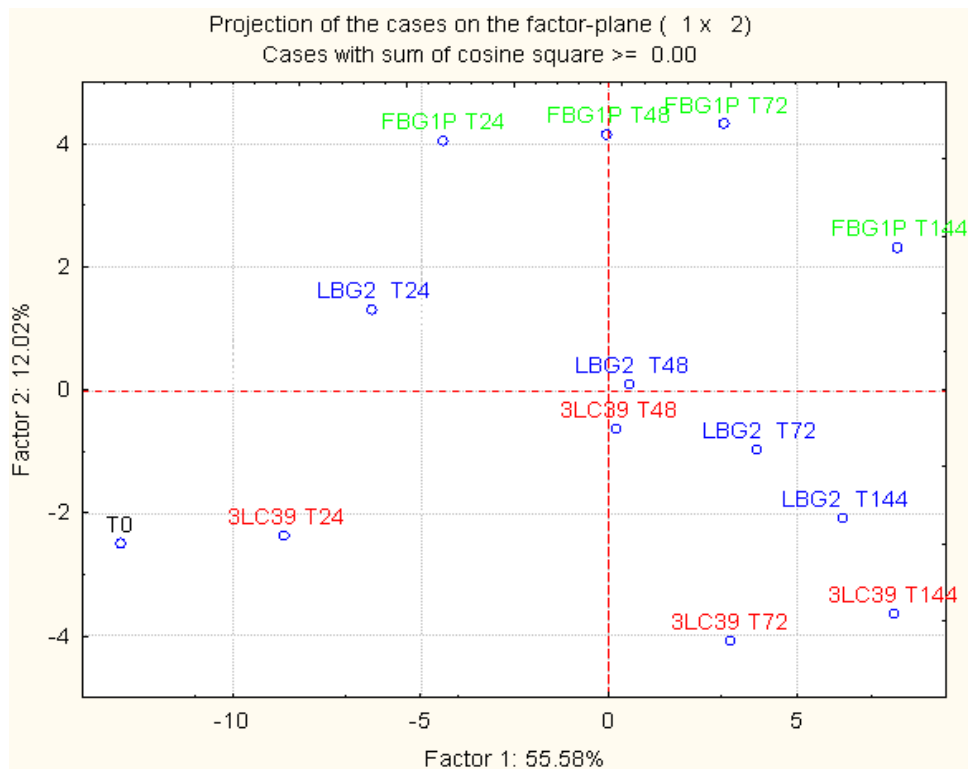


**Figura 31:** Analisi del profilo in molecole volatili di latte di soia fermentato mediante analisi delle componenti principali (PCA). Proiezione dei casi sul piano fattoriale.

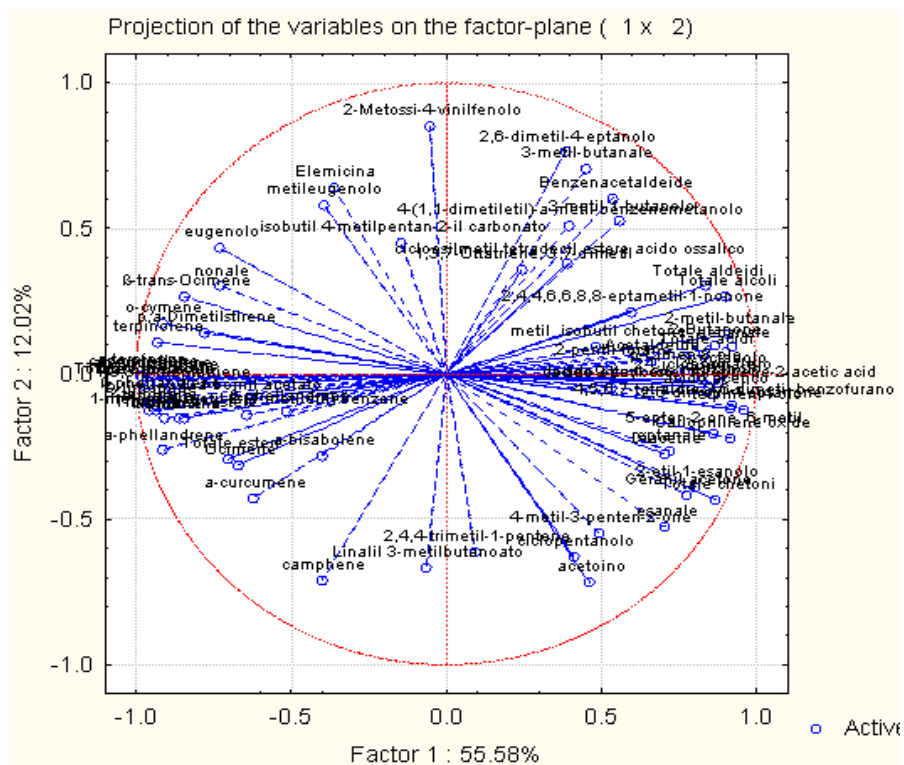


**Figura 32:** Proiezione delle variabili sul piano fattoriale (1 x 2) che hanno portato alla clusterizzazione dei campioni di latte di soia fermentato.

In Figura 33 è riportata la proiezione dei casi sul piano fattoriale (1 x 2) relativa ai campioni del succo di carota. In questo caso i campioni sono risultati molto differenti tra loro sia in funzione del lattococco considerato che del tempo di conservazione. In particolare, i ceppi sono risultati differenti tra loro ad ogni tempo di conservazione prevalentemente lungo la componente principale 2, che spiega il 12.02% della varianza. Mentre i campioni ai diversi tempi di conservazione sono risultati separati tra loro lungo la componente principale 1, che spiega il 55.58% della varianza. La proiezione delle variabili che hanno permesso la clusterizzazione nello spazio dei campioni lungo il piano fattoriale (1-2) sono riportate in Figura 34. In questo caso, la clusterizzazione dei succhi fermentati con i ceppi LBG2 e 3LC39 era principalmente legata alla presenza di chetoni come diacetile e acetoino. Al contrario la clusterizzazione dei campioni fermentati con il ceppo FBG1P era legata ad una maggiore presenza di aldeidi e alcoli.



**Figura 33:** Analisi del profilo in molecole volatili di latte di soia fermentato mediante analisi delle componenti principali (PCA). Proiezione dei casi sul piano fattoriale.



**Figura 34:** Proiezione delle variabili sul piano fattoriale (1 x 2) che hanno portato alla clusterizzazione dei campioni di latte di soia fermentato.



# CAPITOLO 6

## Conclusioni

Come sottolineato in precedenza bevande vegetali come latte di soia e succo di carota, a causa dell'elevato valore nutrizionale associato a valori di pH elevati, possono favorire la crescita di un'ampia gamma di microorganismi sia degradativi che patogeni. Attualmente la stabilizzazione e quindi la sicurezza microbiologica di queste tipologie di prodotti può essere perseguita solamente con trattamenti termici molto spinti (sterilizzazione o pastorizzazione ad elevate temperature) che comportano un decremento delle caratteristiche reologiche, organolettiche e nutrizionali dei prodotti. Tuttavia, l'attenzione e l'interesse da parte del consumatore verso prodotti sempre più naturali con caratteristiche nutrizionali simili alla materia prima, hanno stimolato la ricerca di tecnologie alternative in grado di stabilizzare questi prodotti, da un punto di vista microbiologico, chimico fisico, organolettico e nutrizionale. Tra queste alternative, un'ampia letteratura evidenzia come pre-fermentazioni guidate da batteri lattici possano ridurre significativamente sia microorganismi degradativi naturalmente presenti nella matrice che deliberatamente inoculati in succhi di frutta e/o vegetali o puree.

I risultati della mia tesi hanno evidenziato le buone potenzialità di tre ceppi di *Lactococcus lactis* produttori di nisina (LBG2, FBG1P e 3LC39) come agenti di fermentazione di latte di soia e succo di carota.

Su entrambe le matrici alimentari i tre lattococchi utilizzati hanno mostrato delle rapide cinetiche di crescita e, di conseguenza, di acidificazione del prodotto. Inoltre, tutti i ceppi sono stati in grado di produrre nisina durante il processo fermentativo a 20 °C. Infatti, tutti i lattococchi sono stati in grado di portare ad una rapida acidificazione del succo di carota a valori vicino a 4.0 dopo sole 24h, ciò combinato con la produzione di nisina che ha portato ad un significativo effetto anti-*Listeria*. Infatti, nei challenge test eseguiti in presenza del patogeno è stata ottenuta una disattivazione completa di *Listeria monocytogenes* entro le 48h di fermentazione a 20 °C. Anche in latte di soia è stata osservata una notevole attività anti-*Listeria* da parte dei lattococchi considerati; tuttavia in questo caso la cinetica di acidificazione è risultata più lenta rispetto a quanto osservato in succo di carota e quindi

l'effetto nei confronti del patogeno considerato è risultato inferiore. Inoltre, solo il ceppo LBG2, che d'altra parte è risultato quello che ha portato ad una più rapida acidificazione e ad una maggiore produzione di nisina, è stato in grado di inibire completamente *Listeria monocytogenes* dopo 72h di stoccaggio a 20 °C. Questo risultato è molto importante in quanto la rapida acidificazione e l'inibizione di microrganismi patogeni sono aspetti fondamentali per la shelf-life e la sicurezza microbiologica del prodotto.

Inoltre, tutti i lattococchi impiegati hanno portato a specifici profili in molecole volatili in base alla matrice, al ceppo e al tempo di conservazione considerato. La fermentazione con i lattococchi ha incrementato la presenza di molecole quali aldeidi e chetoni molto importanti e con impatto positivo sul profilo organolettico del prodotto fermentato. Infatti, uno dei principali limiti dei latti vegetali è proprio l'aroma del prodotto sterilizzato che rappresenta il principale motivo di rifiuto da parte del consumatore. Anche in succo di carota è stato osservato un incremento di molecole volatili come esteri, aldeidi e chetoni a buon impatto organolettico nei prodotti fermentati con i lattococchi produttori di nisina utilizzati in questa sperimentazione. Inoltre, il processo fermentativo ha permesso una riduzione quantitativa di molecole anti-nutrizionali presenti in succo di carota quali elemicina e miristicina.

Concludendo i risultati della mia tesi indicano come l'impiego di ceppi produttori di batteriocine per la fermentazione di succhi vegetali rappresenti una buona strategia, alternativa ai trattamenti termici, per la stabilizzazione microbiologica di questi prodotti. Inoltre, questi risultati evidenziano anche le buone potenzialità dei ceppi impiegati per il miglioramento del profilo organolettico del prodotto finito rispetto a quello ottenuto con la stabilizzazione termica. Pertanto, sebbene i risultati ottenuti siano estremamente interessanti, ulteriori sperimentazioni sono necessarie per stabilire l'accettabilità da parte del consumatore del prodotto fermentato e per valutare la reale shelf-life del prodotto così ottenuto. Inoltre, un possibile miglioramento di questa tecnologia potrebbe essere quello di combinarla con altre tecnologie di stabilizzazione non termiche, quali le alte pressioni di omogeneizzazione che potrebbero ulteriormente incrementare l'effetto sulla stabilità microbiologica e migliorare le caratteristiche reologiche dei succhi ottenuti.

## Bibliografia

- Abee, T. (1995). *Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and selfprotection mechanisms of producer organism*. FEMS Microbiology Letters 129,1-9.
- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995). *Bacteriocins: Modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning*. International Journal of Food Microbiology 28, 169-85.
- Adlercreutz, H. (2002). *Phyto-oestrogens and cancer*. Oncology 3, 364–373.
- Aktypis, A., Kalantzopoulos, G. (2003). *Purification and characterization of thermophilin ST-1, a novel bacteriocin produced by Streptococcus thermophilus ACA-DC 0001*. Lait 83, 365-378.
- Alklint C., Wadsö, L., Sjöholm, I. (2004). *Effects of modified atmosphere on shelf-life of carrot juice*. Food Control 15, 131–137.
- Aryani, D.C., den Besten, H.M., Hazeleger, W.C., Zwietering, M.H. (2015). *Quantifying strain variability in modeling growth of Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 208, 19-29.
- Ashwani, K.G., Rajinder, K., Satwinder, S.M. (2007). *Postharvest Management and Value Addition*. PRIORITY BOOKS (Springfield, VA, U.S.A.).
- Bahl, O.P., Agrawal, K.M.L. (1969). *Glycosidases of Aspergillus niger I. PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF  $\alpha$ - AND  $\beta$ -GALACTOSIDASES AND  $\beta$ -N-ACETYLGLUCOSAMINIDASE*. Journal Biology Chemistry 244, 970.
- Balciunas, E.M., Castillo A.F., Svetoslav, M., Todorov, D., Gombossy, B.D., de Melo, F., Converti A., Pinheiro R. (2007). *Novel biotechnological application of bacteriocins: A review*. Food Control 32, 134-142.
- Balciunas, E.M., Martinez, F.A.C., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M., Converti, A., Olivera, R.P.D. (2013). *Novel biotechnological application of bacteriocins: A review*. Food Control 32, 134-142.
- Beasley, S., Tuorila, H., Saris, P.E.J. (2003). *Fermented soymilk with a monoculture of Lactococcus lactis*. International Journal of Food Microbiology 81 159– 162.

- Benkerroum, N., Oubel, H., Mimoun, L.B. (2002). *Behaviour of Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in yogurt fermented with a bacteriocin-producing thermophilic starter*. Journal of Food Protection 65, 799-805.
- Beresford, T.P., Fitzsimons A.N., Brennan L.N., Cogan T.M. (2001). *Recent advantage in cheese microbiology*. International Dairy Journal 11, 259-274.
- Berry, E.D., Liewen, M.B., Mandigo, R.W., Hutkins, R.W. (1990). *Inhibition of Listeria monocytogenes by bacteriocin-producing Pediococcus during the manufacture of fermented semidry sausage*. Journal of Food Protection 53, 194-197.
- Bevilacqua, A., Corbo M.R., Sinigaglia M. (2012). *Use of natural antimicrobials and high-pressure homogenization to control the growth of Saccharomyces bayanus in apple juice*. Food Control, 24, 109-115.
- Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. (1987). *Direct detection of an antimicrobial peptide of Pediococcus acidilactici in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 2, 319-322.
- Bierbaum, G., Sahl H.G. (2009). *Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering*. Current Pharmaceutical Biotechnology 10, 2-18.
- Blauer, S. (1989). *The Juicing Book: A Complete Guide to the Juicing of Fruits and Vegetables for Maximum Health* (Avery Health Guides). Penguin. 302-309.
- Bolotin, A., (2001). *The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. Lactis IL 1403*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 5, 731–753.
- Boman, H.G. (1995). *Peptide antibiotics and their role in innate immunity*. Annual Review of Immunology 13, 61-92.
- Boman, H.G. (1996). *Peptide antibiotics: holy or heretic grail of innate immunity?* Scandinavian Journal of Immunology 43, 475-482.
- Breukink, E., Kruijff, B. (2006). *Lipid II as a target for antibiotics*. Nature Review Drug Discovery 5, 321-332.
- Breukink, E., Wiedemann, I., Van Kraaij, C., Kuipers, O.P., Sahl, H.G., Kruijff, B. (1999). *Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic*. Science 286, 2361-2364.

- Briñez, W.J., Roig-Sagués, A.X., Hernández Herrero, M.M., Guamis López, B. (2006a). *Inactivation of Listeria innocua inoculated into milk and orange juice using ultrahigh-pressure homogenization*. Journal of Food Protection 69, 86–92.
- Briñez, W.J., Roig-Sagués, A.X., Herrero H., M.M., López, B.G. (2006b). *Inactivation by ultrahigh-pressure homogenization of Escherichia coli strains inoculated into orange juice*. Journal of Food Protection 69, 984–989.
- Buruleanu, L.V., Bratu, M.G., Manea, I., Avram, D., Nicolescu, C.L. (2013). *Fermentation of Vegetable Juices by Lactobacillus Acidophilus LA-5*. Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes, Dr. J. Marcelino Kongo (Ed.), InTech.
- Cagnoni, D. (1948). *Per il riconoscimento ufficiale del centro Studi per la coltura ed industria della soia sorto in Provincia di Padova*. Padova: Tip. Messagero.
- Calbom, C., (2010). *The Juice Lady's Turbo Diet: Lose Ten Pounds in Ten Days—the Healthy Way* Paperback.
- Callou, K.R.D.A., Sadigov S., Lajolo F.M., Genovese, M.I. (2010). *Isoflavones and Antioxidant Capacity of Commercial Soy-Based Beverages: Effect of Storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58, 4284–4291.
- Cheigh, C.I., Choi, H.J., Park, H., Kim, S.B., Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K., Pyun, Y.R. (2013). *Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. lactis A164 isolated from kimchi*. Journal of Biotechnology 95, 225-235.
- Cheigh, C.I., Pyun, Y.R. (2005). *Nisin biosynthesis and its properties*. Biotechnology. Biotechnology Letters 27, 1641-1648.
- Chen, H., Hoover, D.G. (2003). *Bacteriocins and their food applications*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2, 83-100.
- Chung, K.T., Dickson, J.S., Crouse, J.D. (1989). *Effects of nisin on growth of bacteria attached to meat*. Applied and Environmental Microbiology 55, 1329-1333.
- Clark, S., Winter, C.K. (2015). *Diacetyl in Foods: A Review of Safety and Sensory Characteristics*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 14, 634-643.

- Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F., Chikindas, M.L. (2001). *Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation*. International Journal of Food Microbiology 71, 1-20.
- Collins, B., Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2010). *Application of lactic acid bacteria-produced bacteriocins*. In F.Mozzi, R.R. Raya, G.M. Vignolo. Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications 89-109.
- Cotter, P.D., Hill, C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology 3, 777–788.
- Dal Bello, B., Cocolin, L., Zeppa, G., Des Field, D., Cotter, P., Hill, C. (2012). *Technological characterization of bacteriocin producing Lactococcus lactis strains employed to control Listeria monocytogenes in Cottage cheese*. International Journal of Food Microbiology 153, 58-65.
- de Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., Vessoni Penna, T.C. (2009). *Nisin Biotechnological production and application: a review*. Trends in Food Science & Technology 20, 146-154.
- De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1991). *Influence of the carbon source on nisin production in Lactococcus lactis subsp. lactis batch fermentations*. Journal of General Microbiology 138, 571-578.
- Dede, S., Alpas, H., Bayindirli, A. (2007). *High hydrostatic pressure treatment and storage of carrots and juices: Antioxidant activity and microbial safety*. Journal of the Science of Food and Agriculture 87, 773–872.
- Deep, G.A. Bansal V.K., Babu V., Maithil, N. (2013). *Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (Myristica fragrans Houtt)*. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 11, 25–31.
- Delves-Broughton, J. (1990). *Nisin and its application as a food preservative*. Journal of the society of Dairy Technology 43, 73-76.
- Delves-Broughton, J. (2005). *Nisin as a food preservative*. Food Australia 57, 525-527.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. (1996). *Applications of the bacteriocin, nisin*. Antonie van Leeuwenhoek 69, 193-202.

- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., Gobbetti, M. (2013). *Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation*. Food Microbiology 33, 1-10.
- Diels, A. M., De Taeye, J., Michiels, C.W. (2005). *Sensitisation of Escherichia coli to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenisation*. International Journal of Food Microbiology 105, 165–175.
- Drider, D., Fimland G., Hechard Y., Mnmullen L.M., Prevost H. (2006). *The continuing story of class IIa bacteriocins*. Microbiology and Molecular Biology Reviews 70, 564-582.
- Drider, D., Rebuffat S., (2011). *Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications*, Springer, 451 p.
- Drosinos, E.H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M., Metaxopoulos, J. (2005). *Growth and bacteriocin production Kinetics of Leuconostoc mesenteroides E131*. Journal of Applied Microbiology 99, 1314-1323.
- Engelke, G., Gutowski-Eckel, Z., Kiesau, P., Siegers, K., Hammelmann, M., Entian, K.D., (1994). *Regulation of nisin biosynthesis and immunity in Lactococcus lactis 6F3*. Applied and Environmental Microbiology 60, 814-825.
- Evrendilek, G.A., Zhang, Q.H., Richter, E.R., (1999). *Inactivation of Escherichia coli O157: H7 and Escherichia coli 8739 in apple juice by pulsed electric fields*. Journal of Food Protection 62, 793–796.
- Felberg, I., Antoniassi, R., Deliza, R., Sidinea Cordeiro de Freitas, Della Modesta, R.C. (2009). *Soy and Brazil nut beverage: processing, composition, sensory, and color evaluation*. Ciência e Tecnologia de Alimentos ISSN 0101-2061.
- Ferragut, V., Valencia-Flores, D.C., Pérez-González, M., Gallardo, J., Hernández-Herrero, M. (2015). *Quality Characteristics and Shelf-Life of Ultra-High Pressure Homogenized (UHPH) Almond Beverage*. Foods 4, 159-172.
- Fimland, G., Johnsen, L., Dalhus, B., Nissen-Meyer, J. (2005). *Pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) and their immunity proteins: biosynthesis, structure and mode of action*. Journal of Peptide Science 11, 688-696.
- Garneau, S., Martin, N.I., Vederas, J.C. (2002). *Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. Biochimie 84, 577-592.

- Garro, M.S., de Valdez, G.F., Oliver, G. (1996). *Purification of  $\alpha$ -galactosidase from *Lactobacillus fermentum**. *Journal Biotechnology* 45, 103-109.
- Garro, M.S., Savoy de Giori, G. (2012). *Soy milk Fermentation and Enzymes Production*. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*.
- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C., Degraeve, P. (2016). *Nisin as a Food Preservative: Part 1: Physicochemical Properties, Antimicrobial Activity, and Main Uses*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 56, 1262-1274.
- Gillor, O., Kirkup, B.C., Riley, M.A., (2004). *Colicins and microcins: the next generation antimicrobials*. *Advances in Applied Microbiology* 54, 129-146.
- Gratia, A., (1925). *Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille*. *C. R. Soc. Biol.* 93: 1040-1042.
- Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H.G. (2000). *Post-translationally modified bacteriocins-the lantibiotics*. *Biopolymers* 55, 62-73.
- Hasper, H.E., Kramer, N.E., Smith, J.L., Hillman, J.D., Zachariah, C., Kuipers, O.P., de Kruijff, B., Breukink, E. (2006). *An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II*. *Science* 313, 1636-7.
- Hayakawa, K.; Mizutani, J., Wada, K., Masai, T., Yoshihara, I., Mitsuoka, T. (1990). *Effects of soybean oligosaccharides on human faecal flora*. *Journal Microbial Ecology in Health and Disease* 3, 293-303.
- Helander, I.M., von Wright, A., Mattila-Sandholm, T-M. (1997). *Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials Gram-negative bacteria*. *Trends Food Science and Technology* 8, 146-150.
- Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R., Mattick, A.T.R. (1951). *A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in Swiss-type cheese by a nisin-producing streptococcus*. *Journal of Dairy Research* 18, 205-206.
- Ho, V.T.T., Lo, R., Bansal, N., Turner, M.S. (2018). *Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese*. *Food Control* 85, 472-483.



- Holzapfel, W.H. (2002). *Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries*. International Journal of Food Microbiology 75, 197–212.
- Houska, M., Strohalm, J., Kocurová, K., Totusek, J., Lefnerova, D., Triska, J., Vrchotova, N., Fiedlerova, V., Holasova, M., Gabrovska, D., Paulickova, I., (2006). *High pressure and foods—fruit/vegetable juices*. Journal of Food Engineering 77, 386–398.
- Hugas, M., Garriga, M., Pascual, M., Aymerich, M.T., Monfort, J.M. (2002). *Enhancement of sakacin K activity against Listeria monocytogenes in fermented sausage with pepper or manganese as ingredients*. Food Microbiology 19, 519-528.
- Hugas, M. Garriga, M., Aymerich, M.T., Monfort, J.M. (1995). *Inhibition of Listeria in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic Lactobacillus sake CTC494*. Journal of Applied Bacteriology 79, 322-330.
- Hui, Y.H. (2012). *Food Biochemistry and Food Processing*. Wiley-black well.
- James, M., Loessner, Martin J., Golden, David A. (2009). *Microbiologia degli alimenti*. Springer-Verlag Mailand.
- Jorge, V., Fregene, M.A., Duque, M.C., Bonierbale, M.W., Tohme, J., Verdier, V. (2000). *Genetic mapping of resistance to bacterial blight disease in cassava (Manihot esculenta Crantz)*. Theoretical and Applied Genetics 101, 865-872.
- Kaiser, A.L., Montville, T.J. (1996). *Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against Listeria monocytogenes Scott A cells and lipid vesicles*. Applied and Environmental Microbiology 62, 4529-4535.
- Kaneko, S., Kumazawa K., Nishimura, O. (2011). *Studies on the Key Aroma Compounds in Soy Milk Made from Three Different Soybean Cultivars*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59, 12204–12209.
- Karovičová, J., Kohajdová, Z. (2003). *Lactic acid fermented vegetable juices*. Horticultural Science 30, 152–158.
- Kawai, Y., Ishii Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J. (2004). *Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequence produced by lactobacilli*. Applied and Environmental Microbiology 70, 2906-2911.

- Kekessy, D.A., Piguet, J.D. (1970). *New method for detecting bacteriocin production*. Journal of Applied Microbiology 20, 282-283.
- Kim, G.H., Yun, K.E., Kim, J.J. (1998). *Effect of heat treatment on the decay resistance and the bending properties of radiata pine sapwood*. Material und Organismen 32, 101-108.
- Kim, W.S., Hall, R.J., Dunn, N.W. (1997). *The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology 48, 449-453.
- Kjeldsen, F., Lars, P.C., Edelenbos, M. (2003). *Changes in Volatile Compounds of Carrots (Daucus carota L.) During Refrigerated and Frozen Storage*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 5400-5407.
- Klaenhammer, T.R. (1993). *Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. FEMS Microbiology Reviews 12, 39-86.
- Klein, C., Entian, K.D. (1994). *Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by Bacillus subtilis ATCC6633*. Applied and Environmental Microbiology 60, 2793- 801.
- Klijn, N., Weerkamp, A.H.E. de Vos, W.M. (2005). *Detection and characterization of lactose-utilizing Lactococcus spp. In natural ecosystems*. Applied and Environmental Microbiology 61, 788-792.
- Kudou, S., Fleury, Y., Welte, D., Magnolato, D., Uchida, T., Kitamura, K., Okubo, K. (1991). *Malonyl isoflavone glycosides in soybeans seeds (Glycine max (L.) Merrill)*. Agricultural and Biological Chemistry 55, 2227-2233.
- Kumar, S., Thippareddi, H., Subbiah, J., Zivanovic, S., Davinson, P.M., Harte, F. (2009). *Inactivation of Escherichia coli K-12 in apple juice using combination of highpressure homogenization and chitosan*. Journal of Food Science 74, 8–14.
- Kun, S., Rezessy-Szabò, J.M., Nguyen, Q.D., Hoschke, A. (2008). *Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains*. Process Biochemistry 43, 816–821.

- Leroy, F., De Vuyst, L. (1999). *The presence of salt and a curing agent reduces bacteriocin production by Lactobacillus sakei CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation*. Applied and Environmental Microbiology 65, 5350-5356.
- Leverentz, B., Conway, W.S., Camp, M.J., Janisiewicz, W.J., Abuladze, T., Yang, M., Saftner, R., Sulakvelidze, A. (2003). *Biocontrol of Listeria monocytogenes on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin*. Applied Environment Microbiology 69, 4519–4526.
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., Ouyang, F. (2002). *Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by Lactococcus lactis using response surface methodology*. Journal of Biotechnology 93, 27–34.
- Lindgren, S., Clevstrom, G. (1978). *Antibacterial activity of lactic acid bacteria. 2. Activity in vegetable silages, Indonesian fermented foods and starter cultures*. Swedish Journal of Agricultural Research 8, 67-73.
- Lozano, P.R., Drake, M., Benitez, D., Cadwallader, K.R. (2007). *Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55, 3018-3026.
- Mantovani, H.C., Russel, J.B. (2001). *Nisin resistance of Streptococcus bovis*. Applied and Environmental Microbiology 67, 808-813.
- Martin-Cuesta, M.C., Requena, T., Pelaez, C. (2001). *Use of bacteriocin-producing transconjugant as starter in acceleration of cheese ripening*. International Journal of Food Microbiology, 70, 79-88.
- Masai, T., Wada, K., Hayakawa, K. (1987). *Effects of soybean oligosaccharides on human intestinal flora and metabolic activities*. Japanese Journal of Bacteriology 42, 313-29.
- Mauro, C.S.I., Guergoletto, K.B., Garcia, S. (2016). *Development of Blueberry and Carrot Juice Blend Fermented by Lactobacillus reuteri LR92*. Beverages 2, 37.
- Mayr-Harting, A., Hedges, A.J., Berkeley, R.C.W. (1972). *Methods for studying bacteriocins*. In Methods in Microbiology ed. Norris, J.R. and Ribbons, D.W. pp. 315–342. New York: Academic Press.

- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C. (2001). *Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action*. FEMS Microbial Reviews 25, 285-308.
- Modi, K.D., Chikindas, M.L., Montville, T.J. (2000). *Sensitivity of nisin-resistant Listeria monocytogenes to heat and the synergistic action of heat and nisin*. Letters in Applied Microbiology 30, 249-253.
- Moll, G., Ubbink-Kok, T., Hildeng-Hauge, H., Nissen-Meyer, J. et al., (1996). *Lactocin G is a potassium ion-conducting, two component bacteriocin*. Journal of Bacteriology 178, 600-605.
- Moll, G.N., Konings, W.N., Drissen, A.J.M. (1999). *Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation*. Antonie van Leeuwenhoek 76, 185-198.
- Morgan, S.M., Ross, R.P., Beresford, T., Hill, C. (2000). *Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of Staphylococcus and Listeria*. Journal of Applied microbiology 88, 414-420.
- Morris, S.L., Walsh, R.C., Hansen, J.N. (1984). *Identification and characterization of some bacterial membrane sulfhydryl groups which are targets of bacteriostatic and antibiotic action*. Journal of Biological Chemistry 201, 581-4.
- Mulders, J.W., Boerrigter, I.J., Rollema, H.S., Siezen, R.J., Vos, W.M. (1991). *Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant*. European Journal of Biochemistry 201, 581-584.
- Narasimhan, B., Dhake, A.S. (2006). *Antibacterial Principles from Myristica fragrans Seeds*. Journal of Medicinal Food 9, 395–399.
- Naziri, E., Koupantsis, T., Mantzouridou, F.T., Paraskevopoulou, A., Tsimidou, M.Z., Kiosseoglou, V. (2017). *Influence of thermal treatment on the stability of vegetable “milk” obtained by ultrafiltration of aqueous oil body extracts from various sources*. European Journal of Lipid Science and Technology 119, 1600362.
- Nes, I.F., Diep, D.B., Havarstein, L.S., Brurberg, M.B. (1996). *Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria*. Antonie van Leeuwenhoek 70, 113-128.
- Ness, I.F., Holo, H. (2000). *Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria*. Biopolymers 55, 50-61.

- Nissen-Meyer, J., Havarstein, L.S., Holo, H., Sletten, K., Nes, I.F. (1993b). *association of the lactococcal A immunity factor with the cell membrane: purification and characterization of the immunity factor*. Journal of general microbiology 139, 1503-1509.
- O’Sullivan, L., Morgan, S.M., Ross, R.P., Hill, C. (2002). *Elevated enzyme release from lactococcal starter cultures on exposure to the lantibiotic lactacin 481 produced by Lactococcus lactis DPC5552*. Journal of Dairy Science 85, 2130-2140.
- O’Sullivan, L., Ross, R.P., Hill, C. (2002). *Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality*. Biochimie 84, 593–604.
- Omar, N.B., Abriouel, H., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Guyot, J.P., Gálvez, A. (2006). *Isolation of bacteriocinogenic Lactobacillus plantarum strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso*. International Journal of Food Microbiology 112 44–50.
- Omoni, A.O., Aluko R.E. (2005). *The anti-car- cinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review*. Trends in Food Science & Technology 16, 344–350.
- Oren, Z., Shai, Y. (1999). *Mode of action of linear amphipathic  $\alpha$ -helical antimicrobial peptide*. Biopolymers 47, 451-463.
- Outchma, T., Keller, S., Stuart, C., Parisi, B. (2004). *Ultraviolet disinfection of juice products in laminar and turbulent flow reactors*. Innovative Food Science & Emerging Technology 5, 179–189.
- Ouwehand, A.C., Vesterlund, S. (2004): *11 Antimicrobial components from lactic acid bacteria*. In: Salminen S, Ouwehand A, von Wright A (eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbial and Functional Aspects, 3rd ed*. Marcel Dekker, New York. 375–395.
- Parente, E., Riccardi, A. (1999). *Production, recovery and Purification of bacteriocins from lactic acid bacteria*. Applied Microbiology and Biotechnology, 52, 628-638.
- Park, K.J., Zdenka, V., Brod, F.P.R. (2002). *Evaluation of drying parametres and desorption isotherms of garden mint leaves*. Journal of Food Engineering 51, 193-199.
- Pathanibul, P., Taylor, T.M., Davidson, P.M., Harte, F. (2009). *Inactivation of Escherichia coli and Listeria innocua in apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin*. International Journal of Food Microbiology 129, 316–320.

- Patrignani, F., Vannini, L., Kamdem, S.L.S., Lanciotti, R., Guerzoni, M.E. (2009). *Effect of high pressure homogenization on Saccharomyces cerevisiae inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices*. International Journal of Food Microbiology 136 26–31.
- Peschel, A., Gotz, F. (1996). *Analysis of the Staphylococcus epidermidis genes epi F, -E, and -G involved in epidermin immunity*. Journal of Bacteriology 178, 531-536.
- Pferschy-Wenzig, E.M., Getzinger, V., Kunert, O., Woelkart, K., Zahrl, J., Bauer, R. (2009). *Determination of falcarinol in carrot (Daucus carota L.) genotypes using liquid chromatography/mass spectrometry*. Food Chemistry 114, 1083–1090.
- Poliseli-Scope, F.H., Gallardo-Chacón, J.J., Juan, B., Guamis, B., Ferragut, V. (2013). *Characterisation of volatile profile in soymilk treated by ultra-high pressure homogenisation*. Food Chemistry 141, 2541–2548.
- Pollot, P.J. (2010). *Lymphedema: Finding the Holistic Approach*. Dog Ear Publishing, LLC.
- Potter, A.S., Foroudi, S., Stamatikos, A., Patil, B.S., Deyhim, F. (2011). *Drinking carrot juice increases total antioxidant status and decreases lipid peroxidation in adults*. Nutrition Journal 10, 96.
- Potter, R.M., Dougherty, M.P., Haltemanc, W.A., Camire, M.E. (2007). *Characteristics of wild blueberry–soy beverages*. LWT- Food Science and Technology 40, 807–814.
- Raffi, V., Ossiprandi, M.C. (2006). *Bacteriocine: evoluzione ecologica ed applicazioni pratiche*. Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma. 26: 235-246.
- Ray, B., Daeschel, M. A. (1992). *Food biopreservatives of microbial origin*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Reis, M., Eschbach-Bludau, M., Iglesias-Wind, M.I., Kupke, T., Sahl, H.G. (1994). *Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene pepI and localization and functional analysis of its gene product*. Applied Environment Microbiology 60, 2876-83.
- Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002). *Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives*. Biochimie 84, 357-364.

- Rink, R., Kluskens, L.D., Kuipers, A., Driessen, A.J., Kuipers, O.P., Moll, G.N. (2007). *NisC, the cyclase of the lantibiotic nisin, can catalyze cyclization of designed nonlantibiotic peptides*: *Biochemistry* 46, 13179–13189.
- Rohani, S.M.R., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S.S., Griffiths, M.W. (2011). *The effect of nisin and garlic (Allium sativum L.) essential oil separately and in combination on the growth of Listeria monocytogenes*. *Food Science and Technology* 44, 2260-2265.
- Rollema, H.S., Kuipers, O.P., Both, P., de Vos, W.M., Siezen, R.J. (1995). *Improvement of Solubility and Stability of the Antimicrobial Peptide Nisin by Protein Engineering*. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2873–2878.
- Ross, R.P., Morgan, S., Hill, C. (2002). *Preservation and fermentation: past, present and future*. *International Journal of Food Microbiology* 79, 3-16.
- Ross, R.P., Stanton, C., Hill, C., Fitzgerald, G.F., Coffey, A. (2000). *Novel culture for cheese improvement*. *Trends in Food Science and Technology* 11, 96-104.
- Sahl, H.G. (1991). *Pore formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics, in: Jung G & Sahl H-G (Eds) Nisin and novel lantibiotics*. ESCOM Science, Leiden 347–358.
- Sahl, H.G., Jack, R.W., Bierbaum, G. (1995). *Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications*. *European Journal of Biochemistry* 230, 827-853.
- Salama, M., Sandine, W., Giovannoni, S. (1991). *Development and application of oligonucleotide probes for identification of Lactococcus lactis subsp cremoris*. *Applied Environment Microbiology* 57, 1313-1318.
- Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D. (2002). *Bacteriocin production by Enterococcus faecium FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek feta cheese making*. *International Journal of Food Microbiology* 72, 125-136.
- Saris, P.E.J., Immonen, T., Reis, M., Sahl, H.G. (1996). *Immunity to lantibiotic*. *Antonie van Leeuwenhoek* 69, 151-159.
- Scannell, A.G.M., Ross, R.P., Hill, C., Arendt, E.K. (2000a). *An effective lactacin biopreservative in fresh pork sausage*. *Journal of Food Protection* 63, 370-375.

- Schieber, A., Stintzing, F.C., Carle, R. (2001). *By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments*. Trends in Food Science & Technology 12, 401–405.
- Schillinger, U., Geisen, R., Holzapfel, W.H. (1996). *Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods*. Trends in Food Science & Technology 7, 158-164.
- Setchell, K.D., Cassidy, A. (1999). *A Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health*. Journal of Nutrition 129, 758S-767S.
- Settanni, L., Corsetti, A. (2008). *Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation*. International Journal of Food Microbiology 121, 123–138.
- Sharma, (2016). *Food for Good Health*. Diamond Pocket Books Pvt Ltd.
- Sharma, K.D., Karki, S., Thakur, N.S., Attri, S. (2012). *Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review*. Journal of Food Science and Technology 49, 22–32.
- Sharma, R. (2005). *Improve Your Health with Carrot, Radish and Ginger*. Diamond Pocket Books.
- Shefet, S.M., Sheldon, B.W., Klaenhammer, T.R. (1995). *Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit Salmonella Typhimurium and extend shelf life of broiler carcasses*. Journal of Food Protection 58, 1077-82.
- Siergers, K., Entian, K.D. (1995). *Genes involved in immunity to the lantibiotic nisin produced by Lactococcus lactis 6F3*. Applied Environment Microbiology 61, 1082-1089.
- Simha, B.V., Sood, S.K., Kumariya, R., Garsa, A.K. (2012). *Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from Pediococcus pentosaceus NCDC 273 suitable for industrial application*. Microbiology Research 167, 544-549.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Parolin, C., Palomino, R.A.N., Vitali, B., Lanciotti, R. (2017). *Determination of Antibacterial and Technological Properties of Vaginal Lactobacilli for Their Potential Application in Dairy Products*. Frontiers in Microbiology 8, 166.



- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Tabanelli, G., Montanari, C., Gardini, F., Lanciotti, R. (2015). *Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce*. Food Microbiology 47, 74-84.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Vannini, L., Salvetti, E., Torriani, S., Gardini, F., Lanciotti, R. (2016). *Use of a nisin-producing Lactococcus lactis strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples*. Food Microbiology 54, 11-19.
- Sirtori, C.R., Galli, C., Anderson, J.W., Arnoldi, A. (2009). *Nutritional and nutraceutical approaches to dyslipidemia and atherosclerosis prevention: Focus on dietary proteins*. Atherosclerosis 1, 8-17.
- Snyder, A.B., Worobo, R.W. (2013). *Chemical and genetic characterization of bacteriocins: antimicrobial peptides for food safety*. Journal of the Science of Food and Agriculture 94, 28-44.
- Sorrells, K.M., Enigl, D.C., Hatfield, J.R. (1989). *Effect of pH, Acidulant, Time, and Temperature on the Growth and Survival of Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection 52, 571-573.
- Stratford, M., James, S.A. (2003). *Spoilage yeasts with emphasis on the genus Zygosaccharomyces, in Bockhout T Robert V, Yeasts in food, Beneficial and Detrimental Aspects, Hamburg, Behr's Verlag 171-187*.
- Stuart, M.R., Chou, L.S., Weimer, B.C. (1999). *Influence of Carbohydrate Starvation and Arginine on Culturability and Amino Acid Utilization of Lactococcus lactis subsp. lactis*. Applied and Environmental Microbiology 65, 665-673.
- Suzukit, K., Suzuki, Y. (1970). *Globoid Cell Leucodystrophy (Krabbe's Disease): Deficiency of Galactocerebroside  $\beta$ -Galactosidase*. Proceedings of the National Academy of Sciences.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. (1976). *Bacteriocins of gram-positive bacteria*. Bacteriological reviews 40, 722-56.

- Tamminen, M., Salminen, S., Ouwehand, A.C. (2013). Fermentation of carrot juice by probiotics: Viability and preservation of adhesion. *International Journal of Biotechnology* 2, 10–15.
- Terhaag, M.M., Almeida, M.B., Benassi, M.T. (2013). *Soy milk plain beverages: correlation between acceptability and physical and chemical characteristics*. *Food Science and Technology* 33, 2.
- Van Niel, E.W.J., Hahn-Hagerdal, B. (1999). *Nutrient requirements of lactococci in defined growth media*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 52, 617-627.
- Venema, K., Haverkort, R.E., Abee, T., Haandrikman, A.J., Leenhouts, K.J. de Leij, L., Venema, G., Kok, J. (1994). *Mode of action of LciA, the lactococcal A immunity protein*. *Molecular Microbiology* 14, 521-32.
- Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O. (1993). *Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by Enterococcus faecalis 226, active against Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 74, 380-387.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, J., Doucette, C., Fillmore, S., (2012). *Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts*. *AMB Express* 2, 48.
- Yang, R., Ray B. (1994). *Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria*. *Food Microbiology* 11, 281-91.
- Yoneyama, F., Imura, Y., Ohno, K., Zendo, T., Nakayama, J., Matsuzaki, K., Sonomoto, K. (2009). *Peptide-lipid huge toroidal pore, a new antimicrobial mechanism mediated by a lactococcal bacteriocin, lacticinQ*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 53, 3211–3217.
- Zacharof, M.P., Lovitt, R.W. (2012). *Bacteriocins produced by lactic acid bacteria*. *APCBEE Procedia* 2, 50-56.
- Zehra, G., Karaca, F., Yetisir, H. (2015). *Identification of volatile organic compounds (VOCs) in different colour carrot (Daucus carota L.) cultivars using static headspace/gas chromatography/mass spectrometry*. *Cogent Food & Agriculture* 1, 1117275.

- Zhang, Y., Liu, X.C., Wang, Y., Zhao, F., Sun, Z., Liao, X. (2015). *Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 33, 135–144.
- Zhao, L., Wang, S., Liu, F., Dong, P., Huang, W., Xiong, L., Liao, X. (2013). *Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17, 27–36.

## Sitografia

<sup>1</sup>Cfr:[http://www.nationalgeographic.it/food/2016/02/01/news/il delicato equilibrio del latte vegetale-2952620/?refresh ce](http://www.nationalgeographic.it/food/2016/02/01/news/il-delicato-equilibrio-del-latte-vegetale-2952620/?refresh_ce)

<sup>2</sup>Cfr:<https://www.ilgiardinodeilibri.it/speciali/bevande-vegetali-biologiche.php#>

<sup>3</sup>Cfr:<http://saperefood.it/5boom-di-bevande-vegetali-sempre-piu-latte-di-soia-riso-e-mandorle28/>

<sup>4</sup>Cfr:<http://www.lastampa.it/2016/06/03/scienza/benessere/dovete-sapere/il-boom-del-latte-alternativo-su-del-la-vendita-di-quello-a-base-di-soia-avena-riso-o-mandorla-nmmYZTQxQ3FD6SikVO0gvJ/pagina.html>

<sup>5</sup>Cfr:[http://www.repubblica.it/salute/alimentazione/2017/02/27/news/anatomia di una bevanda che sembra latte-159210298/](http://www.repubblica.it/salute/alimentazione/2017/02/27/news/anatomia-di-una-bevanda-che-sembra-latte-159210298/)

<sup>6</sup>Cfr:<http://www.italiafruit.net/DettaglioNews/34501/mercati-e-imprese/crescono-i-consumi-di-prodotti-a-base-vegetale>

<sup>7</sup>Cfr:[http://www.ansa.it/lifestyle/notizie/passioni/food wine/2017/06/01/di-cocco-e-di-noci-il-latte-vegetale-bio-e-animal-friendly-e-super-trend 344f14a4-a1da-4ee6-8a76-44429cac27b6.html](http://www.ansa.it/lifestyle/notizie/passioni/food_wine/2017/06/01/di-cocco-e-di-noci-il-latte-vegetale-bio-e-animal-friendly-e-super-trend_344f14a4-a1da-4ee6-8a76-44429cac27b6.html)

<sup>8</sup>Cfr:[http://www.ilmessaggero.it/expo\\_2015/bevande vegetali expo cooking show c hef stellati-1233316.html](http://www.ilmessaggero.it/expo_2015/bevande-vegetali-expo-cooking-show-c-hef-stellati-1233316.html)

<sup>9</sup>Cfr:<https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/dairy-alternatives-market>

<sup>10</sup>Cfr:<http://www.quidanoiblog.it/index.php/2017/01/25/succhi-di-frutta/>

<sup>11</sup>Cfr:[https://www.beverfood.com/documenti/simei-neri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009\\_zwd\\_9350/](https://www.beverfood.com/documenti/simei-neri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009_zwd_9350/)

<sup>12</sup>Cfr:[https://www.beverfood.com/documenti/simei-neri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009\\_zwd\\_9350/](https://www.beverfood.com/documenti/simei-neri-settore-succhi-nettari-frutta-mondo-2009_zwd_9350/)

<sup>13</sup>**Cfr:<https://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/februarymarch-2002/non-thermal-alternative-processing-technologies-for-the-control-of-spoilage-bacteria-in-fruit-juices-and-fruit-based-drinks/>**