

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

DIPARTIMENTO AGRICOLTURA , AMBIENTE E ALIMENTI



DOTTORATO DI RICERCA IN BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

XXVIII CICLO

Tutor: Elena Sorrentino
Dottoranda: Maria Folchi

Tesi di dottorato

Titolo:

**“RISPOSTA ALLO STRESS DA ETANOLO IN
LACTOBACILLUS PLANTARUM”**

Anno accademico 2014-2015

CAPITOLO 11
LACTOBACILLUS PLANTARUM	1
1.1 INTRODUZIONE	1
1.2 METABOLISMO	3
1.3 FERMENTAZIONE MALOLATTICA	5
1.4 EFFETTI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA	9
1.5 COLTURE STARTER PER LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA	10
APPLICAZIONI ALIMENTARI E SANITARIE DI LACTOBACILLUS PLANTARUM	12
CAPITOLO 2.....	17
FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA DEI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI E RISPOSTA AI FATTORI DI STRESS	17
2.1 INTRODUZIONE	17
FATTORI INTRENSECI	19
2.2.1 pH e potere tampone del mezzo	19
2.2.2 Attività dell'acqua	22
2.2.3 Potenziale di ossido-riduzione	25
2.2.4 Presenza o assenza di ossigeno	26
2.2.5 Composizione del mezzo	28
2.2.6 Struttura del mezzo	29
2.3 FATTORI ESTRINSECI	30
2.3.1 Temperatura	30
2.3.2 Umidità	33
2.4 FATTORI DI STRESS	34
2.4.1 Introduzione	34
2.4.2 Importanza della risposta allo stress dei batteri	41
2.4.3 Stress termico	41
2.4.4 Stress da freddo	43
2.4.5 Stress acido	46
2.4.6 Stress osmotico	48
2.4.7 Stress ossidativo	49
2.4.8 Stress da etanolo	50
CAPITOLO 3	57

MICROBIOLOGIA PREDITTIVA	57
3.1 INTRODUZIONE ALLA MICROBIOLOGIA PREDITTIVA	57
3.2 LA MODELLAZIONE DEI FENOMENI BIOLOGICI	58
3.3 MODELLI PRIMARI	59
3.3.1 Modellazione della crescita microbica	59
3.3.2 Modellazione dlla morte microbica	64
3.4 MODELLI SECONDARI	69
3.5 MODELLI TERZIARI: SOFTWARE E DATABASE	71
CAPITOLO 4.....	73
SCOPO DELLA TESI	73
CAPITOLO 5.....	75
MATERIALI E METODI	75
5.1 CAMPIONAMENTO	75
5.2 ANALISI CHIMICO-FISICHE	76
5.2.1 Determinazione del pH	76
5.2.2 Determinazione dell'acidità totale	76
5.2.3 Determinazione del grado alcolico	76
5.2.4 Determinazione dell'acido L-malico	76
5.2.5 Determinazione dell'acido L- lattico	77
5.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE	77
5.4 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA	78
5.4.1 Osservazione al microscopio ottico	78
5.4.2 Colorazione di gram	78
5.4.3 Saggio della catalasi	78
5.4.4 Studio del profilo assimilativo delle fonti di carbonio	79
5.5 IDENTIFICAZIONE GENETICA	79
5.5.1 Analisi PCR-DGGE	79
5.5.2 Estrazione ed amplificazione del DNA batterico	80
5.5.3 Analisi DGGE	82

5.5.4 Sequencing	83
5.6 BIOTIPIZZAZIONE DEI BATTERI	84
5.6.1 Analisi RAPD-PCR	84
5.7 VALUTAZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA DEI CEPPI <i>LB. PLANTARUM</i> IN CONDIZIONI DI STRESS	86
5.8 PRODUZIONE DI AMMINE BIOGENE	89
5.9 EFFETTO DELLA PRE-ESPOSIZIONE A DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI ETANOLO SULLA CRESCITA DI <i>LB. PLANTARUM SPP.</i>	93
5.10 EFFETTO DELL'ETANOLO SULLA SOPRAVVIVENZA DI <i>LB PLANTARUM SPP.</i>	94
5.11 VALUTAZIONE DEL PROFILO PROTEICO	94
5.11.1 Estrazione delle proteine totali	95
5.11.2 SDS-PAGE	95
5.11.3 Analisi delle immagini	96
CAPITOLO 6.....	97
RISULTATI	97
6.1 RISULTATI DELLE ANALISI CHIMICO FISICHE DEI VINI	97
6.2 RISULTATI ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE BATTERI	98
6.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA	99
6.4 IDENTIFICAZIONE GENOTIPICA	102
6.5 VALUAZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA DI CEPPI DI <i>LB PLANTARUM</i> IN CONDIZIONI DI STRESS	107
6.6 PRODUZIONE AMMINE BIOGENE	109
6.7 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA ED EFFETTO DELLA PRE-ESPOSIZIONE DI <i>LB PLANTARUM SPP.</i> IN PRESENZA DI ETANOLO	113
6.8 EFFETTO DELL'ETANOLO SULLA SOPRAVVIVENZA DI <i>LB PLANTARUM SPP.</i>	124
6.9 SDS-PAGE	131
CAPITOLO 7.....	134
CONCLUSIONI E DISCUSSIONI	134
BIBLIOGRAFIA	I

LACTOBACILLUS PLANTARUM

1.1 INTRODUZIONE

Lactobacillus plantarum è un batterio lattico appartenente al genere *Lactobacillus*. E' un batterio Gram-positivo a forma di bastoncino. In condizioni di anaerobiosi sviluppa sulla superficie dei terreni colturali formando colonie di circa 3 mm di diametro, rotondeggianti, bianche e compatte. Può crescere a temperature comprese tra 15 e 45°C ed a bassi livelli di pH intorno a 3.2 (Kleerebezem et al., 2003).

La molteplicità delle nicchie ambientali nelle quali è possibile ritrovare batteri ascrivibili ai lattobacilli si riflette nella diversità e nella filogenesi eterogenea del genere. Molte delle specie appartenenti a questo genere sono altamente specializzate e si trovano in un ristretto numero di nicchie ecologiche. Per esempio *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* si è adattato alle condizioni ambientali tipiche dei prodotti lattiero caseari ed è ampiamente utilizzato nella produzione dello yogurt (van de Guchte et al., 2006). La specie *Lb. iners* è considerata componente predominante del microbiota vaginale (Macklaim et al., 2011).

Lactobacillus plantarum a differenza di altri lattobacilli è in grado di colonizzare differenti nicchie ecologiche come il tratto gastrointestinale dei mammiferi, la saliva umana e diversi alimenti fermentati (Kostinek et al., 2005; Mathara et al., 2008; Tanganurat et al., 2009), quali impasti acidi (Reale et al, 2005; Catzeddu et al., 2006; van der Meulen et al., 2007; Reale et al., 2011), olive (Maldonado et al., 2002; Chamkha et al., 2008) verdure fermentate (Lu et al., 2003; Pérez Pulido et al., 2007; Plengvidhya et al., 2007; Seseña e Palop, 2007), insaccati fermentati (Ryopponen et al., 2002; Ammor e Mayo., 2007), formaggi (Coppola et al., 2003; Milesi et al.,

2008; Gómez-Ruiz et al., 2008), vino (Alegría et al., 2004; Spano e Massa, 2006; Testa et al., 2014) e insilati (Salimei et al., 2007).

Molti studi hanno dimostrato effetti probiotici di alcuni ceppi di *Lb. plantarum* e per questo vengono impiegati per lo sviluppo di alimenti terapeutici, funzionali e potenziali vaccini (de Vries et al., 2006; Siragusa et al., 2007; Shah et al., 2007, , Paolillo et al., 2009, Son et al., 2009, Wang et al., 2009 Carminati et al., 2010).

Il carattere ubiquitario di tale specie può essere attribuito sia allo spiccato vigore fermentativo, sia ad altre caratteristiche come l'elevata capacità acidificante, riscontrabile in tutti i ceppi, e la produzione di metaboliti dotati di attività antimicrobica. Ad esempio, molti ceppi sono in grado di inibire lo sviluppo di *Listeria monocytogens* (Mills et al., 2011).

Questo batterio, inoltre, tollera l'acidità e i sali biliari, così da sopravvivere al passaggio attraverso il tratto gastrointestinale di esseri umani. Possiede sei differenti pathways per la degradazione dell'arginina e ciascuno di essi determina la produzione di ossido nitrico, che è essenziale per alcune funzioni del tratto gastrointestinale come stimolazione delle difese immunitarie, secrezione del muco e motilità intestinale. *Lb. plantarum* è anche coinvolto nella produzione di nutrienti essenziali della mucosa, tra cui acidi grassi a corta catena (SCFA) ed aminoacidi come arginina, glutammina e cisteina (De Vries et al., 2005).

L'abilità di colonizzare diversi ambienti può essere attribuita al suo genoma, il quale è relativamente grande rispetto ad altre specie di *Lactobacillus*. Recenti studi come il sequenziamento completo del genoma di ceppi di *Lb. plantarum* WCFS1 (Kleerebezem et al., 2003; Siezen et al., 2012), JDM1 (Zhang et al., 2009) e ST-III (Wang et al., 2011) così come studi di genomica comparativa (Siezen e van Hylckama Vlieg, 2011) hanno rivelato dati interessanti rispetto all'architettura genomica di questo batterio. Il proteoma è stato ben caratterizzato (Cohen et al., 2006; Koistinen et al., 2007) e presenta variazioni significative da ceppo a ceppo (Koistinen et al., 2007). Inoltre c'è un alta diversità fenotipica e genotipica,

nonché una elevata versatilità e flessibilità metabolica tra diversi ceppi di *Lb. plantarum* (Bringel, 2005; Molenaar et al., 2005; Siezen et al., 2010; Siezen e van Hylckama Vlieg, 2011).

Questi studi hanno rivelato la gran complessità del genoma che nel caso del ceppo WCSG1è di 3,3x10⁶ bp, possiede circa 3000 geni che codificano per circa 320 proteine putative delle quali ne sono state identificate circa il 70% e molte delle quali sono coinvolte nel trasporto cellulare, infatti circa il 13% sono trasportatori o proteine di legame, 8% sono proteine con funzione regolativa, 8% sono coinvolte nel metabolismo energetico (Quatravaux et al., 2006). Il genoma ha 3 plasmidi extracromosomici e una regione chiamata “*lifestyle adaptation island*”, vicina all’origine della replicazione, che codifica per proteine implicate nel trasporto di zuccheri e nel loro metabolismo, e per proteine regolatrici. Questa regione genomica sarebbe particolarmente importante per l’adattamento ai diversi habitat in quanto responsabile della regolazione e sintesi degli enzimi coinvolti nell’utilizzo delle diverse fonti di carbonio e nelle interazione con l’ambiente (Molenaar et al., 2005; Siezen et al., 2010).

Inoltre, il genoma codifica due classi di regioni trasposasi, che si pensa possano codificare per elementi genetici mobili (Kleerebezem et al., 2003).

1.2 METABOLISMO

Lb. plantarum essendo eterofermentante facoltativo, possiede tutti gli enzimi delle vie metaboliche degli zuccheri e cioè sia quella omofermentativa sia quella eterofermentativa degli esosi, ma può anche utilizzare zuccheri a 5 atomi di carbonio come ribosio, attraverso la via dei pentosi fosfati (Quatravaux et al., 2006; Siezen et al., 2011). Tutti i ceppi fermentano dunque glucosio, fruttosio, saccarosio e numerosi altri monosaccaridi e disaccaridi fatta eccezione per l’arabinosio e lo xilosio che possono essere fermentati, ma non da tutti i ceppi. I prodotti finali del metabolismo sono rappresentati, oltre che dall’ATP, da acido lattico, etanolo o acido acetico, e anidride carbonica in determinate condizioni e substrati selettivi. In condizioni aerobiche, il

lattato viene convertito in acetato e una molecola di ATP per mezzo dell'enzima lattato deidrogenasi, piruvato ossidasi, e acetato chinasi. Oltre a produrre acetato, questo processo prevede come sottoprodotti il perossido di idrogeno e anidride carbonica. Il perossido di idrogeno si forma attraverso un processo Mn dipendente. La produzione di questo ossigeno porta a formazione di radicali liberi che possono inattivare altri batteri. Processi manganese-dipendente utilizzano il manganese come catalasi per abbassare la concentrazione di ossigeno, che è vantaggioso per il batterio aerotolleranti (Christensen et al., 1999). Inoltre, diversi studi hanno dimostrato la presenza di una fumarato-reduttasi (Kleerebezem et al., 2003).

Questa specie possiede anche una serie di pathway alternativi per metabolizzare acidi organici in carenza di zuccheri. Queste vie metaboliche sono estremamente importanti perché permettono a *Lb. plantarum* di sfruttare una serie di composti largamente presenti nel vino, tra questi l'acido citrico, il glicerolo, l'acido tartarico e soprattutto l'acido malico attraverso la fermentazione malolattica. Le altre reazioni di degradazione degli acidi organici sono invece considerate negative, dal punto di vista enologico, in quanto portano alla produzione di composti sgradevoli. Dal metabolismo dell'acido citrico si produce, infatti, acetoino e diacetile che provocano un eccessivo sentore di burro, il metabolismo dell'acido tartarico, invece, (acido organico maggiormente presente nel vino) ha un effetto negativo in quanto aumenta l'acidità volatile e riduce quella fissa, infine dal metabolismo del glicerolo (principale composto secondario prodotto dal metabolismo dei lieviti) si producono sostanze come l'acroleina che influiscono negativamente sulla qualità del vino. Infine il metabolismo dell'azoto può essere utilizzato da *Lb. plantarum* per ricavare energia diretta da alcuni aminoacidi in assenza di altri nutrienti, tra gli aminoacidi più presenti in vino ricordiamo l'alanina, glutammina, glutammato, arginina e prolina (>100 mg/l). Questo metabolismo viene molto studiato perché dalla degradazione degli aminoacidi alcuni batteri lattici tra cui *Lb. plantarum*, possono produrre le ammine biogene: basi

organiche a basso peso molecolare che ad alte concentrazioni provocano mal di testa, allergie, problemi respiratori e cardiaci.

Le più importanti amine biogene sono: istamina (dall'istidina), putrescina (da arginina o ornitina), tiramina (dalla tirosina). La più frequente in vino è la putrescina prodotta dall'arginina che è l'aminoacido maggiormente presente nel mosto.

In letteratura ci sono forti indicazioni che *Lb. plantarum* non sia tra i maggiori produttori di ammine biogene o comunque che ne produca in quantità decisamente inferiore rispetto ad altri batteri lattici (Moreno-Arribas et al., 2003; Arena et al., 2001; Spano et al., 2004). Questa caratteristica rende interessante la sua applicazione come starter malo lattico in quanto potrebbe condurre la fermentazione malolattica senza rischi di alterazioni dovute alla produzione di ammine biogene (generalmente sintetizzate da *Oenococcus oeni*, principale specie proposta come starter).

1.3 FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Il vino è il prodotto finale della fermentazione alcolica operata da lieviti, in questo ambiente particolarmente stressante diverse specie batteriche tra cui i batteri lattici, appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Oenococcus*, e batteri acetici riescono a sopravvivere sviluppando particolari meccanismi di adattamento.

I batteri lattici e quelli acetici sono spesso presenti sulla superficie dell'acino e possono rappresentare popolazioni significative nel mosto fermentativo. Molti batteri lattici sono adattati a crescere in un ambiente anaerobico, mentre i batteri acetici, ad esempio quelli appartenenti ai generi *Gluconobacter* sono obbligati a crescere in condizioni aerobiche. Sia i batteri lattici sia quelli acetici possono produrre acido acetico, un potenziale inibitore della crescita e della produzione di alcool da parte di *Saccharomyces cerevisiae* (Lonvaud-Funel, 1999).

I batteri lattici del vino sono responsabili della fermentazione malo-lattica (MLF), che solitamente segue la fermentazione alcolica e può iniziare solamente quando la popolazione batterica raggiunge la concentrazione di 10^6 UFC/mL (Lonvaud-Funel, 1999). Il batterio lattico *Oenococcus oeni* è tra le principali specie adatte a condurre la MLF, a causa della sua tolleranza a crescere in un ambiente fortemente acido e per la sua spiccata proprietà a produrre aromi.

La MLF nel vino è un processo biologico di disacidificazione, nella quale l'acido malico è convertito in acido lattico con produzione di anidride carbonica. Abbassare l'acidità risulta necessario in alcune tipologie di vino, sia perché a causa di particolari andamenti stagionali l'uva al momento della vendemmia può contenere una quantità eccessiva di acidi (questo evento si verifica più frequentemente nelle zone settentrionali di coltivazione della vite) sia per migliorare la qualità del prodotto destinato all'invecchiamento. Quindi, la MLF aumenta il valore del pH e migliora le proprietà organolettiche del vino. Oltre che nel vino, la fermentazione malolattica avviene anche in altre bevande fermentabili, tra le quali il sidro (Liu, 2002).

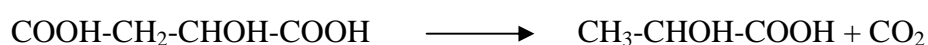
A causa dell'ambiente acido del vino e all'etanolo che si crea durante il processo di vinificazione, i batteri lattici sono sottoposti a condizione di forte stress. Lo stress può indurre mutamenti del genoma, del proteoma e in generale determina un rallentamento della crescita batterica. La risposta batterica allo stress (fase adattativa) è di particolare importanza perché l'ambiente in cui proliferano è continuamente sottoposto a variazioni sia fisiche (temperatura, pressione osmotica), che nutrizionali. Sebbene alcuni tipi di stress, come le variazioni di temperatura, di pH siano legate a fattori esterni, in alcuni come quelli indotti da deprivazione dei fattori nutrizionali sono generati dalla crescita batterica medesima (Van de Guchte et al., 2002); cioè l'organismo stesso può essere fonte diretta di fattori di stress. Ad esempio, diversi batteri durante la crescita producono radicali liberi che possono causare, se non adeguatamente neutralizzati dai sistemi antiossidanti interni alla cellula batterica, l'ossidazione di

macromolecole biologiche, la denaturazione proteica e persino la rottura della catena degli acidi nucleici.

Nel vino diversi fattori di stress hanno un impatto negativo sulla crescita dei batteri lattici. Infatti il vino è caratterizzato da bassi valori di pH (3-3,5), a causa della presenza di diversi acidi organici (malico, lattico, succinico, tartarico). Inoltre, durante la fermentazione alcolica, *Saccharomyces cerevisiae* oltre a etanolo e CO₂ produce diversi metaboliti secondari, quali il feniletanolo e proteine noti come inibitori della crescita dei batteri lattici. Altri componenti del vino, come gli acidi grassi e il rame, hanno effetti inibitori sulla crescita cellulare e sulla durata della fermentazione malolattica. Anche l'accumulo di acido lattico prodotto durante il catabolismo dei carboidrati, può limitare la durata della crescita dei batteri lattici e la loro sopravvivenza, contribuendo alla selezione naturale di specie batteriche che conferiranno le qualità sensoriali definitive e desiderate del prodotto enologico. Sia *Oenococcus oeni* sia *Lactobacillus plantarum* hanno sviluppato inoltre meccanismi di adattamento molto sofisticati, atti a sopravvivere alle avverse condizioni ambientali, generate durante il processo di vinificazione.

I fattori che influenzano lo svolgimento della MLF sono stati oggetto di numerose ricerche e sono rappresentati dal pH, dal contenuto di etanolo, dalla presenza di SO₂ e dalla temperatura di conservazione.

La reazione chimica che sta alla base della fermentazione malolattica è la trasformazione dell'acido L-malico, un acido con due funzioni carbossiliche, in acido L-lattico, con una sola funzione carbossilica (Stratiotis et al., 2002), come conseguenza diminuisce la capacità di liberare idrogenioni nel mezzo con un conseguente innalzamento del pH.

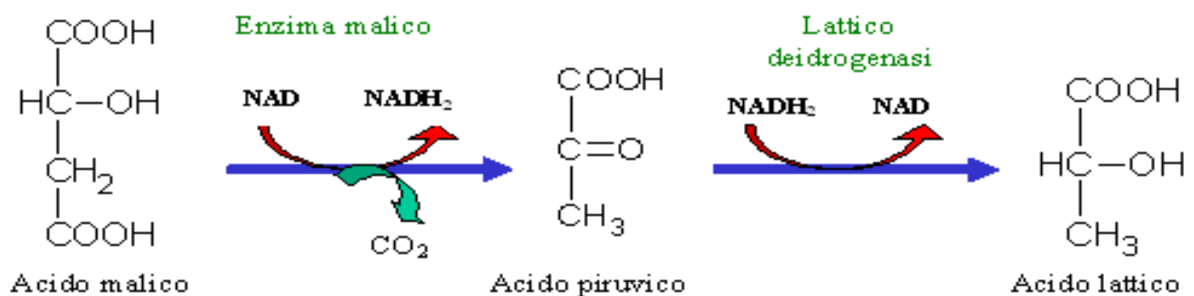


Questa trasformazione è un processo endotermico infatti non c'è sviluppo di energia tale da soddisfare le esigenze dei batteri lattici, infatti essi si procurano l'energia necessaria

metabolizzando le piccole quantità di zuccheri residui nel vino, sia esosi che pentosi (glucosio, fruttosio, arabinosio e trealosio). Avendo una diminuzione delle funzioni acide conseguentemente accade che abbiamo anche una diminuzione della solubilità dei sali dell'acido tartarico, il pH si alza, si liberano ioni potassio che in parte erano legati al tartarico per salificarlo ed a questo punto diventano disponibili nel mezzo. Altro aspetto importante è il metabolismo del citrato, uno dei maggiori acidi organici presenti nelle uve insieme al malato e al tartrato, poiché i batteri lattici sono in grado di metabolizzarlo in presenza di glucosio, portando alla formazione di lattato, acetato (acidità volatile), diacetile (nota di burro), acetoino e 2,3-butandiolo. Molti batteri lattici possono anche produrre una certa quantità di polisaccaridi, per esempio *P. damnosus* produce un β -D glucone composto da un trisaccaride unito a D-glucosio (Llaubères et al., 1990).

I principali enzimi implicati nella reazione sono l'enzima malico (ME) e l'enzima malico deidrogenasi (MDH).

Il MDH catalizza la reazione da acido malico ad acido piruvico e anidride carbonica, necessita di NAD^+ , ed è attivo a pH molto elevati da 9.0 a 9.5, porta alla formazione di acido ossalacetico dal quale deriva poi l'acido piruvico per azione dell'enzima ossalacetato decarbossilasi (OAD). La reazione finale ad acido lattico è completata grazie all'azione dell'enzima lattato deidrogenasi (LDH).



Nel caso dell'enzima malico si ha la conversione diretta da acido malico ad acido lattico, ed è necessario l'intervento di un altro enzima, nicotinammide nucleotidica transidrogenasi (TH) che catalizza il trasferimento reversibile dell'idrogeno fra NADP(H) e NAD(H). Questo enzima è molto diffuso in natura (Pydstrom et al., 1976) nei batteri, nei vegetali, nei tessuti animali e nell'uva stessa (Spettoli e bottacin, 1981). Mentre le diverse specie di batteri lattici per fermentazione degli zuccheri possono formare o soltanto acido L-lattico oppure soltanto acido D-lattico, oppure una miscela dei due, dalla fermentazione dell'acido L-malico si forma esclusivamente acido L-lattico, qualunque sia la specie responsabile della fermentazione.

Alcuni cluster di geni per la malolattica includono una proteina regolatoria, chiamata *mIer*, responsabile della decarbossilazione del L-malato. Il gene *mIer* in *Lactococcus lactis* è stato segnalato come essenziale per MLF (Renault et al., 1989). Al contrario, sembra che la presenza di *mIer* in *Streptococcus mutans* non sia necessaria per la fermentazione (Lemme et al., 2010; Sheng et al., 2010).

In tutti i casi, i cluster includono un gene *mIer*, che codifica per una proteina regolatrice di legame del DNA, che regola la trascrizione dei geni *mLes* e *mIeP*.

1.4 EFFETTI DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Gli aspetti più vistosi della MLF sono rappresentati da un sensibile calo dell'acidità totale, da un conseguente innalzamento del pH, dalla produzione di anidride carbonica in quantità sufficienti a provocare effervescenza, dalla formazione di torbidità. Le caratteristiche di gusto e profumo cambiano in maniera nettissima, provocando in certi casi un deciso miglioramento e affinamento della qualità del vino, in altri casi un deciso crollo della qualità stessa.

Il fatto che la MLF sia sempre accompagnata da una sia pure modesta fermentazione degli zuccheri ha come conseguenza un inevitabile incremento di acidità acetica, particolarmente elevato quando sono i pentosi ad essere fermentati. Altri composti la cui presenza è più

nettamente influenzata sono il diacetile e l'acetoino che aumentano da due a tre volte. La produzione di tali composti è collegata all'utilizzazione dell'acido citrico da parte dei batteri durante la MLF.

Oltre allo svolgimento della fermentazione malolattica i batteri svolgono altre attività metaboliche che, in funzione del vino che vogliamo ottenere, possono portare ad un miglioramento o peggioramento delle caratteristiche compositive e sensoriali del vino (Barbagallo et al., 2004). Il numero di batteri lattici aumenta subito dopo la rottura degli acini, durante la fase della pigiatura dell'uva fino a raggiungere un ciclo logaritmico pari a 10^3 - 10^4 UFC/mL, per poi diminuire drasticamente durante la fermentazione alcolica ad opera dei lieviti.

O. oeni e alcune specie di Lattobacilli sono comunque presenti durante tutta la fermentazione alcolica e durante tutta la durata della fermentazione malolattica (Swiegers et al., 2005; Jackson, 2008).

1.5 COLTURE STARTER PER LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

La MLF storicamente è stata descritta come un fenomeno altalenante e non completamente compreso, ma ritenuto comunque di grande importanza per il prodotto finale. Recentemente molti studi hanno aiutato a comprendere meglio questo processo di disacidificazione biologica e i fattori riscontrati all'interno dell'ambiente vino che incidono notevolmente sulle prestazioni dei batteri lattici responsabili di questa fermentazione.

Ci sono diverse opzioni per controllare la MLF: in primo luogo, il controllo delle condizioni ambientali per promuovere la crescita della flora autoctona malolattica; in secondo luogo, l'induzione della MLF inoculando con vini già in fase di fermentazione; in terzo luogo, l'inoculo con preparati commerciali di colture selezionate.

Negli ultimi anni il riconoscimento dei vantaggi della MLF sulla qualità del vino ha portato gli enologi a cercare un migliore riscontro di tale fermentazione. Per questo motivo, l'induzione

della MLF con l'uso di colture starter selezionate sta diventando consuetudine. Uno dei vantaggi delle colture selezionate è la riduzione del tempo necessario per degradare l'acido malico ad acido lattico grazie al massiccio inoculo di batteri (10^6 ufc/mL) nel vino per innescare la fermentazione.

Uno dei primi criteri di selezione per i batteri da impiegare nella MLF è di tollerare i fattori di stress presenti durante le fasi di produzione dei vini e la liofilizzazione (Bou e Powell, 2006).

Oltre ad una elevata resistenza alle condizioni ambientali quali pH, alcool, SO_2 e temperatura, i batteri vengono selezionati in base alle attività metaboliche desiderate.

Nel 2004, Bou e Krieger hanno depositato un brevetto su '*la tolleranza all'etanolo di ceppi malolattici per la maturazione dei vini con pH medio o alto*' (Bou e Krieger, 2004). Il brevetto, depositato nel 2000 (PCT / FR2004 / 001.421), si riferisce a ceppi di batteri lattici appartenenti ai generi *Lactobacillus* e *Pediococcus* in grado di innescare e realizzare in modo completo la MLF mediante inoculo diretto di colture essiccate, congelate o liofilizzate, senza alcuna fase di adattamento precedente, a una concentrazione tra 10^6 e 10^7 ufc/mL, in un vino con una gradazione alcolica pari al 10% (v/v) o superiore e con valori di pH medio alti. La resistenza all'alcool viene dimostrata mediante un'eccellente velocità di sopravvivenza dell'inoculo e un rapido inizio di degradazione dell'acido malico.

Un recente studio italiano ha portato all'individuazione di un ceppo di *Lb. plantarum* il V22 in grado di operare la MLF anche in condizioni di pH basso (Fumi et al., 2010). Nell'ambito di un progetto europeo, dove coadiuvanti chimici, lieviti e batteri lattici sono stati sottoposti a screening per la loro capacità di ridurre ocratossina A (OTA) in mosto e vino, sono stati selezionati tre ceppi di *Lb. plantarum* (Silva et al., 2007), l'ocratossina A è una micotossina sospettata di essere nefrotossica, teratogena, epatotossica e cancerogena. *Lb. plantarum* V22 ha mostrato la più alta riduzione di OTA nelle condizioni sperimentali. Inoltre, i tre ceppi sono stati saggiati in forma liofilizzata per l'induzione della MLF nel vino. I ceppi V16b e V22 sono stati

testati in condizioni diverse in vini: con pH compreso tra 3.1 a 3.5, alcool dal 12% al 15% (v/v), SO₂ molecolare compreso tra 0,2 a 0,6 mg/L e temperature 15-20°C. Il ceppo V22 è risultato il più performante. Tuttavia, a pH 3.3 e a concentrazioni di SO₂ molecolare pari a 0,6 mg/L, non c'è stata degradazione totale dell'acido malico.

Questo ceppo è stato analizzato nel corso di tre annate in varie condizioni: pH elevato (> pH 3,5) e alta concentrazione di etanolo ($\geq 14\%$ v / v) per dimostrare un maggiore rapidità nel tempo di fermentazione rispetto a *O. oeni*.

Inoltre, grazie al suo metabolismo eterofermente facoltativo in presenza di zuccheri *Lb. plantarum* può essere impiegato come coinoculo senza il rischio di formazione di acidità volatile. Anche in questo caso è stata comprovata una maggiore velocità di fermentazione rispetto a *O. oeni*, in vini con pH superiori a 3,5. Ancora, Knoll et al. (2008) hanno riscontrato che alcuni ceppi di batteri lattici isolati durante la fermentazione alcolica e la MLF da vini rossi del Sud Africa, tra cui *Lb. plantarum* V22, possiedono attività antimicrobica.

1.6 APPLICAZIONI ALIMENTARI E SANITARIE DI *LACTOBACILLUS PLANTARUM*

Grazie alla capacità di crescere in molte nicchie ecologiche, *Lb. plantarum* può essere utilizzato in diverse campi, sia nell'industria alimentare sia in quella sanitaria.

Alcuni studi hanno rivelato che l'uso di *Lb. plantarum* nella fermentazione in impasti acidi rappresenta un valido mezzo per migliorare la struttura, il sapore e la shelf-life dei prodotti da forno. *Lb. plantarum* 20B ha mostrato una buona acidificazione e produzione di acido acetico quando pentosani e L-arabinofuranosidase vengono aggiunti agli impasti (Gobbetti et al., 2000).

L'acido lattico prodotto dal metabolismo dei batteri lattici (compreso *Lb. plantarum*), è il composto principale responsabile dell'acidificazione dell'impasto acido ed è inoltre implicato nell'aroma del pane anche se con un effetto limitato. Ugualmente la produzione di acido acetico favorisce e migliora le proprietà organolettiche del prodotto finale. Tuttavia, per una percezione

piacevole dell'aroma è necessaria un'ottimale (2,0-2,7) ragione molare lattato/acetato (quoziente di fermentazione, FQ). La qualità del pane ottenuto mediante l'impiego di tale specie è comparabile a quella del pane prodotto utilizzando uno starter più comune come *Lb. sanfranciscensis*, in quanto non si evidenziano differenze significative per quanto concerne la texture, il volume, la porosità e la durezza del prodotto ottenuto (Clarke e Arendt, 2005).

Altri studi hanno dimostrato che il tempo di lievitazione ed il grado acidificazione rilevata durante la produzione dell'impasto sono migliorati grazie all'impiego di *Lb. plantarum* (Pepe et al., 2004). Inoltre una buona acidificazione determina una notevole riduzione del pH, che evita lo sviluppo di eventuali fermentazioni indesiderate (es. *Enterobacteriaceae*), inibisce o rallenta nel pane la crescita di batteri ascrivibili a specie del genere *Bacillus* (responsabili del cosiddetto "pane filante"), favorisce lo sviluppo di lieviti acido - resistenti, migliora le proprietà strutturali e la shelf-life del prodotto finito (Winy Messens et al., 2001; Katina et al., 2002). Oltre a ciò, sono state osservate anche proprietà antifungine. La produzione di due peptidi ciclici (L-Leu-L-Pro) e (L-Phe-L-Pro) da parte di *Lb. plantarum* FST 1.7 determina, anche a basse concentrazioni, l'inibizione della crescita di muffe appartenenti al genere *Fusarium* (*Fusarium culmorum* e *Fusarium graminearum*), responsabili della produzione di aflatossine; inoltre tali sostanze sembrerebbero essere in grado di inibire anche la crescita di *Aspergillus parasiticus*, solo però a elevate concentrazioni (Dal Bello et al., 2007).

Recenti studi hanno dimostrato la potenziale applicazione di *Lb. plantarum* CRL 778 per migliorare la qualità nutrizionale e la shelf life del pane fatto con lievito naturale e farina di quinoa (Dallagnol et al., 2012).

Inoltre è stato anche valutato l'impiego di *Lb. plantarum* come coltura starter per la produzione di pane "gluten - free" ed anche in tal caso i risultati ottenuti non hanno mostrato differenze significative rispetto al prodotto ottenuto con starter convenzionali (Moore et al., 2008).

Lb. plantarum è considerato uno dei più importanti batteri lattici utilizzati nella fermentazione di olive da tavola (Sabatini et al., 2008; Corsetti et al., 2012). Questo microrganismo ha la potenzialità di migliorare la resa in acido lattico, controllare il processo fermentativo e migliorare le caratteristiche organolettiche del prodotto finale (Panagou et al., 2008; Ruiz-Barba et al., 2010; Hurtado et al., 2012). Il ceppo LPCO10 di *Lb. plantarum* è stato utilizzato con successo in fermentazione di olive; e grazie al medesimo sono state controllate sia il processo di fermentazione sia l'inibizione di numerose specie microbiche alteranti e patogene come *Bacillus cereus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* (Jimenez-Diaz et al., 1993; Ruiz-Barba et al., 1994; Leal-Sanchez et al., 2003; Singh e Ramesh, 2007)

Lb. plantarum è stato impiegato anche nella fermentazione di altri prodotti vegetali, come i crauti. Ad esempio, l'applicazione di *Lb. plantarum* L4 come coltura starter durante la fermentazione dei cavoli, ha permesso di utilizzare una minore concentrazione di NaCl (dal 4.0 al 2,5%) e ridurre il tempo di fermentazione, nonché di migliorare la qualità del prodotto (Beganovic et al., 2011).

Negli ultimi anni, come già riportato nei precedenti paragrafi, in campo enologico c'è un uso massiccio di specie di *Lactobacillus*, specialmente nella produzione di vini rossi. *Lb. plantarum* sembrerebbe il miglior candidato per il processo di disacidificazione biologica del vino, poichè oltre ad essere in grado di sopravvivere alle differenti condizioni di stress (pH 2,8-3,4, alcool 11-15%) del vino può guidare la MLF (Miller et al., 2011; Toit et al., 2011). Infatti le sue attività metaboliche determinano non solo un incremento del pH e dell'acidità volatile ma soprattutto della concentrazione aminoacidica e di alcuni composti volatili; in particolare si evidenzia un notevole incremento della concentrazione degli alcoli e di alcuni esteri a corta catena (etil-acetato, etil-lattato, dietil-succinato) ma soprattutto della concentrazione di taluni acidi grassi

(come l'acido ottanoico e decanoico) implicati nella determinazione delle caratteristiche aromatiche del prodotto (Moreno – Arribas et al., 2005).

Oltre alla degradazione dell'acido malico e alla produzione di composti aromatici, i vantaggi che possono essere ottenuti grazie all'impiego di *Lb. plantarum* sono l'attività antimicrobica e la degradazione di ammine biogene (Toit et al., 2011; Capozzi et al., 2012).

Alcuni studi hanno dimostrato l'uso potenziale di *Lb. plantarum* di prodotti carnei fermentati. Interessante risulta l'attività anti-listeria che è stata dimostrata da alcuni ceppi di *Lb. plantarum* quando vengono utilizzati come colture starter nella preparazione degli insaccati fermentati (Campanini et al., 1993; Falli et al., 2004).

Un'ulteriore rilevante potenzialità di *Lb. plantarum* è l'applicazione di questo microrganismo come probiotico (Kaushik et al., 2009; Čokášová et al., 2012; Martín et al., 2012; Kakisu et al., 2012). Un interessante studio ha dimostrato l'uso del ceppo Lp299 di *Lb. plantarum* come cura del cavo orale di pazienti dell'Unità di Terapia Intensiva (Klarin et al., 2008). Questo ceppo probiotico è stato in grado di contrastare i batteri patogeni per 24 ore offrendo una valida alternativa all'uso di antibiotici o antisettici come la clorexidina.

Alcuni ceppi di *Lb. plantarum* sono noti per le loro proprietà antimicrobiche contro i batteri patogeni e deterioranti presenti negli alimenti, tra cui *Listeria monocytogenes* (Diep et al., 2009; Sip et al., 2012), attività antagonista fa di questa specie un ottimo candidato per l'impiego in tecniche di biocontrollo nella conservazione di alimenti (Sorrentino et al., 2013). Le proprietà antimicrobiche espresse da *Lb. plantarum* possono essere riconducibili a diversi meccanismi: la produzione di composti antimicrobici quali batteriocine, sostanze batteriocina simili (BLIS), acido fenilattico, acidi organici (principalmente lattico e acido acetico), perossido di idrogeno e la competizione per nutrienti (Todorov et al., 2011; Reis et al., 2012).

Recentemente, Mills et al. (2011a) hanno rilevato l'effetto anti-listeria prodotto da *Lb. plantarum* LMG P-26358 isolato da formaggi artigianali a pasta molle. Questo ceppo produce batteriocine

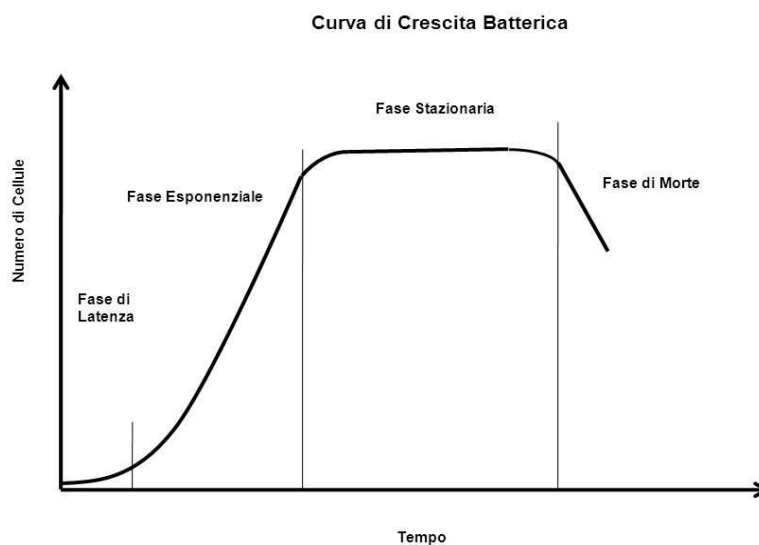
classe IIa stabili a temperature di 100°C e intervalli di pH da 1 a 10. (Sip et al., 2012). *Lb plantarum* è in grado di produrre PLA, (acido 2-idrossi-3-phenylpropanoic, PLA) un composto antibatterico con attività ad ampio spettro contro batteri Gram-negativi e Gram-positivi (Dieuleveux et al., 1998). Anche altre specie appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* e *Leuconostoc*, hanno la capacità di produrre tali sostanze ma la quantità prodotta da *Lb. plantarum* sembra essere superiore a quella prodotta da altre specie (Mu et al., 2012). Inoltre, diversi studi hanno dimostrato che la produzione di PLA può variare tra i ceppi di *Lb. plantarum* (Gerez et al., 2010; Rodríguez et al., 2012).

FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA DEI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI E RISPOSTA AI FATTORI DI STRESS

2.1 INTRODUZIONE

Gli alimenti costituiscono veri e propri ecosistemi, in quanto sono colonizzati da diverse popolazioni microbiche. La crescita e la morte dei microrganismi presenti sono legate a diversi fattori e alle condizioni ecologiche che si instaurano nell'alimento stesso. In una matrice alimentare la crescita microbica può essere paragonata a quella che si realizza in una coltura in batch (o sistema chiuso discontinuo), dove i nutrienti si esauriscono o comunque variano la loro concentrazione nel tempo, mentre si accumulano metaboliti che possono anche avere un effetto inibente sulla crescita stessa. In questo sistema la crescita microbica può essere rappresentata da una curva (Fig. 2.1) caratterizzata da diverse fasi: fase di latenza, fase di crescita esponenziale, fase stazionaria e fase di morte.

Figura 2.1



Nella prima fase, fase lag, non c'è apparente crescita mentre l'inoculo si adatta al nuovo ambiente, vengono sintetizzati gli enzimi necessari e riparati i danni indotti da noxa precedenti (per es.: congelamento, disidratazione, riscaldamento).

La fase logaritmica (o di crescita esponenziale) è caratterizzata da un aumento di cellule che segue la semplice formula generale :

$$G = t \log_2 / \log N - \log N_0$$

dove N_0 : cellule al tempo 0, N : cellule dopo il tempo t .

L'inclinazione della curva è quella tipica del microrganismo in esame e dipende da numerosi fattori (intrinseci ed estrinseci). Infine, cambiamenti indotti dallo sviluppo esponenziale, portano questa fase a interrompersi allorché i nutrienti chiave sono esauriti e i metaboliti con attività inibenti lo sviluppo si sono accumulati: la coltura passa nella fase stazionaria.

Gli alimenti sono degli ecosistemi in continuo mutamento, in quanto le relazioni che intercorrono tra le loro caratteristiche e le popolazioni microbiche in essi presenti sono influenzate da fattori che possono cambiare nel corso dell'intera vita del prodotto. Infatti, non solo il numero di microrganismi presente in un alimento può aumentare o diminuire in ciascuna fase della filiera, ma anche gli equilibri tra le diverse popolazioni microbiche possono modificarsi sotto la spinta esercitata dalle condizioni che vengono a realizzarsi. Pertanto, per riuscire a esercitare un'azione di controllo microbiologico, mettendo condizioni ecologiche adeguate, è di fondamentale importanza conoscere sia le caratteristiche dei microrganismi che possono essere presenti in un dato alimento, sia i fattori che possono influenzarne la crescita o la morte.

Tra i fattori che possono influenzare la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi durante tutte le fasi di produzione, stoccaggio, conservazione e manipolazione di un alimento vi sono sia fattori intrinseci (correlati alle caratteristiche specifiche dell'alimento), sia fattori estrinseci (legati all'ambiente in cui l'alimento viene a trovarsi). Occorre poi considerare anche i cosiddetti

fattori di processo, cioè tutte quelle operazioni attuate durante la produzione di un alimento e che hanno un impatto sulla crescita o sulla sopravvivenza dei microrganismi presenti, e i fattori impliciti, che dipendono dalle caratteristiche peculiari delle popolazioni microbiche e dalle loro interazioni all'interno dell'ecosistema alimento.

2.2 FATTORI INTRINSECI

I fattori intrinseci dipendono dalla composizione e dalle caratteristiche chimico-fisiche della matrice alimentare considerata, ma possono essere significativamente influenzati dai processi di trasformazione e dalla stessa attività microbica. Tali fattori sono rappresentati dal pH, attività dell'acqua, composizione e struttura del mezzo, potenziale di ossido-riduzione, presenza/assenza di ossigeno ed eventuale presenza di antimicrobici.

2.2.1 pH e potere tampone del mezzo

L'acidificazione degli alimenti è stata utilizzata come metodo di conservazione fin dall'antichità, soprattutto attraverso la fermentazione; l'acidità influenza, infatti, direttamente la crescita dei microrganismi, che si moltiplicano con velocità diversa a seconda del pH. In generale, dal punto di vista dell'industria alimentare, le strategie di stabilizzazione sono basate più sull'abbassamento del pH che sul suo innalzamento. L'aumento di acidità degli alimenti, ottenuto attraverso l'aggiunta diretta di acidi o mediante processi fermentativi, può quindi permettere di controllare la crescita dei microrganismi in essi presenti. La tabella 2.1 riporta i valori indicativi di pH che supportano la crescita dei principali gruppi microbici di interesse alimentare, comprese alcune specie patogene per l'uomo.

Tabella 2.1 - pH microrganismi

Microrganismi	pH minimo	pH massimo	Acidoresistenza
<i>Micrococcus</i> spp	5.6	8.1	Bassa acido resistenza pH minimo > 5
<i>Pseudomonas auriginosa</i>	5.6	8.0	
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	5.2	9.2	
<i>Clostridium botulinum</i> tipo E	5.0-5.2		Media acido resistenza pH min 5-4
<i>Clostridium sporogenes</i>	5.0	9.0	
<i>Bacillus cereus</i>	4.9	9.3	
<i>Clostridium botulinum</i> tipo A,B	4.5	8.5	
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0	9.8	
<i>Salmonella</i>	4.0-4.5	8-9.6	
<i>Escherichia coli</i>	4.4	9.0	
Batteri lattici			Forte acido resistenza pH min 4
<i>Lactobacillus</i> spp	3.8-4.4	7.2	
Batteri acetici			
<i>Acetobacter cidophilus</i>	2.6	4.3	
Lieviti			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.3	8.6	
Funghi			
<i>Penicillium italicum</i>	1.9	9.3	
<i>Aspergillus oryzae</i>	1.6	9.3	

Per ogni specie microbica è possibile individuare i pH al di sotto e al di sopra dei quali il microrganismo cessa di moltiplicarsi e il pH al quale lo sviluppo procede più velocemente. I valori cardinali di pH (massimi, ottimali e minimi) possono essere molto diversi all'interno dello stesso gruppo microbico di appartenenza. In generale, i batteri Gram-negativi sono più sensibili all'acidità rispetto ai Gram-positivi, mentre le muffe e i lieviti sono in grado di sviluppare a valori di pH inferiori a quelli dei batteri. In base al pH ottimale di crescita, i microrganismi sono classificati in acidofili (pH ottimale acido), basofili o alcalofili (pH ottimale alcalino) e neutrofilo (pH ottimale prossimo alla neutralità). Peraltro, va sottolineato che alcuni microrganismi di interesse alimentare possono essere definiti acido-tolleranti, in quanto hanno un ottimo di pH per lo sviluppo nell'ambito della neutralità ma sono in grado di crescere anche a pH relativamente bassi. Occorre inoltre ricordare che il pH minimo per la crescita dei microrganismi dipende non solo dal suo valore assoluto ma anche dal tipo di acido utilizzato per aumentare l'acidità del mezzo, poiché molti acidi organici possono agire da batteriostatici o battericidi. Gli intervalli di pH ambientale che consentono lo sviluppo microbico non coincidono naturalmente con i valori di acidità che devono essere mantenuti all'interno delle cellule microbiche e che sono caratterizzati da range molto più restrittivi. Infatti, variazioni anche relativamente modeste del pH intracellulare possono compromettere le attività enzimatiche della cellula. Quindi la capacità della cellula di espellere verso l'esterno ioni H^+ , anche contro gradienti di concentrazione notevoli, costituisce un aspetto chiave dell'omeostasi interna. Inoltre non va dimenticato che il pH dell'ambiente esterno può influenzare notevolmente l'attività delle proteine e in particolare degli enzimi presenti sulla parete o inglobate nella membrana cellulare. L'effetto del pH sulla crescita microbica può essere influenzato dall'interazione con altri parametri, quali attività dell'acqua (a_w), concentrazione di sali, temperatura di processo e di conservazione, presenza di antimicrobici, potere tampone dell'alimento ecc. Il pH può inoltre svolgere un'azione indiretta, poiché valori non ottimali possono rendere le cellule più sensibili nei confronti di altri fattori di

stress. Per esempio, l'efficacia dei trattamenti termici nell'abbattimento della vitalità cellulare può essere incrementata in condizioni di pH acido. Oltre al valore di pH in quanto tale, è importante considerare la capacità tampone dell'alimento, cioè la sua capacità di opporsi ai cambiamenti di pH. Un alimento con scarso potere tampone sarà soggetto a più facili e rapidi cambiamenti di pH a causa della produzione di metaboliti (acidi o alcalini) da parte dei microrganismi in esso presenti. In pratica, quanto più alto è il potere tampone di un alimento, tanto maggiore sarà il tempo necessario perché il pH del sistema cambi per effetto della crescita microbica o dell'aggiunta di conservanti, quali alcuni acidi. Il potere tampone di un alimento dipende soprattutto dal contenuto in proteine. Gli alimenti di origine animale sono ricchi di proteine e hanno perciò un elevato potere tampone, mentre i prodotti di origine vegetale hanno una capacità tampone limitata a causa dello scarso contenuto proteico. Per esempio, nel processo produttivo dei crauti o di altri vegetali fermentati sono sufficienti le piccole quantità di acido lattico accumulate nei primi stadi di fermentazione a opera dei batteri lattici presenti per abbassare il pH in misura tale da inibire l'attività di enzimi pectinolitici e di microrganismi indesiderati.

2.2.2 Attività dell'acqua (a_w)

L'attività dell'acqua (a_w) è definita come il rapporto tra la pressione di vapore dell'acqua in un prodotto (P) e la pressione di vapore dell'acqua pura (P0) a una data temperatura. Questo parametro indica la quantità di acqua libera da legami con altri componenti di un determinato sistema (per esempio un alimento) e quindi in quale misura l'acqua presente è disponibile per partecipare alle reazioni chimiche e biochimiche indispensabili per il metabolismo e la moltiplicazione dei microrganismi. Il valore di a_w di un alimento si misura su una scala che va da 0 (alimento completamente disidratato) a 1 (acqua pura). Per moltiplicarsi, i microrganismi

necessitano di acqua disponibile per i processi biologici ed enzimatici del loro metabolismo e per ogni specie microbica può essere individuato un valore di a_w minimo di crescita (Tabella 2.2).

Tabella 2.2

Gruppo o specie	Condizioni	A_w minima di crescita
Batteri lattici		0.90
Batteri alofili		0.75
Muffe		0.80
Lieviti		0.88
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	In presenza di glucosio	0.89
	In presenza di saccarosio	0.90
	In presenza di NaCl	0.92
Batteri patogeni		
<i>Listeria monocytogenes</i>		0.90-0.92
<i>Salmonella spp.</i>		0.93-0.94
<i>Campylobacter spp.</i>		0.98
<i>Escherichia coli</i>		0.93-0.95
<i>Bacillus spp.</i>		0.90
<i>Bacillus cereus</i>	In presenza di glicerolo	0.90
	In presenza di NaCL	0.94
<i>Clostridium spp</i>		0.93
<i>Clostridium botulinum</i>		0.93-0.95

Questo valore minimo è in relazione con gli altri fattori che vengono a instaurarsi nella matrice alimentare e con il tipo di sostanza responsabile dell'abbassamento dell' a_w (zuccheri, sali ecc.). In generale, le specie Gram-positive sono più resistenti ai bassi valori di a_w rispetto alle Gram-negative.

In base alle esigenze nei confronti dell'acqua disponibile, i microrganismi vengono arbitrariamente classificati in diversi gruppi:

- xerofili: microrganismi in grado di crescere a valori di a_w estremamente bassi, pari a 0,75 o addirittura inferiori (per esempio alcune specie di muffe);

- alofili: microrganismi che per crescere necessitano della presenza di sale, tra cui alcuni batteri con habitat estremi;
- alotolleranti: microrganismi che hanno una crescita ottimale a basse concentrazioni di sale ma in grado di crescere anche a elevate concentrazioni (per esempio *Staphylococcus aureus*);
- osmofili: microrganismi che hanno uno sviluppo privilegiato a elevate concentrazioni di zuccheri (per esempio alcune specie di lieviti, come *Zygosaccharomyces*).

Molti degli alimenti più comuni hanno valori di a_w compatibili con la crescita della maggior parte dei microrganismi; per questa ragione la riduzione del loro contenuto di acqua libera è da sempre uno dei metodi impiegati per rallentarne la degradazione e dunque aumentare a shelf life del prodotto (Alzamora et al., 2003). L' a_w di un alimento può essere ridotta per mezzo di diversi processi, in particolare mediante la rimozione fisica dell'acqua per essiccazione o disidratazione oppure attraverso l'azione di soluti addizionati o naturalmente presenti nell'alimento, quali zuccheri, sale, altri composti a basso peso molecolare e proteine. Il metodo impiegato per sequestrare l'acqua libera presente influenza il comportamento delle cellule microbiche a bassi valori di a_w . Per esempio l'aggiunta di sale o zucchero determina un aumento della pressione osmotica del sistema, con conseguenti danni per la cellula microbica, che tende a perdere acqua. Se questi danni sono irreversibili, i microrganismi muoiono per plasmolisi, mentre se l' a_w non scende al di sotto del valore minimo tollerabile, le cellule mettono in atto diversi meccanismi di resistenza allo stress osmotico, tra cui l'accumulo all'interno del citoplasma di soluti non tossici (per questo definiti compatibili) che hanno lo scopo di trattenere l'acqua bilanciandone la migrazione verso l'esterno, senza tuttavia influire sulla sua biodisponibilità per il metabolismo cellulare. Questi soluti, la cui natura varia a seconda del gruppo microbico, possono essere costituiti da ioni (in particolare K^+) o da molecole organiche come glicerolo e zuccheri (trealosio). Va inoltre sottolineato che, oltre al valore assoluto di a_w , occorre considerare anche

l'effetto soluto, e cioè che le strategie di adattamento all'abbassamento dell'*aw* variano a seconda del gruppo microbico. Per esempio batteri riconducibili alle *Micrococcaceae* o alle *Staphylococcaceae* sono più resistenti alla riduzione di *aw* operata tramite aggiunta di NaCl, o comunque di sali, mentre le specie fungine sono in generale meno sensibili alla presenza di elevate quantità di zuccheri (Alzamora et al., 2003). Altri metodi comunemente impiegati per abbassare l'*aw*, come la disidratazione per liofilizzazione, permettono una più veloce rimozione dell'acqua libera rispetto a quella ottenuta mediante l'aggiunta di soluti e ciò consente alle cellule microbiche di sopravvivere anche per lunghi periodi di tempo (Parente e Villani, 2012). Occorre ricordare che per ostacolare più efficacemente lo sviluppo di microrganismi alteranti o patogeni il controllo dell'*aw* può essere combinato con altri metodi (abbassamento del pH, impiego di sostanze ad azione batteriostatica ecc.).

2.2.3 Potenziale di ossido-riduzione

Il potenziale di ossido-riduzione (Eh), o potenziale redox, di un sistema può essere definito come una misura (espressa in mV) dell'attitudine di un substrato a cedere o acquistare elettroni. Quando gli elettroni sono trasferiti da un substrato all'altro si ha, come noto, una reazione di ossido-riduzione, nella quale una sostanza viene ossidata e la seconda ridotta. In queste reazioni il donatore di elettroni, riducendo una sostanza ossidata, è detto anche agente riducente (o antiossidante), mentre l'accettore di elettroni, ossidando una sostanza ridotta, è detto anche agente ossidante. Il valore di Eh può variare tra -420 e +816 mV. In generale i substrati nel loro stato ossidato (con tendenza ad accettare elettroni) hanno valori di potenziale redox positivo (+mV), mentre nel loro stato ridotto (con tendenza a donare elettroni) hanno valori negativi (Parente e Villani, 2012). Il potenziale redox degli alimenti può influenzare la crescita microbica. Ci sono dei range di Eh entro i quali i microrganismi possono crescere: aerobi da +300 a +500 mV; - anaerobi facoltativi da +300 a -100 mV; - anaerobi da +100 a -400 mV. Questi valori

variano in funzione della presenza di antiossidanti e di ossigeno. Per esempio le muffe crescono preferibilmente sulla superficie degli alimenti a contatto con l'aria, anche se *Byssochlamys fulva* può causare alterazione della frutta inscatolata. Il genere *Clostridium* è notoriamente anaerobio stretto, sebbene alcune specie possano crescere anche a valori di Eh di +100 mV. Inoltre uno o più microrganismi possono modificare l'Eh iniziale di un alimento favorendo la crescita di specie che in esso normalmente non si sviluppano. Gli alimenti possono mostrare valori di Eh diversi in relazione a fattori intrinseci e di processo. Per esempio la frutta fresca, i vegetali e gli alimenti carnei freschi sono caratterizzati da bassi valori di Eh garantiti nella carne dai gruppi –SH associati alle proteine, negli alimenti di origine vegetale dalla presenza di acido ascorbico e zuccheri riducenti. Per quanto con carni i fattori di processo, è noto per esempio che i tagli di carne intera sono caratterizzati da potenziale redox di –200 mV mentre le carni macinate raggiungono i +200 mV per effetto della macinatura e del dissolvimento di ossigeno. Altri fattori che possono influenzare il potenziale redox sono il pH, lo sviluppo e il metabolismo microbico, la tensione parziale di ossigeno nell'ambiente di conservazione, la formulazione dell'alimento stesso nonché la sua capacità stabilizzante. Quest'ultima, analogamente al potere tampone, rappresenta la capacità di un alimento di resistere ai cambiamenti di Eh ed è, a sua volta, influenzata dai componenti ossidanti e riducenti presenti nell'alimento, come pure dalla presenza di sistemi attivi respiratori.

2.2.4 Presenza o assenza di ossigeno

L'effetto dell'ossigeno sulla crescita microbica è una delle principali discriminanti che definiscono le potenzialità di colonizzazione di un alimento. In funzione del loro rapporto con questa specie chimica estremamente reattiva, i microrganismi possono essere distinti in quattro grandi gruppi.

- **Aerobi obbligati:** microrganismi che richiedono ossigeno molecolare per moltiplicarsi, poiché ottengono energia esclusivamente attraverso la respirazione aerobia, utilizzando l'ossigeno come accettore finale di elettroni (per esempio Bacillaceae e Pseudomonadaceae). Va comunque ricordato che concentrazioni di ossigeno troppo elevate (>20%) possono essere tossiche anche per questi microrganismi.
- **Anaerobi facoltativi:** microrganismi che si moltiplicano in presenza di ossigeno utilizzando la respirazione aerobia per ottenere energia, ma che sono in grado, in caso di scarsità o assenza di ossigeno, di ottenere energia alternativamente attraverso metabolismi di tipo fermentativo (per esempio Enterobacteriaceae, Staphylococcaceae e molti lieviti di interesse industriale).
- **Anaerobi obbligati:** microrganismi incapaci di sopravvivere in presenza di ossigeno anche a basse concentrazioni e che ottengono energia attraverso metabolismi di tipo fermentativo o attraverso la respirazione anaerobia. Per queste specie l'ossigeno è tossico e può causare gravi danni cellulari che portano rapidamente alla morte (per esempio *Clostridium*).
- **Microaerofili:** fanno parte di questo gruppo microrganismi anaerobi che, pur non utilizzando l'ossigeno come accettore finale di elettroni, sono in grado di tollerare la presenza (sia pure in misura diversa) e di difendersi dai suoi composti tossici (per esempio batteri lattici); microrganismi aerobi che si sviluppano in maniera ottimale a concentrazioni di ossigeno più basse di quella atmosferica (specie del genere *Campylobacter*).

L'ampia variabilità di comportamento dei batteri nei confronti dell'ossigeno dipende dal fatto che questo gas può essere causa di "stress ossidativo", un effetto tossico determinato dall'accumulo nella cellula di composti pro-ossidanti. Infatti, durante le attività metaboliche che avvengono in presenza di ossigeno si formano specie chimiche altamente reattive e/o tossiche,

tra le quali perossido di idrogeno, radicali e altre specie reattive dell'ossigeno (ROS). L'esposizione della cellula a queste molecole provoca un danno ossidativo che può colpire le membrane, il DNA (provocando anche mutazioni) o l'RNA. Per queste ragioni i microrganismi che riescono a crescere in presenza di ossigeno e soprattutto quelli per i quali è indispensabile per moltiplicarsi possiedono precisi meccanismi di difesa per evitare l'effetto tossico di queste specie reattive, mentre i microrganismi anaerobi ne sono sprovvisti. In particolare, la tolleranza o la sensibilità delle cellule all'ossigeno è collegata alla presenza o meno di enzimi capaci di detossificare o rimuovere le specie chimiche più pericolose prodotte in presenza di ossigeno (Parente e Villani, 2012): per esempio, la superossido dismutasi (che disattiva il radicale superossido), la catalasi, la perossidasi o enzimi con funzione analoga (che rimuovono il perossido di idrogeno dalla cellula).

2.2.5 Composizione del mezzo

Per crescere ed esercitare tutte le proprie funzioni metaboliche, i microrganismi di interesse alimentare utilizzano i componenti degli alimenti, quali acqua, carboidrati, composti azotati, lipidi, minerali, vitamine e fattori di crescita correlati (Jay et al., 2009).

Nella maggior parte degli alimenti la ricchezza di nutrienti è tale da soddisfare le esigenze di molte specie diverse di microrganismi: le fonti energetiche impiegate con più facilità sono i carboidrati semplici e gli aminoacidi, ma alcuni microrganismi, dotati di specifici corredi enzimatici, riescono a utilizzare anche zuccheri più complessi, come amidi e cellulosa, previa idrolisi. Anche i lipidi possono rappresentare una fonte di energia, sebbene siano utilizzati da poche specie microbiche presenti negli alimenti. Per quanto concerne le fonti azotate, quella maggiormente impiegata da quasi tutti i microrganismi è rappresentata dagli aminoacidi. Infatti, nonostante alcune specie prediligano peptidi e proteine, la maggior parte dei microrganismi

tende a utilizzare composti semplici prima di quelli più complessi. In generale lo stesso principio vale per i polisaccaridi e i grassi.

In linea di massima, i microrganismi di interesse alimentare meno esigenti dal punto di vista nutrizionale sono le muffe, seguite da batteri Gram-negativi, lieviti e batteri Gram-positivi. I microrganismi necessitano di piccole quantità di vitamine del gruppo B, ampiamente diffuse in quasi tutti gli alimenti. Le muffe e i batteri Gram-positivi possono sintetizzare la maggior parte di tali composti e riescono quindi a svilupparsi anche in alimenti che ne contengono quantità esigue.

Per definizione, gli alimenti sono substrati estremamente ricchi dal punto di vista nutrizionale e possono generalmente supportare la crescita di numerose specie microbiche. Spesso, tuttavia, la loro composizione costituisce un potente fattore di selezione, favorendo alcune specie microbiche a scapito di altre: molti microrganismi, per esempio, non sono in grado di utilizzare alcuni zuccheri (come il lattosio); altri dipendono strettamente dalla forma e dalla disponibilità dell'apporto azotato (azoto inorganico, aminoacidi prontamente disponibili o peptidi/proteine, aminoacidi essenziali ecc.).

2.2.6 Struttura del mezzo

Il naturale rivestimento di alcuni alimenti (gusci di semi e uova, tegumenti della frutta ecc.) fornisce loro un'eccellente protezione contro l'attacco e il successivo deterioramento da parte di microrganismi alteranti. L'integrità di queste strutture biologiche è fondamentale per evitare la penetrazione e la proliferazione dei numerosi microrganismi patogeni o alteranti che possono essere presenti sulla superficie degli alimenti. Durante i processi di trasformazione queste barriere vengono modificate o distrutte, aumentando la possibilità di attacco e di crescita microbica, in misura dipendente dagli altri fattori in gioco. Anche la struttura interna dell'alimento può costituire un ostacolo per la sopravvivenza e la crescita dei microrganismi,

poiché influenza la distribuzione delle cellule microbiche, dell'acqua libera presente e degli acidi organici, compresi gli eventuali conservanti.

È noto che la proliferazione microbica avviene nella fase acquosa di un alimento, le cui caratteristiche influenzano pertanto la crescita (Wilson et al., 2002). Questo parametro dovrebbe essere considerato soprattutto in relazione ai trattamenti tecnologici applicati agli alimenti, come l'impiego di alte pressioni (specie per l'omogeneizzazione), la macinatura delle carni (che determina una diversa compartimentalizzazione della struttura lipido-proteica e dell'acqua) o la formazione di emulsioni (come nel caso della maionese e di prodotti analoghi). Va inoltre ricordato che i processi ad alta temperatura possono modificare profondamente la microstruttura degli alimenti e quindi influenzare le cinetiche di inattivazione microbica. Come riportato da Mañas et al. (2003), quando i tuorli e gli albumi vengono sottoposti a trattamento termico a 65°C la microstruttura cambia per effetto della coagulazione di alcune proteine, come la ovotransferrina, aumentando la viscosità del sistema. L'elevata viscosità può proteggere i microrganismi presenti dai trattamenti termici applicati, rendendo questi ultimi meno efficaci e influenzando significativamente la curva di inattivazione termica.

2.3 FATTORI ESTRINSECI

I fattori estrinseci sono indipendenti dal substrato e possono essere definiti come l'insieme delle caratteristiche essenziali dell'ambiente in cui gli alimenti vengono conservati e commercializzati; essi possono pertanto influenzare la shelf life degli alimenti attraverso l'effetto che svolgono sui microrganismi in essi presenti. I principali fattori estrinseci sono rappresentati dalla temperatura e dall'umidità dell'ambiente di stoccaggio.

2.3.1 Temperatura

Le basse temperature comprendono sia temperature di refrigerazione (da +5/10 a -1/0°C) sia temperature di congelamento (da -1 a -18°C) e surgelazione (da -18 a -40°C). Queste ultime

non permettono lo sviluppo microbico e pur determinando la morte di alcune cellule per ragioni meccaniche, in seguito alla formazione di cristalli di ghiaccio, non sono in grado di inattivare completamente i microrganismi presenti. Inoltre, anche le spore e gli enzimi sono resistenti ai processi di congelamento.

Ogni specie microbica è caratterizzata da 3 temperature principali che individuano i valori minimo, massimo e ottimale di crescita, cioè rispettivamente: le temperature al di sotto e al di sopra delle quali il microrganismo cessa di moltiplicarsi e la temperatura alla quale lo sviluppo procede più velocemente. In funzione di questi valori, i microrganismi sono generalmente classificati in tre gruppi principali, psicrofili, mesofili e termofili, cui si aggiunge il gruppo degli psicrotrofi, che può essere considerato un sottogruppo dei mesofili. I microrganismi psicrofili hanno una temperatura ottimale di crescita compresa tra 10 e 20°C; la temperatura massima di crescita è generalmente inferiore a 25°C. Le specie appartenenti a questo gruppo non sono numerose e si adattano ad ambienti estremi. Poche di esse sono di interesse per l'industria alimentare, sebbene alcune siano riconducibili ai generi *Vibrio* e *Psychrobacter*. I microrganismi mesofili sono caratterizzati da una temperatura ottimale di crescita variabile da 25 a 37°C e da temperature massime che possono raggiungere i 45-50°C. Questo gruppo comprende la maggior parte dei microrganismi di interesse alimentare, tra i quali molte specie alteranti e alcuni batteri potenzialmente patogeni come *Salmonella* spp., *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. I funghi (lieviti e muffe) sono in grado di svilupparsi in un intervallo di temperatura molto ampio, pur avendo valori ottimali compresi tra 25 e 30°C. I microrganismi termofili sono caratterizzati da una temperatura ottimale di crescita superiore a 40°C. La maggior parte dei termofili di interesse alimentare appartiene ai generi *Lactobacillus* (*Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*, ecc.), *Streptococcus* (*S. thermophilus*), *Geobacillus*, *Alicyclobacillus*, *Thermoanaerobacter*, *Paenibacillus*; fanno parte di questo gruppo anche alcune specie del genere *Bacillus* (*B. thermoleovorans*, *B. coagulans*) e alcune specie e ceppi del genere

Clostridium. Questi ultimi generi hanno grande importanza nell'industria conserviera (in particolare nella produzione di succhi di frutta) per la loro capacità di produrre spore. La sporulazione può avvenire in un intervallo di temperatura compreso tra 15 e 41 °C; le spore sono generalmente caratterizzate da elevata resistenza alle alte temperature e alle condizioni stressanti in generale.

Al di là di questa classificazione, nell'industria alimentare assumono particolare importanza i microrganismi definiti psicotrofi, caratterizzati da valori ottimali di temperatura compresi nell'intervallo definito per i microrganismi mesofili, ma in grado di mantenere una buona attività metabolica anche a basse temperature, incluse quelle di refrigerazione. Fanno parte di questo gruppo specie dei generi *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Brochothrix*, alcuni funghi e anche diversi batteri patogeni. Questi microrganismi possono essere causa di alterazione di alimenti freschi o trasformati conservati a basse temperature e possono anche comportare rischi igienico-sanitari poiché comprendono specie patogene mesofile con attitudine psicotrofa, come *Listeria monocytogenes*. Infatti, l'impiego di temperature di refrigerazione non determina la sanificazione dell'alimento, ma piuttosto l'allungamento più o meno pronunciato della fase di latenza della curva di crescita dei microrganismi con attitudine psicotrofa e l'inibizione della crescita di quelli con caratteristiche mesofile o termofile. A temperature più basse rispetto a quella ottimale, i microrganismi psicotrofi producono talvolta elevati livelli di polisaccaridi. Esempio ben noto di tale fenomeno è la produzione di filamenti (rope) nel latte e nel pane, mentre nelle carni l'aumentata sintesi di polisaccaridi si manifesta con la formazione di una patina superficiale viscida, tipica dell'alterazione batterica in wurstel, pollame e carne bovina macinata.

La temperatura massima di crescita è rappresentata dalla temperatura alla quale il metabolismo cellulare non è più in grado di tradursi in moltiplicazione cellulare. Questo valore non coincide, anche se a volte può essere molto prossimo, alla temperatura di morte, cioè alla temperatura alla quale le cellule cominciano a soccombere. Per un determinato microrganismo il limite massimo

di temperatura per la crescita non è immutabile; infatti, può essere aumentato di qualche grado in seguito all'instaurarsi di risposte allo stress che comportano modificazioni del metabolismo e di alcune strutture vitali come la membrana cellulare. Per esempio, i microrganismi termofili sono caratterizzati da membrane cellulari rigide perché ricche di lipidi saturi o ramificati e possiedono enzimi in grado di esplicare le loro funzioni metaboliche a elevate temperature. Inoltre questi microrganismi possono produrre le cosiddette heat-shock protein, in grado di proteggere i processi cellulari e di conferire resistenza nei confronti di stress termici (come trattamenti termici blandi) o di altra natura (acido, osmotico ecc.). La temperatura minima di crescita, che caratterizza ogni specie microbica, sembra direttamente correlata alla perdita di funzionalità della membrana. Per questa ragione, i microrganismi che crescono a basse temperature modificano la composizione della propria membrana cellulare aumentando la proporzione di acidi grassi insaturi che le conferiscono maggiore fluidità consentendo il mantenimento della funzionalità (Nedwell, 1999).

2.3.2 Umidità relativa dell'ambiente

Le condizioni in cui un alimento viene mantenuto sono importanti in relazione non solo alla temperatura, ma anche all'umidità relativa dell'ambiente di stoccaggio (UR, espressa in percentuale). Gli alimenti non confezionati tendono infatti a raggiungere più o meno rapidamente un equilibrio con l'ambiente che li circonda e, a seconda delle condizioni in cui si trovano, possono essere soggetti a scambi di umidità con l'ambiente stesso. In generale, se la sua sicurezza e la sua stabilità dipendono da una bassa aw, un alimento deve essere conservato in condizioni ambientali tali da impedire l'assorbimento di umidità dall'ambiente, poiché ciò determinerebbe un innalzamento di aw favorevole alla crescita microbica. Per contro, alimenti con valori di aw elevati posti in ambienti con bassa UR(%) tendono a perdere acqua per raggiungere un equilibrio con l'ambiente esterno (Parente e Villani, 2012); questa migrazione di

acqua dall'interno all'esterno dell'alimento può comportare una perdita di umidità e fenomeni di disidratazione superficiale poco gradevoli. Nella scelta del l'UR(%) di stoccaggio occorre quindi considerare il duplice aspetto della possibile contaminazione microbica e della qualità organolettica dell'alimento e devono essere comunque presi in considerazione anche altri fattori, come una modifica della composizione dei gas dell'atmosfera di conservazione in grado di ritardare la contaminazione superficiale dell'alimento senza abbassare l'UR(%). Anche la temperatura di stoccaggio svolge un ruolo fondamentale da questo punto di vista. In un sistema chiuso, infatti, al crescere della temperatura diminuisce l'UR (%), e viceversa. Per questa ragione, a temperature di refrigerazione può crearsi condensa sulle superfici, favorendo la crescita di lieviti, muffe e di alcuni batteri aerobi che causano un'alterazione superficiale. Anche gli alimenti possono essere soggetti a una condensazione di acqua in superficie per effetto di sbalzi di temperatura; la scelta delle caratteristiche del packaging assume dunque un'importanza fondamentale, poiché un materiale idoneo può impedire gli scambi di umidità con l'ambiente e ridurre così le possibilità di sviluppo microbico.

2.4 FATTORI DI STRESS

2.4.1 Introduzione

I microrganismi durante la trasformazione dei prodotti alimentari sono soggetti a diverse condizioni di stress come ambiente acido, alte e basse temperature, stress ossidativo, stress osmotico, presenza di composti tossici ecc. (van de Guchte et al., 2002), a cui rispondono attivando meccanismi di adattamento i quali a loro volta influenzano la sopravvivenza e le prestazioni tecnologiche del microrganismo stesso.

Lo stress può essere definito come un cambiamento a livello del genoma, e del proteoma del batterio e si traduce in una diminuzione della velocità di crescita e della sopravvivenza del medesimo (Spano e Massa, 2006; Sugimoto et al., 2008).

I fattori di stress, possono essere di natura chimica, fisica o biologica. Alcuni sono di origine ambientale (ad esempio, temperatura, pressione osmotica, pH, concentrazione di etanolo, ossigeno disponibile, presenza di bile, antimicrobici), mentre altri possono essere autogenerati (acidità, bassa disponibilità di nutrienti come risultato del metabolismo, la generazione di specie reattive dell'ossigeno) (van de Guchte et al., 2002; Miyoshi et al., 2003; Spano e Massa 2006; Bruno-Bárcena et al., 2010).

Pertanto, sia lo stato fisiologico delle cellule sia i fattori ambientali interessano il meccanismo di risposta allo stress. I batteri lattici hanno sviluppato sistemi di rilevamento degli stress che permettono di attivare meccanismi di difesa atti a resistere a condizioni difficili o cambiamenti ambientali improvvisi (van de Guchte et al., 2002; Spano e Massa, 2006; Lorca e Font de Valdez 2009).

Il tempo necessario affinché un microorganismo possa attivare meccanismi di difesa contro condizioni ambientali avverse dipende dalla natura dello stress. Ad esempio, i batteri rispondono più rapidamente allo shock osmotico e allo shock termico (minuti) rispetto allo shock da freddo (ore) (Wouters et al., 2001; Rosen e Ron. 2002; Spano e Massa, 2006). Inoltre la risposta allo stress si basa sull'espressione coordinata di geni che alterano i processi cellulari, come la divisione cellulare, il metabolismo, la composizione della membrana, il trasporto (van de Guchte et al., 2002). Tali risposte allo stress vengono realizzate da reti di regolatori che consentono alla cellula di reagire ai complessi cambiamenti che influenzano la sopravvivenza e la crescita cellulare.

I sistemi di resistenza allo stress possono essere suddivisi in tre classi:

- (1) specifici, effetto indotto da una dose sub-letale di stress. Questa risposta adattativa è di solito associata alla fase log di crescita e comporta l'induzione di specifici gruppi di geni o regolatori concepiti per far fronte a condizioni di stress specifici;

- (2) generali, in cui l'adattamento ad una condizione di stress può rendere le cellule resistenti ad altre condizioni ambientali sfavorevoli;
- (3) risposta allo stress associata alla fase stazionaria che comporta l'induzione di numerosi regolatori intesi a superare diverse condizioni di stress. A differenza della risposta adattativa, la risposta associata alla fase stazionaria non richiede alcuna preesposizione allo stress (Lorca e Font de Valdez, 2009) e può essere descritta come una risposta allo stress di tipo generale (Van de Guchte et al., 2002).

A volte, come nel caso di alte temperature e stress acido, possono essere presenti meccanismi multipli di risposta allo stress (van de Guchte et al., 2002; Azcárate-Peril et al., 2004). La resistenza crociata, in cui una condizione sfavorevole può rendere le cellule maggiormente resistenti ad altri stressori, è, infatti, una cosa comune tra i sistemi di resistenza dei batteri lattici, ma sembra variare tra le specie (Van de Guchte et al., 2002). In tabella 2.3 è riportata una panoramica delle diverse sollecitazioni e i meccanismi di resistenza a cui i batteri lattici sono sottoposti. Da questa tabella, si evince anche come alcuni effettori quali DnaK e GroEL giocano un ruolo centrale nella risposta allo stress.

Stress response	Reported stress cross-resistance	Stress-related resistance mechanism	Involved stress-related proteins (enzymes)
<p>Acid stress response</p> <p><i>Two general types</i></p> <p>During log growth phase (l-ATR; induced by nonlethal low pH) In stationary phase, induction of general stress response</p>	<p>Heat, osmotic, oxidative (varies between species)</p>	<p>Activation of arginine deiminase pathway production of basic compounds (e.g., ammonia)</p> <p>ATP-dependent expulsion of protons by proton pumps</p> <p>Amino acid decarboxylation reactions and electrogenic transport</p> <p>Change in cell envelope composition</p> <p>Repair of damaged proteins, DNA, and cell components</p>	<p>F₀F₁-ATPase</p> <p><i>Two general types</i> K⁺-ATPase</p> <p>Arginine deiminase</p> <p>Urease</p> <p>Ornithine/arginine/lysine decarboxylase</p> <p>Lo18</p> <p>Ffh</p> <p>Heat shock chaperones and regulators (DnaK, GroEL; HrcA, CtsR)</p> <p>recA, AP endonuclease, UvrSystem</p> <p>Glutathione peroxidase, glutathione reductase</p> <p>Thioredoxin, thioredoxin reductase</p>
<p>Oxidative stress response</p>	<p>Heat, acid, general stress resistance</p>	<p>Incremental expression of regulators that promote minor or global responses</p> <p>Induction of heat shock proteins</p> <p>Reducing intracellular environment</p> <p>Prevention of reactive oxygen species Formation</p> <p>Target protection</p> <p>Repair of oxidative damage</p>	<p>NADH oxidase</p> <p>Catalase</p> <p>Pseudocatalase</p> <p>Superoxide dismutase</p> <p>Methionine sulfoxide reductase</p> <p>Mannose phosphotransferase system</p> <p>FLP (FNR-like proteins)</p> <p>RecA</p> <p>Phosphate ABC transporter</p>
<p>Cold stress response</p> <p>Transient adaptive response, i.e., cold</p>	<p>Heat shock, freezing (cryotolerance)</p>	<p>Production of cold-induced proteins (CIPs) to maintain membrane fluidity Sugar metabolism</p>	<p>CIPs involved in Transient adaptive response, i.e., cold</p>

shock response		(Hpr, CcpA, b-PGM, b-phosphoglucomutase) DNA supercoiling Chromosome structuring (HslA) Transcription and translation	shock response b-phosphoglucomutase Transcription and translation Signal transduction (LlrC) Stress adaptation (OsmC) Proteolysis of misfolded proteins (ClpX ATPase) Cold shock proteins (CSPs) CspA-CspG, vary in number according to Species
Osmotic stress response	Heat shock	Exchange of compatible solutes to maintain osmotic balance	ATP-dependent uptake system (QacT) or ABC transporter (OpuA or BusA) (species-dependent) for uptake of glycine-betaine, carnitine, and proline during hyperosmotic stress conditions, efflux by unidentified channel protein
Heat stress response	Acid, oxidative, cold, osmotic, alcohol	Production of heat-inducible chaperones Chaperone complexes DnaK-GrpE-DnaJ and GroES-GroEL Production of heat-inducible proteases HtrA/DegP protease, FtsH/HflB protease, Clp proteases (ClpB, C, E, P, Q, X and Y), Lon protease	Chaperone complexes DnaK-GrpE-DnaJ and GroES-GroEL HtrA/DegP protease, FtsH/HflB protease, Clp proteases (ClpB, C, E, P, Q, X and Y), Lon protease Trigger factor, HrcA, HSP10, HSP23 (ClpP), HSP26, HSP33, HSP40, DnaK/HSP70, GroEL/HSP60, HSP84, HSP85, HSP100

		Production of heat shock proteins	
Bile stress response	Heat	Metabolism of bile salts Bile salt hydrolase (BSH) Adaptation to bile stress DnaK, GroEL MDR efflux	Small heat shock proteins (sHSPs), e.g., Lo18, HSP18.5, HSP18.55, HSP19.3, HSP16.4, HSP20 Bile salt hydrolase (BSH) DnaK, GroEL
Ethanol stress response	Heat, acid	Regulation of metabolism Production of heat shock proteins	sHSPs: HSP18
Nutrient starvation stress Response	Heat, oxidative, ethanol, acid, osmotic	Modification of cell morphology General stress proteins	Proteins involved in amino acid catabolism (carbamate kinase, putative glycine cleavage system, l-serine dehydrogenase)

Tabella 2.3 - Meccanismi di risposta allo stress

Un meccanismo di risposta a condizioni avverse comune ai batteri è il cambiamento dei fattori sigma (Haldenwang 1995). In *Escherichia coli* e altri batteri enterici, sigma S (RpoS) è il più importante regolatore per la risposta allo stress nelle cellule. In *Bacillus* e *Listeria*, il gene implicato nell'induzione del regolatore RpoS è *sigB*, per la regolazione della risposta allo stress (Völker et al., 1994; Becker et al., 1998) e anche per la regolazione della virulenza di *Staphylococcus aureus* (Bischoff et al., 2001). *B. subtilis* risponde agli stress ambientali mediante la produzione di oltre 40 geni sotto il controllo del fattore di trascrizione σ_B (Haldenwang, 1995; Akbar et al., 1997) quest'ultimo comprende il gene catalasi *katE*, il gene che codifica per un trasportatore prolina osmoregolatore *opuE*, il gene *clpC*, il gene *gtaB* che codifica per una pirofosforilasi UDP-glucosio coinvolta nella sintesi del trealosio, e molti altri geni (Abee e Wouters, 1999). La differenza maggiore che esiste tra i batteri lattici e *Bacillus*, è l'assenza di un ologone σ_B , mentre sono presenti sia le diverse proteine da stress (ad esempio, DnaK, GroEL, Clp) sia i regolatori (HrcA e CtsR). Nei lattobacilli, la risposta allo stress è controllata negativamente dai regolatori HrcA e CtsR e dai sistemi a due componenti (Lorca e Font de Valdez, 2009). Un sistema di regolazione a due componenti di *Lb. acidophilus*, per esempio, ha dimostrato di essere coinvolto nella risposta allo stress acido e da etanolo (Azcárate-Peril et al., 2005). Dunque, non è ancora chiaro come i lattobacilli contrastino i vari fattori di stress, se attraverso i regolatori trascrizionali globali o mediante sistemi di regolazione a due componenti, o per mezzo di entrambi i meccanismi (Lorca e Font de Valdez, 2009), per questo studi di genomica e proteomica stanno contribuendo notevolmente allo studio delle interazioni tra le diverse risposte allo stress (Lim et al., 2000;. Gouesbet et al., 2002;. Marceau et al., 2004;. Xie et al., 2004; Azcárate-Peril et al., 2005;. Pieterse et al., 2005;. Denou et al., 2007; Stevens et al., 2010).

2.4.2 Importanza della risposta allo stress dei batteri

I batteri lattici giocano un ruolo fondamentale nella produzione di alimenti e nella salute umana. La resistenza ad alcuni fattori di stress come ad esempio agli acidi è considerata una proprietà funzionale e, quindi, una caratteristica utile per i batteri lattici impiegati come colture starter o probiotici. Per quanto riguarda gli agenti patogeni come *L. monocytogenes* la sopravvivenza in ambiente acido, quale lo stomaco, viene considerata un fattore di virulenza. Dunque, l'importanza industriale della risposta allo stress risiede nell'impiego sicuro dei batteri lattici implicati nelle produzioni alimentari (Franz et al., 2010); per garantire la sopravvivenza dei ceppi probiotici in numero elevato affinché possano espletare i propri effetti funzionali, vengono adottate diverse strategie. In primo luogo, la loro sopravvivenza è migliorata progettando opportuni metodi di manipolazione, stoccaggio, e produzione, ad esempio, utilizzando contenitori impermeabili all'ossigeno o la microincapsulazione o l'incorporazione di nutrienti protettivi o di buffer nel prodotto alimentare (Kailasapathy e Supriadi, 1996; Ravula e Shah, 1998; Shah, 2000; Sultana et al., 2000). In secondo luogo, sono selezionati i ceppi resistenti allo stress in grado di sopravvivere alle condizioni incontrate durante la produzione fino all'applicazione finale. Un'ulteriore opzione è la combinazione dei due metodi precedenti, vale a dire la scelta di ceppi resistenti e l'ideazione di metodi di produzione che possano consentire un'adeguata sopravvivenza del microrganismo.

2.4.3 Stress termico

Il calore provoca molteplici danni cellulari soprattutto a carico delle proteine, della membrana citoplasmatica e degli acidi nucleici (Teixeira et al., 1997). Lo stress termico altera anche il gradiente protonico trans-membrana della cellula, portando ad una diminuzione del pH intracellulare (Weitzel et al., 1987).

Quando le cellule sono esposte ad una condizione di stress termico rispondono attraverso la sintesi di molecole proteiche altamente conservate, denominate heat shock proteins (HSPs) (Lindquist e Craig, 1988). Queste proteine promuovono il corretto ripiegamento delle proteine neosintetizzate (Bukau e Horwich, 1998), l'assemblaggio dei complessi proteici e la traslocazione delle proteine verso altri distretti cellulari (Bukau et al., 1998).

Lo stress termico in *Lactobacillus* spp. è stato studiato analizzando sia l'effetto sulla crescita microbica sia l'effetto sulla sopravvivenza cellulare nonché apprezzando la variazione del corredo proteico.

In generale, la risposta allo stress può essere suddivisa in due classi; in una risposta specifica e in una risposta generale. Nella risposta specifica, le cellule che sono sottoposte ad una condizione di stress sub-letale sviluppano una capacità di adattamento ad una condizione letale dello stesso fattore di stress. Nella risposta generale allo stress, le cellule sottoposte ad una condizione sub-letale di uno specifico fattore di stress, sviluppano una resistenza non solo ad una condizione letale dello stesso fattore di stress ma sono in grado di resistere anche a fattori di stress differenti da quello che ha indotto l'insorgenza della resistenza (Pichereau et al., 2000). Ad esempio, le cellule di *Lb. acidophilus* pre-incubate ad una concentrazione sub-letale di cloruro di sodio, risultano essere più resistenti allo stress termico rispetto alle cellule che non sono state sottoposte allo stress salino (Kim et al., 2001). Dal punto di vista molecolare, lo shock termico promuove l'induzione della sintesi di HSPs in differenti batteri Gram positivi (Smeds et al., 1998). I due principali gruppi di HSPs si distinguono in proteine di 70 kDa (DnaK) e in proteine da 60 kDa (GroEL) (Hendrick e Hartel, 1993).

L'incremento della concentrazione citoplasmatica di GroEL favorisce la vitalità in seguito al congelamento e alla liofilizzazione delle cellule. Il gene *htrA* che codifica per una proteinasi specifica potrebbe essere coinvolta nello stress termico (Bass et al., 1996). L'espressione della proteina *htrA* è aumentata di otto volte a livello trascrizionale nel *Lb. helveticus* CNRZ32, in

risposta all'esposizione al cloruro di sodio (4%) (Smeds et al., 1998). Il complesso CIP è una proteasi che degrada piccoli peptidi (Suzuki et al., 1997). I batteri contengono un numero variabile di CIP ATP dipendente (CIP-ATPase) che potrebbero avere attività di *chaperone* (i *chaperones* molecolari comprendono diverse famiglie di proteine altamente conservate; molti di questi sono anche *heat shock protein*. Il loro ruolo è legato al mantenimento della struttura delle proteine). Quando la componente proteolitica CIP si associa con quella *chaperonica* CIP-ATPase il risultante complesso mostra un'attività proteasica contro specifici substrati, determinati dalla subunità CIP ATPase. Dopo lo shock termico non letale la subunità proteasica CIP degrada le proteine danneggiate, che non possono essere rimodellate dal punto di vista molecolare dalla CIP-ATPase. Un esempio è stato riscontrato nel *Lactococcus lactis* (Ingmer et al., 1999).

La risposta allo stress termico da parte di *Escherichia coli* è mediata da rpoH- codificato, la velocità di sintesi e la stabilità di queste aumenta rapidamente all'aumentare della temperatura. *Bacillus subtilis* possiede quattro classi di geni che codificano per lo stress termico classificati secondo il proprio regolatore: classe I, controllate da CIRCE (*Controlled Inverted Repeat of Chaperone Expression*) *regulon* e proteina HrcA (Schulz et al, 1996); classe II, controllata dai promotori σ^B dipendente indotte da stress acido termico osmotico e dalla conservazione dei nutrienti (Petersohn et al., 2001; Price et al., 2001); classe III, controllato dal gene repressore, CtsR (Derrè et al., 1999); classe IV, con un meccanismo di regolazione sconosciuto. Un elemento CIRCE è stato trovato a monte del gene dnaJ negli operoni hrcA-grpE-dnaK. Analisi di trascrizione hanno mostrato che l'operone dnaK di *Lb. sakei* è preceduto da un promotore σ^A tipo e che questo sito varia a seconda delle condizioni di stress (Schmidt et al., 1999).

2.4.4 Stress da freddo

I batteri esposti a improvvise diminuzioni della temperatura, subiscono modificazioni nella struttura e nella funzione di molecole e strutture biologiche, nello specifico si può parlare di una

riduzione della fluidità della membrana biologica, cambiamenti nella struttura super-elicoideale del DNA e nella formazione di strutture secondarie stabili del materiale genetico, che compromettono sia i processi replicativi che di sintesi proteica. Affinchè i microrganismi possano superare questi effetti deleteri e assicurare la normale ripresa dell'attività cellulare, i batteri hanno sviluppato un meccanismo transitorio adattativo in risposta allo stress da freddo (Graumann e Marahiel, 1998).

L'adattamento alle basse temperature è di vitale importanza, poiché molte fermentazioni con i batteri lattici vengono avviate con l'aggiunta al terreno di coltura di crescita ceppi batterici congelati o liofilizzati. I lattobacilli si adattano naturalmente alle basse temperature; essi continuano a crescere, ma a velocità ridotta sino a ventigradi al disotto della temperatura ottimale di crescita. Il congelamento causa condizioni di stress poiché le cellule possono essere danneggiate, non solamente dalla formazione dei cristalli di ghiaccio, ma anche dall'elevata osmolarità dovuta alla concentrazione dei soluti intracellulari.

Differenti fattori, quali la natura del ceppo batterico, le condizioni di crescita, l'invecchiamento del ceppo batterico e persino la natura del mezzo di coltura, influenzano in maniera determinante la sopravvivenza del batterio dopo il congelamento (Bâati et al., 2000).

Si è osservato che a seguito dell'abbassamento della temperatura nei batteri si assiste come meccanismo adattativo ad un aumento della proporzione di corte e insature catene di acidi grassi nella membrana plasmatica, che consentono una successiva e migliorata attività di pompa ionica e di ingresso dei nutrienti nella cellula batterica.

Il congelamento delle cellule batteriche in presenza di opportuni crioprotettori determina una perdita minore della vitalità degli stessi poiché tali sostanze contrastano la rimozione dell'acqua durante la liofilizzazione. Soluti come glicina, prolina e carnitina svolgono un ruolo cruciale come osmoprotettori e adattamento al freddo. La tolleranza di *Lb. delbrueckii* al congelamento e successivo scongelamento a 37°C è indotto dal pre-trattamento con vari soluti. Il

dimetilsulfossido (DMSO) mostra il maggior effetto crio-protettivo rispetto al glicerolo, in virtù di una migliorata sostituzione del soluto nei confronti dell'acqua intracellulare (Pannoff et al., 2000). L' adonitolo, che può essere metabolizzato da più lattobacilli, ha mostrato un effetto protettivo durante la liofilizzazione controllando il contenuto di acqua. Inoltre, l'esposizione ad altri stress ambientali migliora la sopravvivenza dei lattobacilli al congelamento. E' stato osservato che la sopravvivenza al gelo aumenta esponendo le cellule a 55°C per 30-45 min o a 1.25% di NaCl (Walker et al., 1999).

Una rapida induzione di proteine chiamate *cold-induced proteins* (CIPs) sono state identificate nei lattobacilli a seguito dello stress da freddo. Probabilmente, la loro sintesi è avviata allo scopo di mantenere una elevata fluidità di membrana, garantita da una maggiore presenza di corte catene di acidi grassi polinsaturi. A seguito dell'adattamento alle basse temperature sono state identificate in *Lb. lactis* CIPs coinvolte in numerose funzioni, tra le quali cambiamenti nel metabolismo degli zuccheri, nella struttura cromosomica e nei segnali di trasduzione del segnale (Wouters et al., 2000). Molecole CIPs di basso peso molecolare sono spesso distinte da altre proteine indotte poiché esse appartengono alla famiglia delle *cold shock protein* (CSP). Il numero di CSPs varia molto nei differenti batteri lattici e due geni *csp* specifici sono stati trovati in *Lb. lactis* subsp. *lactis* (Bolotin et al., 2001). Analisi sull'RNA messaggero hanno mostrato che la relativa abbondanza dei trascritti dei geni *cspC*, *cspL* e *cspP* in *Lb. plantarum* varia in modo significativo dopo una diminuzione della temperatura e durante la crescita in condizioni ottimali. Durante lo shock da abbassamento termico, *cspL* è soggetta ad una transitoria induzione, mentre non cambiano o si modificano solo leggermente i messaggeri di *cspC* e *cspP*. Inoltre, i CSPs sono importanti non solamente nell'adattamento alle basse temperature, ma anche durante la normale crescita batterica (Derzelle et al., 2000).

2.4.5 Stress acido

L'acidità è un importante stress ambientale a cui i batteri lattici vanno incontro durante la fermentazione di cibi e bevande. Il pKa dell'acido lattico è 3.86 e la sua forma indissociata entra nelle cellule per mezzo di un carrier. A pH citoplasmatico, l'acido lattico si dissocia e porta alla fase stazionaria di crescita, anche se i nutrienti sono ancora disponibili.

I lattobacilli probiotici sono esposti a stress acido quando raggiungono lo stomaco dove i valori di pH sono molto bassi.

Diversi meccanismi regolano l'omeostasi del pH, comprendono le pompe protoniche F₀F₁-ATPasi, la decarbossilazione degli aminoacidi, l'espressione delle stress protein generali (GSP) e *chaperon* che riparano o degradano il DNA e le proteine danneggiate, la sintesi di composti alcalini, e la modifica della composizione della membrana cellulare (Cotter e Hill, 2003).

Sulla membrana batterica è collocato un enzima che trasferisce protoni in un processo richiedente energia. Questo enzima è stato studiato nel *Lb. plantarum* e la sua attività è ottimale a valori di pH extracellulari inferiore a 7 (Bender e Marquis, 1987; Nannen e Hutkins 1991; Hong et al., 1999).

La via dell'arginina deaminidasi (ADI) è un altro meccanismo di risposta allo stress acido. Tale via è composta di tre enzimi: ADI, ornitina transcarbaminolasi e la carbammato chinasi. Una quarta proteina di trasporto membranaria, che catalizza lo scambio neutrale (senza carica) di arginina e ornitina, è anch'essa fondamentale nel meccanismo di risposta generale allo stress acido. In questo metabolismo viene generata ammoniacca che è una base che regola in tal modo il pH ottimale di sopravvivenza cellulare (Marquis et al., 1987). Inoltre l'ATP prodotto attraverso la via ADI consente l'estrusione di protoni citoplasmatici da F₀F₁ ATPasi e può aiutare le cellule a sopravvivere più a lungo dopo l'esaurimento della fonte di energia primaria. (Arena et al., 1999; Stuart et al., 1999).

La sopravvivenza cellulare in condizioni di severa acidità è positivamente collegata a un adattamento a bassi valori di pH, processo noto come ATR (*acid tolerance response*) (Foster et al., 1991). Cellule adattate di *Lb. delbrueckii* per 30 minuti a pH 4,75, sono approssimativamente 250 volte più tolleranti a condizioni di letalità (30 minuti a pH 3,5), rispetto a cellule non adattate. Due mutanti acido tolleranti di *Lb. sanfranciscensis* CB1 sono stati isolati a seguito di una prolungata esposizione (24 ore) a pH 3,2. La tolleranza ATR sembra essere collegata ad una modificazione della sintesi proteica indotta dalle proteine ASPs (*acid shock proteins*). L'inibizione della neosintesi di ASPs da cloramfenicolo reverte la tolleranza ATR nel *Lactobacillus lactis* ssp. *lactis* (O'Sullivan et al., 1997) ed anche in *Lb. sanfranciscensis* (De Angelis et al., 2001). Questi dati confermano che perlomeno in alcuni ceppi batterici la tolleranza allo stress acido è legata alla sintesi di nuove proteine. Studi condotti con l'analisi elettroforetica bidimensionale ha mostrato l'induzione di un elevato numero di ASPs: almeno 30 in *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* (Lim et al., 2000) ed anche che alcune HSPs sono indotte durante l'adattamento acido, mostrando una grande variabilità secondo la specie batterica considerata. In *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* GroES, GroEL e DnaK sono molto espresse, rispetto al controllo non adattato.

Ceppi batterici selezionati come probiotici devono essere capaci di tollerare gli acidi biliari. Sebbene la tossicità degli acidi biliari nei confronti dei batteri non sia ancora perfettamente conosciuta, gli acidi biliari sono molecole che agiscono superficialmente disaggregando la membrana biologica, in quanto detergenti. Gli acidi biliari sono sintetizzati dal colesterolo, coniugati alla glicina o taurina nel fegato da dove migrano nell'intestino. Qui, sono efficacemente neutralizzati dai batteri che idrolizzano l'aminoacido mediante enzimi chiamati BSHs (*Conjugated bile salthydrolase*). Questi enzimi sono espressi anche in *Lb. plantarum* (De Smet et al., 1995) dove la capacità di resistere all'acido taurodeossicolico (TDCA) è dovuta alla presenza della TDCA idrossilasi. L'espulsione diretta della bile come meccanismo di resistenza è

stata caratterizzata nei batteri Gram negativi (Lomovskaya et al., 1992). Tale meccanismo è mediato da un trasportatore di efflusso, appartenente alla famiglia MDR (multidrugresistance). Al momento l'unico sistema di efflusso caratterizzato geneticamente è quello HorA ABC identificato in *Lb. brevis* (Sakamoto et al., 2001).

2.4.6 Stress osmotico

I lattobacilli sono spesso esposti a cambiamenti nella concentrazione dei soluti; tuttavia, è necessario che essa rimanga relativamente costante (Poolman et al., 1998). In presenza di stress iper-osmotico, si assiste ad un movimento di acqua dall'interno della cellula verso l'ambiente extracellulare causando una perdita del turgore cellulare, del volume cellulare e della concentrazione intracellulare dei soluti.

Allorchè cellule in fase esponenziale di *Lb. acidophilus* sono incubate in un mezzo iper-osmotico (18% NaCl per 2 ore), la sopravvivenza delle cellule diminuisce del 46%, aumentando quando le cellule sono adattate a crescere per 1 ora alla concentrazione salina del 2%, nonché ad un aumento della resistenza agli acidi biliari. (Kim et al., 2001). Lo stress iper-osmotico induce la trascrizione degli operoni *dnaK* e *htrA* nel *Lb. sakei* (Schmidt et al., 1999).

Per trattenere acqua nella cellula e per mantenere il turgore i lattobacilli hanno adottato sistemi per accumulare specifici soluti pur non interferendo con le attività cellulari. La crescita di *Lb. plantarum* è inibita fortemente dallo stress iper-osmolare quando soluti organici compatibili, come la carnitina o la glicina betaina non sono disponibili nel mezzo extracellulare (Glaasker et al., 1996). Studi di inattivazione genica hanno dimostrato che un sistema di trasporto attivato dallo stress iper-osmotico protegge le cellule di *Lb. plantarum*, anche se è probabile che lo stress induca più a una modifica dell'attività enzimatica che ad una aumentata espressione genica.

Durante uno shock ipo-osmotico alcuni soluti sono rilasciati rapidamente dalle cellule batteriche. Nel caso di *Lb. plantarum* a seguito dello stress si verifica un rapido efflusso di prolina e glicina

betaina, mentre il pool di altri aminoacidi rimane inalterato (Glaasker et al., 1996). La natura dei canali che consentono il transito dei soluti non è stata ben chiarita; tuttavia, sembrerebbero essere di natura differente rispetto ai canali energeticamente dipendenti. Infatti, in questo caso l'efflusso dei soluti è estremamente rapido, indipendente dall'energia metabolica e in molti casi inibito dagli ioni gadolinio (Gd^{3+}), che blocca questa tipologia di canali (Martinac et al., 1990).

2.4.7 Stress ossidativo

Lo stress ossidativo è riferito a quella condizione in cui la produzione di radicali liberi altera in maniera significativa il meccanismo di funzionamento cellulare. I quattro elettroni liberati durante la riduzione da ossigeno ad acqua, comportano la produzione di radicali liberi intermedi: l'anione superossido (O_2^-), l'acqua ossigenata (H_2O_2), il radicale ossidrilico (HO). Il radicale superossido e l'acqua ossigenata possono contribuire alla formazione di radicali ossidrilici, attraverso la reazione di Fenton e quella di Haber-Weiss (McCormick et al., 1998). Lo ione superossido può diffondere a notevoli distanze dal luogo di produzione e raggiungere potenziali bersagli ed è più reattivo verso le proteine intracellulari di quanto lo siano l'acqua ossigenata e il radicale idrossilico (Fridovich, 1999).

I lattobacilli non avendo mitocondri non possiedono una catena di trasporto elettronico classica, ma hanno delle ossidasi che utilizzano ossigeno per ossidare substrati, quali il piruvato (Sedewitz et al., 1984). Il sistema delle ossidasi è un modo per rigenerare NAD^+ prodotto, unitamente alla conversione del piruvato a lattato o etanolo. Queste ossidasi possono produrre radicali liberi (ROS), causando stress ossidativo.

Per contrastare efficacemente la produzione dei radicali liberi nella cellula gli organismi viventi, ed anche i batteri, possiedono molecole antiossidanti capaci di neutralizzare i radicali liberi. Come la catalasi, la superossido dismutasi (SOD), lo ione manganese (Mn^{2+}), l'ascorbato, i tocoferoli, e il glutatione ridotto (GSH) a ridurre i radicali dell'ossigeno (Archibald et al., 1981).

La capacità di far fronte ai radicali liberi varia dal tipo di batterio, in considerazione del tipo e dei livelli delle molecole antiossidanti presenti nella cellula. Ad esempio, *Lb. sanfranciscensis* non mostra attività catalasica, pertanto la rimozione dell'acqua ossigenata è affidata all'attività della perossidasi NADH dipendente (Stolz et al., 1995). In questo batterio in assenza di un substrato fermentabile si ha accumulo di acqua ossigenata, poiché a differenza dell'enzima catalasi, la perossidasi NADH dipendente richiede un metabolismo attivo a produrre quantità sufficienti di NADH (Stolz et al., 1995). Nel ceppo batterico *Lb. sakei* LTH677 il gene *katA* codifica per la catalasi. L'aggiunta di acqua ossigenata, come anche il passaggio da una condizione di crescita anaerobica a quella in presenza di ossigeno, risulta in un drammatico aumento dell'attività del gene *katA* (Hertel et al., 1998). Il gene *trxB* che codifica la tioredossina-reduttasi funziona come un enzima accessorio per la ribonucleasi reduttasi, responsabile di una fase determinante per la sintesi del DNA, ovvero la riduzione dei ribonucleotidi a deossi-ribonucleotidi. In *Escherichia coli* *trxB* svolge un ruolo essenziale nel mantenere lo stato riducente delle proteine citoplasmatiche. Questo gene in *O. oeni* è indotto in presenza di acqua ossigenata o delle HSPs (Jobin et al., 1999). Allo scopo di confermare il coinvolgimento di *trxB* nella protezione contro lo stress ossidativo nel batterio *Lb. johnsonii*, il gene è stato rimosso e inserito in un ceppo di *E. coli* (AD494) privo di tale gene. Questo ceppo ricombinante si è dimostrato più resistente all'accumulo di ponti disolfuro, rispetto al ceppo parentale (Jobin et al., 1999).

2.4.8 Stress da etanolo

La tossicità dell'etanolo nei confronti delle cellule microbiche è generalmente attribuita alla sua interazione con la membrana citoplasmatica e in generale a cambiamenti nella fisiologia cellulare. Inoltre è stato dimostrato che l'esposizione dei microrganismi a forti concentrazioni di etanolo porta alla perdita di molecole e/o ioni essenziali per la crescita cellulare (Osman et al.,

1985), come anche alla dissipazione del gradiente elettrochimico attraverso la membrana plasmatica (Leão et al., 1984).

A differenza dei lieviti, esistono pochi studi riguardanti i meccanismi di tolleranza all'etanolo nei batteri. I batteri Gram-negativi mostrano solitamente una forte sensibilità all'alcool etilico (Ingram, 1976); quest'ultimo determina rilevanti cambiamenti nella struttura della membrana cellulare, condizionandone l'integrità e causando una rapida morte cellulare (Dombek e Ingram, 1984). In *E. coli* l'etanolo determina cambiamenti nella composizione degli acidi grassi di membrana passando da 16 a 18 atomi di carbonio (Buttke e Ingram, 1978; Buttke e Ingram, 1980). Il ceppo *E. coli* KO11 non è in grado di tollerare elevate concentrazioni di etanolo prodotte durante la vinificazione (Yomano et al., 1998) ma i ceppi LYO1, LYO2, LYO3 sono molto più tolleranti. Con un'esposizione molto breve al 10% di etanolo, questi ceppi resistenti sopravvivono oltre il 50% in più del ceppo KO11 (Yomano et al., 1998).

O. oeni, principale responsabile della MLF, è un batterio Gram-positivo appartenente alla famiglia delle *Leuconostocaceae*. Come per i batteri Gram negativi, anch'esso quando inoculato direttamente nel vino al termine della fermentazione alcolica al fine di avviare la MLF, non sopravvive all'elevata concentrazione di etanolo (De Silveira et al., 2003).

La tolleranza o risposta adattativa dei batteri o lieviti all'etanolo è associata a un'elevata fluidità di membrana plasmatica, interpretata sulla base dell'ipotesi dell'adattamento omeo-viscoso (Sinensky, 1974). Questo adattamento non è applicabile a tutti gli organismi; delle eccezioni sono state descritte in letteratura per *Bacillus subtilis* (Rigomier et al., 1980) e *E. coli* (Dombek et al., 1984) in cui le membrane plasmatiche isolate dalle cellule cresciute in presenza di etanolo sono più rigide di quelle delle cellule di controllo.

Sebbene la composizione lipidica di membrana sia stata considerata come un importante fattore per la tolleranza a differenti stress cellulari, altri fattori hanno ricevuto considerevole attenzione. Un aspetto importante riguarda la sintesi delle "heat shock protein" (hsp's) (Jobin et al., 1997).

Infatti, alcuni autori hanno osservato che il prodotto del gene *fts H* è responsabile della resistenza allo stress sia termico sia osmotico. L'espressione di questo gene in *E. coli* fornisce resistenza all'alcol presente nel vino, al contrario in *O. oeni* non si verifica nessuna modifica nell'espressione di questo gene in presenza di stress da etanolo (Bourdineaud et al., 2003). Sempre in *O. oeni*, la sintesi della proteina Lo18 (18 kDa) è marcatamente aumentata a seguito di differenti stress ambientali e durante la fase stazionaria di crescita (Guzzo et al., 1997). Solitamente tale proteina è associata alla membrana citoplasmatica, evidenza che suggerisce un suo coinvolgimento nel mantenimento dell'integrità di membrana (Jobin et al., 1997).

La sopravvivenza dei microrganismi a una varietà di condizioni potenzialmente letali, può essere migliorata mediante una pre-esposizione al fattore di stress, esposizione che deve essere della stessa natura ma a effetto sub-letale. Ad esempio, cellule di *O. oeni* cresciute in presenza di etanolo ad una concentrazione pari all'8% sono in grado di mantenere inalterata la membrana plasmatica, le stesse cellule in seguito sopravvivono a concentrazioni di etanolo più elevate (Da Silveira et al., 2003). Silveira e coll. (2004) hanno dimostrato che nella fase di adattamento all'etanolo in *O. oeni* sono coinvolte proteine citoplasmatiche e di membrana.

Inoltre, l'aumentata sintesi dell'enzima glutatione reduttasi nelle cellule coltivate alla presenza di etanolo, suggerisce il probabile ruolo di un meccanismo ossido-riduttivo nel processo di adattamento. Inoltre, nelle cellule cresciute in presenza di etanolo sono state osservate alcune proteine associate alla membrana e in particolare due di queste, la dTDT-glucosio-4,6-deidratasi e la D-alanina-D-alaninilgasi sono coinvolte nella biosintesi della parete cellulare batterica (Silveira et al., 2004).

Lb. plantarum è uno dei batteri lattici più diffusi ed è anche ampiamente usato come "starter" nella produzione di differenti prodotti fermentati di origine sia vegetale sia animale, in cui stress termici e di acidità sono comuni. Sebbene il suo ruolo nella MLF sia considerato marginale, *Lb. plantarum* è solitamente isolato dai vini (Beneduce et al., 2004). Con l'eccezione di tre geni cold

shock (*cspL*, *cspP*, *cspC*) recentemente identificati nel ceppo batterico di *Lb. plantarum* NC8, (Derzelle et al., 2000) poco è noto sul meccanismo usato dal batterio per adattarsi ai cambiamenti delle differenti nicchie ecologiche. Recentemente sono stati isolati dal batterio due geni codificanti per heat shock protein chiamati *hsp18:5* e *hsp 19:3*. Analisi di RT-PCR hanno chiaramente rilevato che la trascrizione di questi due geni è regolata positivamente dallo shock termico e dallo stress etanologico. Nelle cellule sottoposte a stress termico, l'induzione dei due geni *hsp18:5* e *hsp 19:3* è osservato 15 minuti dopo lo stress ed entrambi sono indotti dall'etanolo 10% (Spano et al., 2004).

Differenti studi hanno dimostrato che ceppi di *Lb. plantarum* crescono nei vini ed hanno meccanismi di resistenza atti a tollerare alte concentrazioni di etanolo e bassi valori di Ph(G-Alegria et al. 2004; Lopez et al. 2008; Mugnaio et al. 2011). D'altro canto, si è osservato che alcuni ceppi di *Lb. plantarum* mostrano interessanti attività antimicrobiche inibendo la crescita di altri ceppi lattici enologici indesiderati. *Lb. plantarum* mostra anche un più accentuato profilo enzimatico, rispetto a *O. oeni*, che potrebbe giocare un ruolo importante nella modificazione del profilo aromatico del vino.

La selezione di ceppi batterici lattici di importanza enologica, dovrebbe essere basata essenzialmente su un'elevata attività malo-lattica, in condizioni di forte stress: temperatura, etanolo e tolleranza ai solfiti, nonché alla presenza di un "pattern" enzimatico, coinvolto nella produzione di desiderabili aromi enologici e dall'assenza di ammine biogene. Recentemente Bravo-Ferrada e coll. (2013) hanno rilevato la prevalenza di *Lb. plantarum* e *O. oeni* nel microbiota caratterizzante i vini rossi Merlot di Patagonia e Pinot nero. A seguito del loro isolamento tutti i ceppi sono stati capaci di consumare grandi quantità di acido malico, rispetto al ceppo batterico UNQ Oe73. In particolare tre ceppi di *Lb. plantarum*, chiamati UNQ Lp65.3, Lp97 e Lp133 sono stati in grado di consumare completamente dosi elevate di acido malico in appena tre giorni. Uno di questi ceppi, UNQ Lp133, è stato inoltre in grado di crescere come *O.*

oeni UNQ Oe73, nel vino sterile. L'enzima tannasi catalizza l'idrolisi di legami esteri dei tannini idrolizzabili, come l'acido tannico, rilasciando acido gallico e glucosio. I tannini a contatto dell'aria si ossidano a chinoni, formando un'indesiderabile torbidità al vino, nonché accentuata astringenza. Tutti i ceppi selezionati dai vini della Patagonia hanno mostrato attività tannasica, nonché la possibilità che i ceppi possano idrolizzare precursori aromatici glicosilati nel corso della fermentazione malolattica, come evidenziato in altri ceppi di *Lb. plantarum* USC1 (Sestelo et al., 2004).

Una selezione di 8 ceppi di *Lactobacillus* spp. su un totale di 32, sono stati capaci di crescere (OD 600 di oltre 0,39) in un mezzo contenente 16% di etanolo. Ceppi di *Lb. plantarum*, *Lb. confusus*, *Lb. casei* e *Lb. brevis* sono tolleranti all'etanolo (Gold, 1992) e in uno studio condotto su *Lb. heterohiochii* e *Lb. homohiochii* sono stati identificati ceppi capaci di crescere in terreni contenenti 18% di etanolo (Ingram, 1990). Un recente studio ha mostrato che il ceppo di *Lb. buchneri* NRRL B-30929, isolato da un carburante a base di etanolo, esibisce un'alta tolleranza a quest'ultimo (Liu et al., 2008).

I batteri lattici devono sopravvivere a condizioni di progressiva acidità ambientale durante la vinificazione e presumibilmente il complesso F₀-F₁-ATPasi svolge un ruolo determinante come regolatore del pH intracellulare ed anche un ruolo nel meccanismo di stress acido (Cotter e Hill, 2003). Nella fermentazione malolattica si ha come noto la conversione enzimatica dell'acido malico dicarbossilico in monocarbossilico lattico. Quest'ultimo è escreto dal batterio attraverso un trasporto lattato-malato (in *Lactobacillus lactis*) che porta alla sintesi di ATP. Tale moneta di scambio energetica è probabilmente all'origine della tolleranza acida, almeno in *O. oeni* (Guzzo et al., 2000). Il metabolismo catabolico dell'aminoacido arginina in *Oenococcus oeni* e *Lb. plantarum* potrebbe giocare un ruolo adattativo a bassi valori di pH in questi batteri (de Orduna et al., 2001). Lo stress acido induce la sintesi di diverse proteine, incluse DnaK e GroEL in *Lb.*

delbrueckii (Lim et al., 2000). Anche la *heat shock protein* identificata in *O. oeni* è indotta a seguito dello stress alcolico e acido (Guzzo et al., 2000).

Insieme alla temperatura, pH ed etanolo i batteri del vino sono esposti ad alte concentrazioni di solfiti, impiegato estensivamente per le sue proprietà antiossidanti e antibatteriche. Molti dei batteri trovati nel vino sono sensibili ai solfiti; allora, la tolleranza ai solfiti dei batteri del vino è considerato di importanza notevole nella scelta degli opportuni starter per la vinificazione. I solfiti, nella forma indissociata (acido solforoso) capace di entrare liberamente nel batterio, hanno un effetto inibitorio sulla crescita e sulla durata della fermentazione malo-lattica dei batteri probabilmente a causa del loro effetto sulla inibizione dell'attività ATPasica (Carreté et al., 2002; Carreté et al., 2005). Nei batteri adattati alle condizioni di presenza dei solfiti sono state riscontrate modificazioni del profilo proteico della membrana plasmatica; in particolare una del peso molecolare di 40 kDa, identificata come GADPH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi), ma senza presentarne attività enzimatica (Carreté et al., 2005). Altri sistemi tuttavia potrebbero aiutare il batterio a mantenere l'integrità di membrana in condizioni di stress acido, etanolico e da presenza di solfiti. Infatti, è stato osservato che piccole *heat shock proteins* interagiscono con il doppio strato fosfolipidico, stabilizzandola (Narberhaus, 2002). In *O. oeni* la *heat shock protein 18* è associata alla membrana a seguito dello stress e la sua sintesi è indotta dalla fluidizzazione della membrana plasmatica e che tale sintesi che avviene in presenza di etanolo al 12%, non risalta alla concentrazione del 10% (Jobin et al., 1997).

Sebbene sembri che un meccanismo indipendente dalla sintesi *de novo* possa essere coinvolto nel meccanismo di adattamento di *O. oeni* all'etanolo (Da Silveira et al., 2003), è possibile che molte delle *heat shock proteins* siano normalmente espresse durante la crescita batterica e che solamente dopo esse si stabilizzino interagendo con la membrana plasmatica in risposta allo stress.

La heat shock protein 18 (HSP 18) una delle più studiate in *O. oeni* può essere considerata come una proteina da stress, piuttosto che una heat shock protein poiché la sua espressione viene osservata in una moltitudine di stress, inclusi quelli da etanolo e da pH.

A differenza di *O. oeni* *Lb. plantarum* ha un genoma più grande come riflesso della sua grande flessibilità ecologica (Kleberzezen et al., 2003). Il batterio codifica da numerosi geni proteine coinvolte nelle risposte da stress, come proteasi intracellulari (ClpP, HsIV, Lon), che degradano aberranti e non funzionali proteine. Inoltre, codifica anche per tre piccole Hsp (Hsp 18.5, Hsp 18.55, Hsp 19.3) (Spano et al., 2004) e tre cold-shock proteins (CspL, CspC, CspP) (Derzelle et al., 2002).

MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

3.1 INTRODUZIONE ALLA MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

La microbiologia predittiva è una branca della microbiologia degli alimenti che sulla base di precedenti osservazioni, è in grado di predire il comportamento dei microrganismi in determinate condizioni ambientali e di stimare l'accuratezza di tali predizioni (Ross e McMeekin, 1994). La microbiologia predittiva si basa sui seguenti presupposti:

- a. le risposte dei microrganismi (crescita, sopravvivenza e morte) alle condizioni ambientali sono riproducibili a livello di popolazione e pertanto descrivibili mediante equazioni matematiche;
- b. la variazione stocastica alle risposte ambientali può essere descritta mediante distribuzioni di probabilità a livello di singola specie.

La microbiologia predittiva si avvale di due elementi fondamentali, modelli matematici e *database*. Questi due elementi sono strettamente correlati tra di loro e ciascuno è essenziale alla realizzazione e alla validazione dell'altro.

Anche se il termine “microbiologia predittiva” è stato adottato per la prima volta all'inizio degli anni '80, le origini di tale disciplina risalgono, secondo alcuni, agli anni '20 del secolo scorso, quando venne teorizzata la relazione lineare, su scala semilogaritmica, fra la morte delle cellule microbiche e la durata di un trattamento termico (Bigelow, 1921; Esty e Meyer, 1922), dettando le basi tecnologiche, tutt'ora adottate, per la conduzione dei processi industriali di sterilizzazione e pastorizzazione. Dopo circa un quarantennio sono stati elaborati i primi modelli cinetici per lo studio della crescita microbica, ma solo negli anni '80 si assiste alla demarcazione che delinea la microbiologia predittiva in senso moderno. Nel 1980 Ratkowski descrive la relazione fra la velocità di crescita in fase esponenziale di un microrganismo e la temperatura di incubazione. Da allora sono stati pubblicati numerosi articoli e monografie riguardanti la microbiologia predittiva, tale da rendere questa disciplina un aspetto essenziale della microbiologia alimentare.

La microbiologia predittiva non ha suscitato solo l'interesse del mondo accademico ma è diventata uno strumento fondamentale nell'industria alimentare. Infatti, ha assunto un largo impiego nelle pratiche di autocontrollo (HACCP), di analisi del rischio e nella determinazione della *shelf life*. In tale contesto gli strumenti forniti dalla microbiologia predittiva hanno acquistato sempre maggiore visibilità anche all'interno delle normative internazionali che regolano i criteri per definire l'accettabilità microbiologica degli alimenti. E' il caso, ad esempio del Regolamento CE 2073/05, con il quale la microbiologia predittiva è riconosciuta come fondamentale supporto per le decisioni riguardanti gli aspetti igienico sanitari.

3.2 LA MODELLAZIONE DEI FENOMENI BIOLOGICI

Al fine di comprendere, prevedere e controllare un fenomeno biologico, (crescita, sopravvivenza e morte microbica) la microbiologia predittiva si avvale di modelli matematici, di diversa complessità basati sull'utilizzo di equazioni matematiche. La crescita, la sopravvivenza, la morte dei microrganismi o la produzione di metaboliti può essere modellata per mezzo di modelli primari, mentre l'effetto dei parametri ambientali o di processo sui fenomeni elencati può essere valutato tramite l'ausilio di modelli secondari. Sono state inoltre sviluppate numerose interfacce *user friendly* utilizzabili on line o scaricabili che permettono di fare previsioni sulla crescita, la sopravvivenza e l'inattivazione dei microrganismi negli alimenti. Questi software sono tradizionalmente chiamati modelli terziari e tra i più popolari ricordiamo ComBasePredictor e PathogenModeling Program.

In generale i modelli possono essere suddivisi in due categorie fondamentali: modelli empirici e meccanicistici. I primi si basano su espressioni matematiche adattate a rappresentare il fenomeno, i secondi si basano su espressioni matematiche derivate da leggi fisiche e chimiche. Esempi di modelli empirici primari sono l'equazione Logistica, l'equazione di Richards e l'equazione di Gompertz riparametrizzata mentre i modelli empirici secondari possono essere

rappresentati da equazioni polinomiali. Sebbene i modelli empirici siano più semplici da sviluppare e da utilizzare non sempre i loro parametri hanno un significato biologico, al contrario, i modelli meccanicistici hanno un significato biologico diretto e forniscono risultati più affidabili. Tra i modelli meccanicistici ricordiamo il D-model di Baranyi e Roberts (modello primario) per descrivere la crescita microbica e l'equazione di Arrhenius (modello secondario) per descrivere la cinetica di disattivazione termica dei microrganismi.

3.3 MODELLI PRIMARI

I modelli primari sono sviluppati per comprendere e prevedere la crescita, la morte, l'inattivazione microbica, la produzione di metaboliti o il consumo di un substrato in un dato insieme di condizioni ambientali. Lo scopo della modellazione primaria è quello di individuare una relazione matematica che permetta di prevedere la crescita in ogni istante del tempo e di stimare i tre parametri più importanti della curva di crescita: la durata della fase lag (λ), la velocità specifica di crescita massima (μ_{max}) e il livello massimo raggiunto dalla popolazione microbica (A).

3.3.1 Modellazione della crescita microbica

Prevedere la crescita di un microrganismo patogeno in determinate condizioni ambientali costituisce un aspetto di elevata importanza al fine di stabilire e valutare la sicurezza igienico sanitaria, la qualità e la *shelf life* di un alimento. Altrettanto importante è prevedere la crescita di un microrganismo utile per un dato processo fermentativo o per realizzare un esperimento di laboratorio. Per controllare in maniera accurata un esperimento, vengono introdotte delle semplificazioni sperimentali che solitamente prevedono l'impiego di substrati colturali. Utilizzare substrati di coltura al posto di una matrice alimentare offre numerosi vantaggi legati principalmente alla possibilità di lavorare con un substrato standardizzato e con una coltura pura.

Benché i modelli realizzati con tale approccio, forniscano delle previsioni sbagliate, essi sono ampiamente utilizzati poiché la crescita microbica in un substrato di coltura è maggiore di quella che si osserverebbe in un alimento. Per tale motivo, questi modelli sono definiti *failsafe* ovvero sono modelli che “falliscono in modo sicuro” perché prevedono un rischio maggiore di quello che si potrebbe verificare nella realtà. La crescita microbica può essere misurata con una varietà di metodi distinguibili in metodi diretti e metodi indiretti, ed entrambi presentano vantaggi e svantaggi. I primi, rappresentati soprattutto dai metodi di conta in piastra, anche se laboriosi e costosi sono lo strumento di riferimento in microbiologia predittiva. Essi sono relativamente sensibili ed hanno un range dinamico da 10 ufc/ml a oltre 10^9 ucf/ml. Tra i metodi indiretti è spesso utilizzato quello della turbidimetria mediante la determinazione dell'assorbanza (densità ottica, OD). Questo metodo seppur molto rapido e poco costoso rappresenta dei limiti dettati soprattutto dalla scarsa sensibilità e dal ristretto range di linearità. Inoltre per stimare la biomassa o il numero di cellule per mezzo dell'assorbanza è necessario costruire curve di calibrazione, che sono lineari soltanto entro un intervallo relativamente ristretto (OD fino a 0,6). In alcuni casi la determinazione dell'assorbanza è stata utilizzata con successo per costruire dei modelli di crescita microbica (Dalgaard e Koutsoumanis, 2001). A prescindere dal metodo utilizzato, il risultato dell'esperimento sarà costituito da una serie di coppie di punti (tempo/N° di microrganismi). Maggiore sarà il numero di punti e migliore la loro distribuzione, tanto più robusto e affidabile sarà il modello. È importante coprire con un discreto numero di misurazioni la fase di transizione tra fase *lag* e fase esponenziale e la fase di transizione tra fase esponenziale e fase stazionaria. I primi studi di modellazione della crescita microbica prevedevano l'utilizzo dell'equazione logistica e di Gompertz, entrambe modificate e riparametrizzate da Gibson et al., (1987) e da Zwietering et al., (1990) per attribuire un significato biologico ai parametri stimati per regressione non lineare (tabella 4). Tra le due equazioni, quella di Gompertz ha avuto maggiore successo perché oltre ad essere un modello di facile interpretazione permette di

ottenere risultati più attendibili rispetto alla funzione logistica. Nonostante i vantaggi ascrivibili al modello di Gompertz, tal equazione presenta dei limiti in quanto la cellula batterica viene assunta come una unità costante; in realtà lo stato fisiologico delle cellule cambia nel tempo. L'ambiente circostante viene assunto come invariabile e i nutrienti si assumono come sempre disponibili. E' evidente che l'ambiente varia nel tempo e i nutrienti non sono sempre disponibili, inoltre non sempre è possibile stimare la fase *lag*.

Tabella 4. Modelli empirici non lineari per la crescita microbica. Tabella tratta da: Gardini F e Parente E (2013) Manuale di microbiologia predittiva, Springer-Verlag Italia.

	Gibson et al., (1987)	Zwietering et al., (1990)
Equazione logistica modificata	$\log(x_t) = A + \frac{C}{\{1 + \exp[-B(t - M)]\}}$ $\lambda = M - \frac{2}{B}$ $\mu = \frac{BC}{4}$ $MGT = \frac{\log(2)4}{BC}$	$y = \frac{A}{\left\{1 + \exp\left[\frac{4\mu_{max}}{A}(\lambda - t)\right] + 2\right\}}$
Equazione di Gompertz modificata	$\log(x_t) = A + C \exp\{-\exp[-B(t - M)]\}$ $\lambda = M - \frac{1}{b} + \frac{\log(x_0) - A}{\frac{BC}{e}}$ $\mu = \frac{BC}{e}$ $MGT = \frac{\log(2)e}{BC}$	$y = A \exp\left\{-\exp\left[\frac{\mu_{max} e}{A}(\lambda - t) + 1\right]\right\}$
Simboli e parametri	$\log(x_t)$ logaritmo in base 10 del numero di cellule: $\log(N/N_0)$ <i>A</i> asintoto inferiore (con $t \rightarrow 0$) <i>C</i> differenza tra l'asintoto superiore e l'asintoto inferiore <i>B</i> tasso di crescita relativo al tempo <i>M</i> <i>t</i> tempo <i>M</i> tempo al quale il tasso di crescita relativo è massimo μ tasso di crescita <i>MGT</i> tempo medi di generazione	y logaritmo naturale del numero di cellule: $\ln(N/N_0)$ <i>A</i> asintoto superiore (numero massimo di cellule stimato) μ_{max} velocità specifica di crescita massima (t^{-1}) <i>e</i> base dei logaritmi naturali 2.718281828... λ durata della fase <i>lag</i> <i>t</i> tempo

Sia l'equazione logistica sia l'equazione di Gompertz usano il logaritmo in base 10 o il logaritmo naturale del numero di cellule. In alcuni casi, anche se non hanno fornito risultati soddisfacenti, sono state impiegate per la determinazione dei parametri cinetici usando i valori di assorbanza (Dalgaard e Koutsoumanis, 2001). Al contrario, gli stessi autori hanno impiegato con successo l'equazione di Richards (1) per determinare la velocità specifica di crescita (μ_{max}) utilizzando i valori di assorbanza.

$$ABS_t = ABS_{min} + \frac{ABS_{max} - ABS_{min}}{\left[1 + \exp(-\mu_{ABS} \cdot m \cdot (t - t_i))\right]^{1/m}} \quad (1)$$

I parametri del modello di Richards hanno il seguente significato: ABS_t è l'assorbanza al tempo t , ABS_{min} e ABS_{max} sono l'assorbanza all'asintoto minimo e massimo, μ_{ABS} è la velocità specifica di crescita massima (μ_{max} , h⁻¹), t è il tempo (h), t_i è il tempo al punto di inflessione (h), m determina la forma della curva (0,5, 1,0 o 2,0). Con $m=1$ la curva diventa Logistica, con $0 < m < 1$ si ottiene una curva con una transizione più graduale dalla fase esponenziale alla fase stazionaria. Nonostante che negli ultimi anni siano stati realizzati e utilizzati numerosi modelli per determinare i parametri di crescita microbica, è ormai ampiamente utilizzato il modello deterministico (D-model) di Baranyi e Roberts (1994). Il D-model è di seguito riportato (equazione 2-3-4) nelle tre formulazioni;

$$\ln\left(\frac{N}{N_0}\right) = \mu_{max} A(t) - \frac{1}{m} \ln\left[1 + \frac{e^{m\mu_{max} A(t)} - 1}{e^{m\lambda(y_{max} - y_0)}}\right] \quad (2)$$

$$A(t) = t + \frac{1}{\nu} \ln\left(\frac{e^{-\nu t} + q_0}{1 + q_0}\right) \quad (3)$$

$$\lambda = \frac{\ln\left[1 + \frac{1}{q_0}\right]}{\nu} = \frac{-\ln(\alpha_0)}{\nu} = \frac{h_0}{\nu} \quad (4)$$

dove: m è il parametro di Richards, $A(t)$ è una funzione di "adattamento", che esprime l'avvicinamento delle cellule alla condizione nella quale si svilupperanno alla velocità μ_{max} , q_0 la quantità iniziale di un composto essenziale necessario per raggiungere lo sviluppo massimo, ν la velocità alla quale il composto essenziale viene accumulato (che si assume generalmente uguale a μ_{max}) e h_0 è un parametro che esprime lo stato delle cellule al momento dell'inoculo. Minore è h_0 , maggiore sarà l'adattamento.

Il modello di Baranyi e Roberts ha avuto un notevole successo negli studi di modellazione della crescita microbica perché non solo è in grado di stimare, con buona accuratezza i parametri cinetici (μ_{max} , lag , y_0 , y_{end} , $nCurv$ e $mCurv$), ma può essere facilmente realizzabile grazie all'add-in di Excel (DMFit). L'add-in e il manuale tecnico sono scaricabili gratuitamente dal sito dell'IFR (www.ifr.ac.uk).

3.3.2 Modellazione della morte microbica

L'inattivazione dei microrganismi può essere spiegata secondo due linee di pensiero fondate su un *approccio meccanicistico* e un *approccio vitalistico*. Secondo l'approccio meccanicistico tutte le cellule microbiche si comportano nello stesso modo e la morte di ciascuna cellula è dovuta a un singolo e preciso evento. Ad esempio si potrebbe considerare che la morte microbica, per effetto di un trattamento termico letale, sia ascrivibile all'inattivazione dell'enzima più termolabile. Secondo tale approccio l'esito letale dipenderebbe esclusivamente dal calore e l'andamento della morte microbica potrebbe essere associabile a una reazione chimica di primo ordine (5):

$$\log S(t) = -\frac{k(T)}{2,303} \cdot t \quad (5)$$

Dove $S(t)$ è il rapporto di sopravvivenza al tempo t , $k(T)$ è una costante di abbattimento esponenziale che dipende dalla temperatura applicata. La curva di sopravvivenza descritta dall'equazione (5) ha un andamento lineare. Il reciproco di $k(T)$ è noto come valore D, che corrisponde al tempo necessario per ridurre, alla temperatura T , la carica microbica di un fattore 10 (90%). Questo modello, nonostante sia stato introdotto circa 80 anni fa, trova ancora applicazione nel settore industriale. Infatti, i processi di sterilizzazione commerciale sono in gran parte basati ancora sul concetto dei 12D, cioè su un trattamento in grado di abbattere *Clostridium botulinum* di 12 cicli logaritmici. Sebbene questo modello abbia avuto notevole successo sia nel mondo accademico sia nell'industria alimentare, presenta dei grossi limiti. Limiti evidenziati soprattutto dall'applicazione industriale di processi di abbattimento cellulare sempre più blandi. E' ormai noto che la morte cellulare non è ascrivibile ad un singolo e preciso evento bensì a uno o più processi chimici o biofisici. In altre parole esiste un certo grado di difformità all'interno della popolazione microbica nella risposta ad un determinato fattore negativo, che influenza, tra l'altro, anche la resistenza alle condizioni sfavorevoli. Queste considerazioni minano profondamente l'approccio meccanicistico e pongono le fondamenta per un'interpretazione *vitalistica* della morte cellulare (Alzamora et al., 2010). La maggior parte delle curve di abbattimento cellulare non hanno un andamento lineare ma possono presentare delle "spalle", "code" o entrambe. Una spalla rappresenta una forma di resistenza della popolazione cellulare al trattamento di abbattimento. In particolare nella prima fase del trattamento, i danni cellulari possono essere considerati sub-letali, quindi la cellula non muore. Proseguendo con il trattamento, questi danneggiamenti si aggravano anche perché altre strutture cellulari possono essere coinvolte e la cellula non è più in grado di riparare i danni. Da questo momento la cellula inizia a morire con una o più cinetiche che dipendono dal trattamento. Per contro, la coda

rappresenta una forma di adattamento al trattamento, adattamento che può derivare da una selezione della popolazione iniziale delle cellule più resistenti, o dalla messa in atto di meccanismi cellulari che proteggono la cellula dal trattamento.

Nel corso degli anni, molteplici esperimenti hanno messo in luce l'andamento non lineare delle curve di morte microbica, relative non solo ai più comuni trattamenti termici ma anche quelli che prevedono l'impiego di tecnologie non convenzionali (es. alte pressioni, corrente elettrica, trattamenti termici a basse temperature, ecc).

In figura 2 sono riportate le più comuni curve di abbattimento riscontrate in numerosi esperimenti.

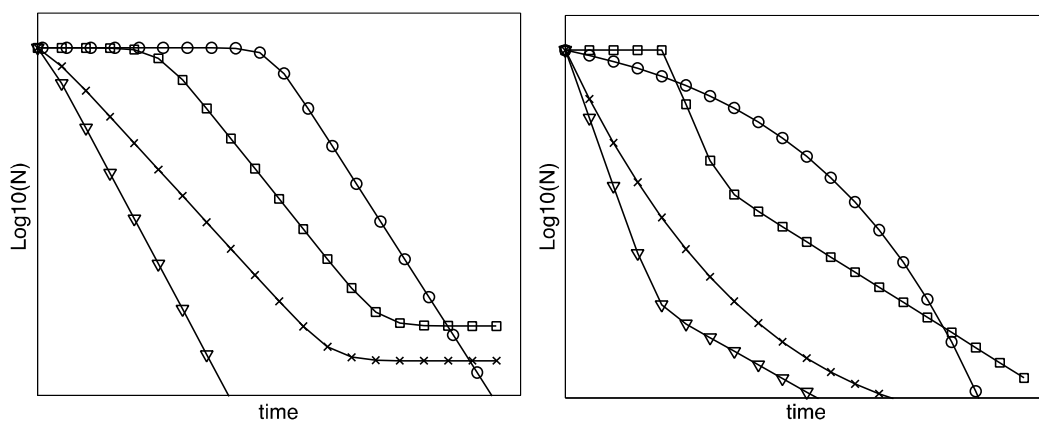


Figura 2 Curve di inattivazione comunemente osservate. Grafico a sinistra: lineare (∇ , curva I), lineare con coda (\times , curva II), sigmoideale (\square , curva III), lineare con spalla (\circ , curva IV). Grafico a destra: bifasica (∇ , curva V), concava (\times , curva VI), bifasica spalla (\square , curva VII), convessa (\circ , curva VIII). Immagine tratta da Geeraerd et al., 2005.

La curva I è un modello di morte log-lineare (Bigelow Esty, 1920) mentre le curve II, III e IV sono rappresentate da un modello log-lineare con spalla o coda o con entrambe (Geeraerd et al., 2000). Il modello che descrive le curve II, III e IV è riportato nell'equazione (6).

$$\log_{10}(N) = \log_{10} \left[\left(10^{\log_{10}(N(0))} - 10^{\log_{10}(N_{res})} \right) \cdot e^{-k_{max}t} \cdot \left(\frac{e^{k_{max}S}}{1 + (e^{k_{max}S} - 1) \cdot e^{-k_{max}t}} \right) + 10^{\log_{10}(N_{res})} \right] \quad (6)$$

dove: N è la popolazione microbica, $N(0)$ è la popolazione microbica iniziale, N_{res} è la popolazione microbica residua, K_{max} (1/unità di tempo) è la costante di inattivazione di primo ordine, S_I è il parametro che rappresenta la spalla ed è legato allo stato fisiologico della cellula.

Gli stessi autori hanno applicato tale modello per descrivere l'abbattimento di *Listeria monocytogenes* e *Lactobacillus sakei* con temperature non elevate (Geeraerd et al., 2000).

Marqunie et al., 2003 hanno adottato tale modello per inattivare *Monilinia fructigena* e *Botrytis cinerea* mediante un trattamento di luce pulsata. Inoltre altri autori hanno utilizzato il modello di Geeraerd per descrivere l'abbattimento di *Escherichia coli* K12 mediante l'impiego di temperature non molto elevate (Valdramidis et al., 2003, 2005) o per studiare il fenomeno di *Acid Tolerance Response* (ART) in *Salmonella enterica* e *Listeria monocytogenes* (Greenacre et al., 2003).

Le curve VI e VIII sono rappresentate dal modello di Weibull. Questo modello, inizialmente adottato negli studi di ingegneristica, ha trovato largo impiego in microbiologia predittiva, soprattutto per valutare l'effetto dei trattamenti termici sulla morte dei microrganismi (Peleg e Cole, 1998; Peleg, 2006; Van Boekel, 2002). Il modello di Weibull è un modello probabilistico e descrive la distribuzione degli eventi letali all'interno di una popolazione microbica. Di conseguenza la curva di abbattimento può essere considerata come una forma cumulativa della distribuzione di resistenza delle cellule. Tra le diverse formulazioni del modello di Weibull, quella comunemente utilizzata in microbiologia predittiva per descrivere la sopravvivenza di una popolazione microbica ad un trattamento termico o microbica, è riportata nell'equazione (7):

$$\log S(t) = -bt^n \quad (7)$$

dove: $S(t)$ è il rapporto di sopravvivenza, ovvero il rapporto tra le cellule sopravvissute al trattamento al tempo t (Nt) e quelle presenti all'inizio del trattamento ($N0$), b e n sono parametri

che dipendono dalla temperatura. In particolare n costituisce il fattore di forma della curva (*shape factor*):

- per $n > 1$ la curva presenta una spalla;
- per $n < 1$ la curva presenta una coda;
- per $n = 1$ la curva assume un andamento lineare.

Il modello bifasico proposto da Cerf (1977) e rappresentato dalla curva V, è stato inizialmente utilizzato per descrivere il trattamento di inattivazione termica. Questo modello è stato anche utilizzato per valutare i trattamenti di inattivazione legati all'attività dell'acqua (Shadbolt et al., 1999), al pH (Shadbolt et al., 2001) e ai campi elettrici (Zhang et al., 1994). Il modello distingue la popolazione microbica sottoposta al trattamento termico in due frazioni: una frazione iniziale più numerosa e una frazione finale meno numerosa. In seguito ad un trattamento termico, la prima frazione della popolazione, più suscettibile al trattamento, morirà con una velocità maggiore rispetto alla velocità alla quale morirà la seconda frazione della popolazione. Il modello è riportato dall'equazione (8):

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N(0)) + \log_{10}(f \cdot e^{-k_{max1}t} + (1-f) \cdot e^{-k_{max2}t}) \quad (8)$$

dove: N è la popolazione microbica, $N(0)$ è la popolazione microbica iniziale, f è la frazione più numerosa della popolazione iniziale, $(1-f)$ è la frazione meno numerosa della popolazione iniziale (più resistente al trattamento rispetto alla frazione precedente) e K_{max1} e K_{max2} (1/unità di tempo) sono le costanti della velocità specifica delle due frazioni della popolazione.

Una variante del modello bifasico è rappresentata dal modello bifasico con spalla (curva VII, eq. (9)) proposto da Geeraerd e Van Impe (2005).

$$\log_{10}(N) = \log_{10}(N(0)) + \log_{10}(f \square e^{-k_{max1}t} + (1-f) \square e^{-k_{max2}t}) \quad (9)$$

Il modello è caratterizzato dalla porzione bifasica del modello di Cerf (eq. (6)) e dalla componente che rappresenta la spalla nel modello Geeraerd (eq. (6)). Questo modello è stato utilizzato per valutare l'effetto dello stress da sale e dello stato fisiologico cellulare sulla termotolleranza di due ceppi di *Bacillus cereus* (den Besten et al., 2006). Le curve di inattivazione cellulare, rappresentate in figura 1 possono essere realizzate da specifici software o semplicemente tramite una macro di excel (GInaFIT) realizzata da Geeraerd et al. (2005). Il programma GInaFIT è corredato anche di misure di analisi statistica, come la valutazione dell'errore standard, la somma degli errori al quadrato, la media della somma degli errori al quadrato e la sua radice, il calcolo di R2 e di R2 adattato (Wonacott, 1990).

3.4 MODELLI SECONDARI

Le cinetiche di sviluppo o di morte dei microorganismi sono nel loro complesso determinate dai fattori ambientali, siano essi intrinseci (cioè dipendenti dalle caratteristiche del prodotto) o estrinseci (determinati dalle condizioni di conservazione). I modelli secondari descrivono gli effetti di queste condizioni ambientali di natura chimica, fisica o biologica sui parametri stimati dai modelli primari.

Tra i diversi modelli secondari, utilizzati per modellare la crescita microbica, ricordiamo il modello di Ratkowsky (Ratkowsky et al., 1983) il quale mette in relazione la radice quadrata della velocità di sviluppo in fase esponenziale con la temperatura (assoluta). Come già riportato in precedenza, il modello di Ratkowsky rappresenta uno dei primi modelli che ha segnato l'evoluzione della microbiologia predittiva. Esso è riportato nella sua forma più completa nell'equazione (10):

$$\sqrt{\mu_{\max}} = b(T - T_{\min}) \left\{ 1 - e^{-[\alpha(T - T_{\max})]} \right\} \quad (10)$$

Dove μ_{max} rappresenta la velocità massima di sviluppo in fase esponenziale, T_{min} è la temperatura minima (°K) a cui si osserva la crescita, T_{max} (°K) è la temperatura massima alla quale si osserva la crescita e T (°K) è la temperatura osservata, ovvero la variabile indipendente, b e c sono due costanti dell'equazione. La funzione di Ratkowsky permette, inoltre, di valutare la temperatura ottimale di crescita microbica. Questo modello ha trovato diverse applicazioni, infatti, è stato anche utilizzato per descrivere gli effetti di altri fattori (pH ed a_w) o l'effetto combinato di essi. Nell'equazione (11) è riportato, a titolo di esempio, il modello di Ratkowsky che descrive l'effetto della temperatura e dell' a_w sulla radice quadrata della velocità specifica di crescita.

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min}) \left\{ 1 - e^{-c(T - T_{max})} \right\} \sqrt{(a_w - a_{wmin}) \left[1 - e^{-c(a_w - a_{wmin})} \right]} \quad (11)$$

Oltre al modello di Ratkowsky sono stati introdotti altri modelli più o meno complessi per descrivere l'effetto dei fattori ambientali sulla crescita microbica. Vale la pena ricordare i modelli cardinali e le equazioni polinomiali. Tra i due, le equazioni polinomiali, e in particolar modo quelle di secondo grado (Eq. (12)), hanno riscontrato maggiore successo tanto da essere considerati i modelli secondari più utilizzati della microbiologia predittiva.

$$y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} x_i x_j \quad (12)$$

I modelli basati sulle equazioni polinomiali offrono numerosi vantaggi; ad esempio possono essere utilizzati per elaborare dati ottenuti attraverso disegni sperimentali come il *disegno fattoriale completo* o il *central composite design* (CCD). Inoltre permettono di descrivere gli effetti combinati di diversi fattori ambientali sullo sviluppo microbico. I risultati di questi modelli possono essere rappresentati graficamente attraverso la cosiddetta Response Surface

Methodology. I valori predetti del modello sono rappresentati con grafici tridimensionali in cui è riportata la superficie di risposta (valori predetti per le variabili indipendenti) in relazione a due variabili indipendenti (assi x e y).

3.5 MODELLI TERZIARI: SOFTWARE E DATABASE

L'affermarsi della microbiologia predittiva ha permesso di ottenere, oltre all'accumulo di numerosi dati sperimentali riguardanti la crescita, la sopravvivenza e la morte dei microrganismi, lo sviluppo di numerosi strumenti informatici per predire il comportamento dei microrganismi in determinate condizioni ambientali. Tali strumenti raggruppano diversi database e software stand-alone o add-in per Microsoft Excel, fruibili a pagamento o gratuitamente. Tra i tanti strumenti informatici attualmente disponibili, Combase (<http://www.combase.cc>) è sicuramente quello contraddistinto da maggiore notorietà. E' un database che raccoglie numerosi dati sperimentali riguardanti la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi. Inoltre offre una serie di strumenti on-line per la modellazione della crescita o per la sopravvivenza dei microrganismi (Combase modelling toolbox). Dati grezzi ottenuti dal database o generati mediante esperimenti possono essere utilizzati, mediante l'applicazione DMFit, per calcolare i parametri di modelli primari. DMfit è inoltre disponibile come add-in per Microsoft Excel e può essere scaricato gratuitamente dal sito <http://www.ifr.ac.uk/safety/dmfit>. Un altro interessante strumento informatico è rappresentato da Pathogen Modeling Program (PMP) prodotto dall'USDA-ARS e reperibile al sito (<http://pmp.arserrc.gov/PMPOnline.aspx>). Il PMP offre un pacchetto di modelli che possono essere usati per predire la crescita e l'inattivazione dei microrganismi in varie condizioni ambientali. Inoltre ci sono numerose add-in di Excel che permettono di stimare i vari parametri relativi ai modelli di microbiologia predittiva. Di particolare interesse risulta essere GInaFiT (Geeraerd et al., 2005), uno strumento completo che consente di stimare i parametri di nove curve di inattivazione. Numerosi altri strumenti, utili per la microbiologia predittiva, possono

essere consultati nel seguente testo: Manuale di microbiologia predittiva (Gardini e Parente, 2013)

SCOPO DELLA TESI

La risposta adattativa dei batteri agli stress in genere è oggetto di numerosi studi. Molti processi fermentativi, in cui vengono utilizzati batteri lattici, avvengono in condizioni ambientali molto diverse da quelle fisiologiche. *Lactobacillus plantarum* è uno dei più diffusi batteri lattici ambientali ed è anche ampiamente usato come “starter” nella produzione di differenti prodotti fermentati di origine sia vegetale sia animale, in cui stress termici e di acidità sono comuni.

La presenza di metaboliti secondari, le variazioni di temperatura, di pH e di concentrazione dei nutrienti che le cellule subiscono durante i processi di produzione e di conservazione degli alimenti costituiscono uno stress al quale esse rispondono attivando complessi meccanismi metabolici. La comprensione dei meccanismi coinvolti nella risposta agli stress rappresenta un punto di partenza per migliorare l’adattamento in condizioni non fisiologiche per la crescita, ed ottimizzare i processi industriali, permettendo di ottenere prodotti qualitativamente migliori.

Attualmente da parte dell’industria enologica c’è uno spiccato interesse nei confronti di batteri lattici isolati da vini in grado di condurre un’ottimale fermentazione malo-lattica. Accanto ai ceppi comunemente impiegati per la conduzione di tale fermentazione, ascrivibili essenzialmente a *Oenococcus oeni*, potrebbe apparire utile l’impiego di altri batteri lattici. In tal senso, *Lactobacillus plantarum*, mostrando un più ampio profilo enzimatico rispetto a *O. oeni*, potrebbe giocare un ruolo importante nella modificazione del profilo aromatico del vino. Tuttavia le stringenti condizioni ecologiche caratterizzanti i vini in fase di maturazione, non sempre favoriscono la crescita microbica e potrebbero inibire anche l’instaurarsi di fermentazioni desiderabili quali la malo-lattica. Uno dei principali fattori inibenti la crescita microbica nel vino è senz’altro la presenza di elevate concentrazioni di etanolo, composto che generalmente altera l’omeostasi della cellula batterica, determinando a volte una condizione di stress variabilmente reversibile in funzione del ceppo microbico interessato e delle sue capacità di adattamento. La

pre-esposizione di un ceppo in grado di condurre la fermentazione malo-lattica a dosi crescenti di etanolo potrebbe garantire un adattamento alla presenza del fattore di stress, tale da migliorare la sua resistenza e quindi la performance in vino. In tale contesto s'inserisce il presente lavoro di dottorato, con lo scopo di valutare la resistenza di ceppi di *Lactobacillus plantarum*, isolati da campioni di vino differenti, a condizioni di stress tipiche della matrice in esame, come il pH acido, la presenza di SO₂ e di etanolo. Parallelamente è stata valutata anche la crescita e la capacità di adattamento a diverse concentrazioni di etanolo (8% e 14%) previa esposizione a percentuali differenti di alcol (2%, 4%, 8%) mediante la determinazione dei parametri cinetici secondo modelli di microbiologia predittiva. Infine, si è inteso determinare, mediante modelli di inattivazione microbica, la sopravvivenza a concentrazioni di etanolo pari al 14% di ceppi appartenenti alla specie *Lb. plantatum* pre-adattati o meno. Quest'ultima attività è stata accompagnata dall'esame dei profili proteici dei ceppi oggetto di studio, coltivati in presenza e assenza di etanolo, al fine di verificare la presenza di eventuali variazioni imputabili al processo di adattamento all'etanolo.

MATERIALI E METODI

5.1 CAMPIONAMENTO

Sono stati campionati 23 vini rossi, prelevati da 11 cantine artigianali dislocate in diverse aree del sud Italia. Il campionamento è stato effettuato a fine fermentazione alcolica e durante lo svolgimento della fermentazione malolattica, entrambe ad andamento spontaneo (senza inoculo di starter). I campioni sono stati prelevati e mantenuti in contenitori sterili a 4°C.

Nella tabella 5.1 sono riportate le sigle, la tipologia e la provenienza dei 23 campioni di vino prelevati.

Tabella 5.1 Campionamento

CAMPIONI	TIPOLOGIA	REGIONE
AG A	AGLIANICO	CAMPANIA
AG B	AGIANICO	CAMPANIA
MT A	MONTEPULCIANO	MOLISE
MTB	MONYEPULCIANO	MOLISE
MT G	MONTEPULCIANO	MOLISE
MT C	MONTEPULCIANO	MOLISE
MT D	MONTEPULCIANO	MOLISE
MT E	MONTEPULCIANO	MOLISE
PIN	PENTRO D'ISERNIA	MOLISE
PID	PENTRO D'ISERNIA	MOLISE
PD A	PIEDIROSSO	CAMPANIA
PDS	PIEDIROSSO	CAMPANIA
PDL	PIEDIROSSO	CAMPANIA
RM C	ROSSO MOLISE	MOLISE
RM D	ROSSO MOLISE	MOLISE
TAB	TAURASI	CAMPANIA
TAS	TAURASI	CAMPANIA
TSB	TINTILIA	MOLISE
TSD	TINTILIA	MOLISE
TSE	TINTILIA	MOLISE
TSG	TINTILIA	MOLISE
PIL 1	TINTILIA	MOLISE
PIL 2	TINTILIA	MOLISE

5.2 ANALISI CHIMICO-FISICHE

Sui campioni di vino prelevati sono state svolte le analisi chimico-fisiche secondo le metodiche riportate in Gazzetta Ufficiale della Comunità Europea, Regolamento (CE) N. 761/1999.

5.2.1 Determinazione del pH

La determinazione del pH è stata eseguita per via potenziometrica, mediante l'utilizzo di un pHmetro Crison basic.

5.2.2 Determinazione dell'acidità totale

La determinazione dell'acidità totale è stata effettuata mediante titolazione potenziometrica utilizzando un pHmetro crison basic e come titolante NaOH 0,1N, come da Regolamento (CE) N. 761/1999. I risultati sono stati espressi come g/L di acido tartarico.

5.2.3 Determinazione del grado alcolico

La determinazione del grado alcolico è stata realizzata per mezzo di un distillatore elettronico enochimico (Gibertini) e la densità del distillato è stata misurata mediante l'utilizzo di un densimetro DE40 Density Meter (Mettler Toledo) . La normativa vigente prevede la possibilità di utilizzare qualunque modello di apparecchio di distillazione a condizione che esso soddisfi il seguente saggio: distillare 5 volte di seguito una miscela idroalcolica al 10% in volume. Dopo l'ultima distillazione , il distillato deve presentare un titolo alcolometrico di almeno 9,9% in volume. I risultati sono stati espressi in % di alcol (v/v).

5.2.4 Determinazione dell'acido L-malico

La determinazione dell'acido malico è stata effettuata mediante l'utilizzo di un kit enzimatico (Steroglass, Italy).

L'acido L-malico viene ossidato ad ossalacetato dal NAD in presenza dell'enzima L-malato deidrogenasi (L-MDH) con formazione di NADH. L'enzima glutamato-ossalacetato deidrogenasi (GOT) in presenza di L-glutamato sottrae l'ossalacetato dall'ambiente di reazione catalizza la sua trasformazione in L-aspartato con formazione di 2-ossoglutarato. Il NADH che si

forma è in concentrazione stechiometrica con il L-malato e l'aumento del NADH è misurabile per via spettrofotometrica a 340nm.

Il valore ottenuto è stato espresso in g/L di acido L-malico.

5.2.5 Determinazione dell'acido L-lattico

La determinazione dell'acido L-lattico è stata effettuata anch'essa mediante l'utilizzo di un kit enzimatico (Steroglass, Italy).

L'acido L-lattico è ossidato a piruvato dal NAD in presenza dell'enzima L-lattato deidrogenasi (L-LDH) con formazione di NADH. Il NADH che si forma è in concentrazione stechiometrica con il L-lattato e l'aumento del NADH è misurabile per via spettrofotometrica a 340nm.

Il valore ottenuto è stato espresso in g/L di acido L-lattico.

5.3 ANALISI MICROBIOLOGICHE

Al fine di isolare e identificare i microrganismi presenti nei campioni di vino sono state condotte analisi microbiologiche.

Aliquote di 1mL di vino sono state sospese in 9mL di soluzione fisiologica sterile (0,9% NaCl) così da allestire le successive diluizioni decimali seriali. In seguito si è proceduto alla semina in piastra per inclusione utilizzando un opportuno terreno di coltura.

Come substrato di crescita è stato utilizzato MRS Agar (Oxoid) con aggiunta di 40 mg/L di actidione (antibiotico che inibisce lo sviluppo dei lieviti), le piastre sono state incubate alla temperatura di 28°C.

Dalle piastre a diluizione più elevata, sono state isolate 5 colonie, successivamente purificate per striscio superficiale sempre su terreno MRS agar (Oxoid).

5.4 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

Per giungere ad una prima identificazione del genere di appartenenza sono state condotte sugli isolati analisi di caratterizzazione fenotipica.

L'identificazione dei microrganismi è uno degli step più complessi ma allo stesso tempo indispensabile, per un corretto utilizzo di forme microbiche come starter nei processi tecnologici dell'industria alimentare (Catzeddu et al., 2006).

Queste tecniche si basano sulla valutazione di proprietà fenotipiche, come lo studio della morfologia cellulare delle colonie, la valutazione della crescita su diversi substrati e la natura dei prodotti del metabolismo.

5.4.1 Osservazione al microscopio ottico

Gli isolati purificati sono stati osservati al microscopio ottico a contrasto di fase (ZEISS Aixophot) allo scopo di valutarne la morfologia e il tipo di organizzazione cellulare.

5.4.2 Colorazione di Gram

La colorazione di Gram è stata eseguita su colture batteriche overnight dopo opportuna fissazione delle stesse su un vetrino portaoggetti e mediante l'ausilio del Grams stain kit (Oxoid, Mcc), in modo da poter distinguere i batteri Gram + dai Gram -. L'osservazione è stata eseguita mediante microscopio ottico con ingrandimento 100X per immersione.

5.4.3 Saggio della catalasi

La coltura batterica è stata messa a contatto con una goccia di perossido d'idrogeno al 10% (v/v) allo scopo di valutare la presenza o l'assenza dell'enzima catalasi; tale enzima decompone il perossido d'idrogeno in ossigeno ed acqua mostrando quindi lo sviluppo di bollicine di ossigeno.

5.4.4 Studio del profilo assimilativo delle fonti di carbonio

Lo studio del profilo assimilativo delle fonti di carbonio è stato eseguito mediante l'impiego del kit API 50 CHL (Biomerieux), costituito dalle gallerie API e dal substrato di crescita API 50 CHL medium. I risultati sono stati ottenuti mediante l'impiego del software APILAB. Le gallerie sono costituite da 50 pozzetti di cui 49 contenenti fonti di carbonio più uno che costituisce il controllo. L'API 50 CHL medium presente nel kit è finalizzato all'identificazione del genere *Lactobacillus* e dei generi affini. Il microrganismo in esame è messo in sospensione nel terreno ed in seguito viene inoculato in ogni pozzetto della galleria.

Durante l'incubazione il catabolismo dei glucidi produce acidi organici che fanno virare l'indicatore di pH presente nel terreno.

I risultati ottenuti costituiscono il profilo biochimico del ceppo e sono utilizzati per la sua identificazione mediante analisi tramite il software APILAB.

5.5 IDENTIFICAZIONE GENETICA

Dopo la caratterizzazione fenotipica sono stati adottati metodi di identificazione genotipica i quali si basano sull'analisi del DNA e permettono sia di distinguere microrganismi appartenenti a specie diverse (caratterizzazione a livello di specie) sia di analizzare la variabilità intraspecifica dei ceppi appartenenti a una stessa specie o popolazione (biotipizzazione a livello di ceppo).

5.5.1 Analisi PCR-DGGE

Si è proceduto ad una preliminare estrazione del DNA dalle cellule microbiche seguito da una successiva amplificazione della regione V1 del 16S rRNA ed infine ad analisi DGGE e sequenziamento.

Nelle prove genetiche condotte è stato utilizzato, a scopo comparativo, il type strain *Lb. plantarum* DSM 20174 (ATCC 14917) , appartenente alla collezione DSMZ (DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Mascheroder Weg 1 b D-38124 Braunschweig-Germany).

5.5.2 Estrazione ed amplificazione del DNA batterico

Per l'estrazione del DNA sono state utilizzate brodocolture batteriche overnight cresciute in MRS broth (Oxoid) a 28°C.

Il protocollo usato è stato quello descritto da Querol et al. (1992), modificato in alcuni passaggi secondo Andrighetto et al. (2001). Per la digestione della parete cellulare batterica è stato utilizzato lisozima (25 mg/mL) e mutanolisina (10U/mL).

Il DNA estratto è stato diluito 70 volte in tampone TE e successivamente è stato determinato il grado di purezza del DNA eseguendo misure della densità ottica a lunghezza d'onda pari a 260 e 280nm, come descritto da Sambrook et al. (1989). I campioni sono stati standardizzati in modo tale da avere la stessa concentrazione, applicando la seguente formula:

$$\left[\left(\frac{A_{260} * 50 * 70}{80} \right) * 5 \right] - 5 = Y$$

Y è il volume di acqua bidistillata da aggiungere a 5 µl campione.

I primer utilizzati per l'amplificazione sono riportati nella tabella 5.2.

Tabella 5.2 Sequenza primer

primer	Sequenza
P1V1 GC	5 CG CCCGCCGCGCCCCGCGCCCCTCCCGCC GCCCCCGCCCGGCGGCGTGCCTAATACATCG3 (Colin et al., 2001)
P2V2	5 TTCCCCACGCGTACTCAGC 3 (Rantsiou et al., 2005)

Per l'amplificazione del DNA è stato utilizzato un mix base, la cui composizione è riportata in tabella 5.3. Preparato e porzionato il mix, si è proceduto a caricare 2 μ L (circa 200ng) di DNA diluito per strip.

Tabella 5.3 - Mix amplificazione PCR

Reagenti	Concentrazione finale
Tampone Buffer (DyNAzyme DNA Polymerase F-511)	Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM; MgCl ₂ 1.5 mM
dNTPs:dATP, dCTP,dGTP, dTTP	0.2 mM ognuno
Primer senso P1V1 (GC)	0.2 μ M
Primer antisenso P2V2	0.2 μ M
Polimerasi F-501L	1.25 UI
Acqua bidistillata	fino a 50 μ L

Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf Hamburg, Germany) effettuando 35 cicli secondo i parametri riportati in tabella 5.4.

Tabella 5.4 - Ciclo amplificazione

Denaturazione iniziale	95 °C x 5 min
Denaturazione	95 °C x 1 min
Annealing	45 °C x 1 min
Estensione	72 °C x 1 min
Estensione finale	72° C x 7 min

Al fine di verificare l'esito della reazione di amplificazione è stata eseguita una corsa elettroforetica degli ampliconi in gel di agarosio al 2% sciolto in tampone TBE (Tris-base 45 mM, Borato 44 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) 0.5 X per 60 min a 120 Volt.

Il gel è stato colorato in Etidio Bromuro 0.5 µg/mL per 30 minuti e successivamente decolorato per 40 minuti in acqua distillata. Si è proceduto alla visualizzazione del gel tramite transilluminatore e all'acquisizione dell'immagine tramite il software GEL DOC 2000 (BioRad).

5.5.3 Analisi DGGE

Gli amplificati ottenuti mediante amplificazione della regione V1 del 16S rRNA tramite PCR, sono stati sottoposti ad analisi DGGE (Dcode Universal Mutation Detection System, BioRad, CA, USA).

L'elettroforesi è stata eseguita su gel di poliacrilamide. Per la separazione sono stati utilizzati due gradienti di denaturante, dal 40 al 60% (100% denaturante era costituito da 7M urea più 40% fromamide) crescenti nella direzione della corsa elettroforetica.

Per la preparazione del gel di poliacrilamide è stato aggiunto il Temed (15µL in 15mL di soluzione) e l'APS 0,1% (ammonioperossidissolfato 150µL in 15mL di soluzione).

Dopo la polimerizzazione del gel, i campioni sono stati caricati nei pozzetti; 20µL di DNA amplificato sono stati mescolati con 15µL di Gel loading dye (colorante di corsa), il tutto, mediante l'ausilio di puntali dotati di capillari, sono stati caricati nei pozzetti. Nel primo e nell'ultimo pozzetto sono stati caricati i ladder.

La corsa elettroforetica è stata impostata a un voltaggio costante di 120 V per 5 ore alla temperatura di 60°C, utilizzando come tampone di corsa il TAE 1X (Reale et al., 2011). Terminata la corsa elettroforetica i gel sono stati immersi, per 15 min, in una soluzione di bromuro di etidio (50µg/mL) per la colorazione e, successivamente, immersi, per 15 min, in una vaschetta contenente acqua distillata per la decolorazione.

Le immagini sono state scansionate mediante l'utilizzo del GEL DOC XR system (BioRad) utilizzando il software Quantity One Analysis (BioRad) e analizzate mediante il pacchetto software GEL COMPARE II VERSIONE 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Il calcolo delle similarità nei profili delle bande è stato basato sul coefficiente di correlazione di Pearson mediante un algoritmo (Vauterin e Vauterin , 1992) ottenendo un dendrogramma dove è stato possibile valutare il grado di similarità dei vari ceppi isolati.

Al fine di arrivare all'identificazione della specie isolata, dall'analisi del dendrogramma, sono stati selezionati alcuni ceppi per il successivo sequenziamento.

5.5.4 Sequencing

I ceppi selezionati per il sequenziamento sono stati amplificati utilizzando il primer senso P1V1 5'- GCG GCG TGC CTA ATA CAT GC-3'(Cocolin et al., 2001) e il primer antisenso P4V3 5'- ATC TAC GCA TTT CAC CGC TAC-3' (Klijn et al., 1991) che amplificano circa 700 bp delle regioni V1-V3 del 16S rDNA. Le amplificazioni sono state eseguite mediante Mastercycler Gradient (EPPENDORF Hamburg, Germany) utilizzando il mix di reazione riportato in Tabella 5.5 e 35 cicli di reazione come riportati in Tabella 5.6.

Tabella 5.5 - Mix di reazione PCR

Reagenti	Concentrazione finale
Tampone Buffer (DyNAzyme DNA Polymerase F-511)	Tris-HCl 10 mM; KCl 50 mM; MgCl ₂ 1.5 mM
dNTPs:dATP, dCTP,dGTP, dTTP	0.2 mM ognuno
Primer senso P1V1	0.2 μM
Primer antisenso P4V3	0.2 μM
Polimerasi F-501L	1.25 UI
Acqua bi distillata	fino a 50 μL

Tabella 5.6 - Programma di amplificazione del DNA.

Denaturazione iniziale	95 °C x 5 min
Denaturazione	95 °C x 1 min
Annealing	42 °C x 1 min
Estensione	72 °C x 1.5 min
Estensione finale	72 °C x 7 min

Terminato il ciclo, i prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a purificazione utilizzando un PCR purification kit (Qiagen, Italia) e successivamente spediti ad una ditta esterna per il sequenziamento (MWG Biotech, Germania). La purificazione permette di allontanare dal DNA tutti gli altri composti lasciandolo in questo modo puro.

5.6 BIOTIPIZZAZIONE DEI BATTERI

5.6.1 Analisi RAPD-PCR

La fase successiva di questo lavoro ha previsto l'utilizzo della RAPD-PCR (randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction) allo scopo di valutare differenze intraspecifiche tra i ceppi di *Lb. plantarum* isolati.

Nella tabella 5.7 sono riportati i due primer utilizzati per la RAPD-PCR, come riportato da Andrighetto et al. (2001), nello specifico: M13 e D8635.

Tabella 5.7 - Primer per RAPD-PCR

primer	sequenza
M13	5' GAGGGTGGCGGTTCT 3' (Huey and Hall, 1989)
D8635	5' GAGCGGCCAAAGGGAGCAGAC 3' (Akopyanz et al., 1992)

Per l'amplificazione del DNA è stato utilizzato un mix base la cui composizione è riportata nella tabella 5.8 e tabella 5.9.

Tabella 5.8 - Mix amplificazione con primer D8635

buffer	10mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPS	0,2 mM
primer D8635	1 μM
taq	1,25 UI

Tabella 5.9 - Mix amplificazione con primer M13

buffer	10mM Tris HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 1.5mM MgCl ₂
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPS	0,2 mM
primer M13	1 μM
taq	1,25 UI

Le amplificazioni sono state eseguite utilizzando un termociclatore Mastercycler gradient (Eppendorf Hamburg, Germany) operando con cicli di amplificazione riportati nella tabella 5.10 e tabella 5.11.

Tabella 5.10 - Ciclo amplificazione con primer M13

denaturazione iniziale	94°Cx5min	
denaturazione	94°Cx1min	
annealing	42°Cx20sec	35 cicli
estensione	ramp72°C a 0.5°C/sec	
estensione finale	72°Cx2min	

Tabella 5.11 Ciclo amplificazione con primer D8635

denaturazione iniziale	94°Cx2min	
denaturazione	94°Cx1min	
annealing	42°Cx1min	35 cicli
estensione	72°Cx1min30sec	
estensione finale	72°Cx10min	

Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato un gel di agarosio al 1,5% (Sigma –Aldrich, Steinheim, Germany). I pozzetti sono stati caricati con un mix costituito da 2μL del colorante di

corsa loading buffer + 8µL di amplificato PCR e utilizzando come marcatori molecolari un mix del marker VI+III, caricati ai lati del gel per avere un migliore allineamento delle bande.

La corsa elettroforetica è stata impostata prima a 40V per i primi 10 min e poi a 110V per 3 ore utilizzando come tampone di corsa il buffer TBE 0,5X.

Terminata la corsa il gel è stato messo a colorare in una soluzione di bromuro di etidio per 30 min e poi lasciato decolorare in acqua per altri 30 min.

Le immagini sono state scansionate mediante l'utilizzo del GEL DOC XR system (BioRad) utilizzando il software Quantity One Analysis (BioRad) e analizzate mediante il pacchetto software GEL COMPARE II VERSIONE 2.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Il calcolo delle similarità nei profili delle bande è stato basato sul coefficiente di correlazione di Pearson mediante un algoritmo (Vauterin e Vauterin , 1992) ottenendo un dendrogramma dove è stato possibile valutare il grado di similarità dei vari ceppi isolati.

5.7 VALUTAZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA DI CEPPI DI *LB. PLANTARUM* IN CONDIZIONI DI STRESS

In una fase iniziale di screening, 58 ceppi di *Lb. plantarum* isolati da vino, il ceppo commerciale *Lb. plantarum* v22 e il ceppo tipo *Lb. plantarum* (DSMZ 20174) sono stati sottoposti a diverse condizioni di stress, tipiche dell'ambiente vino, al fine di valutare la capacità di sopravvivenza cellulare. In dettaglio, 50 mL di colture di *Lb. plantarum* coltivate in MRS broth a 28°C, sono state prelevate a metà fase esponenziale ($OD_{600}=1,2$) e centrifugate a 7.500 giri per 15 min a 4°C. Il pellet cellulare è stato lavato 2 volte con tampone fosfato 1X (PBS 1X) e risospeso in 50 mL di MRS sterile contenente etanolo (10% o 14%), o metabisolfito di potassio ($K_2S_2O_5$ 100 mg/L o 200 mg/L) o acidificato con acido L-malico fino a pH 3.5 o 2.5. I campioni sono stati incubati per 2 ore a 28°C ed è stato eseguito un conteggio vitale al fine di valutare la

sopravvivenza cellulare. A tale scopo è stato utilizzato un metodo di conteggio in piastra miniaturizzato.

In dettaglio, sono state eseguite diluizioni decimali (fino alla 10^{-6}) in micropiastre sterili da 96 pozzetti contenenti 180 μL di soluzione fisiologica sterile per mezzo di una micropipetta multicanale. Per ciascun campione sono stati prelevati 100 μL di brodocoltura e depositati nei pozzetti della prima colonna della micropiastra (A1 a F1). Dopo aver omogeneizzato i campioni, 20 μL sono stati diluiti in 180 μL di soluzione fisiologica sterile fino a raggiungere una diluizione di 10^{-6} (figura 5.1). Successivamente, per ciascun campione, mediante una micropipetta a 6 canali dotata di 3 puntali dislocati in maniera alternata, sono stati prelevati 10 μL e spottati su piastre Petri contenenti 20 mL di MRS agar. Su ogni piastra Petri sono state spottate 5 repliche per un volume totale di 50 μL /diluizione e 15 spots/piastra. In totale, per ogni campione sono state utilizzate 2 piastre petri contenenti 15 spots riguardanti le diluizioni dispari e 15 spots relativi alle diluizioni pari (vedi schema fig. 5.1). Dopo 20 minuti dall'inoculo, le piastre sono state incubate a 28°C per 24 h in condizioni di anaerobiosi.

Il conteggio è stato eseguito per ciascuna replica in modo tale da ottenere un valore medio relativo alla quantità totale di inoculo (50 μL). I risultati sono stati riportati come numero di Unità Formanti Colonie per mL (UFC/mL) applicando la seguente formula:

$$UFC/mL = \frac{\left(\frac{UFC/spot \times 5}{5} \right) \times F \times 1000}{50}$$

dove: F è il fattore di diluizione.

Tale metodo è stato validato eseguendo un conteggio vitale su 6 ceppi mediante la tecnica convenzionale del conteggio vitale in piastra.

La capacità di sopravvivenza dei ceppi appartenenti a *Lactobacillus* dopo l'esposizione di 2 h a diverse condizioni di stress è stata calcolata secondo la seguente formula:

$$\Delta Log = Log \left(\frac{UFC/mL (t2)}{UFC/mL (t0)} \right)$$

Inoltre è stato valutato il grado di similarità tra i ceppi, in termini di risposta alle diverse condizioni di stress, mediante cluster analysis utilizzando la metrica Euclidiana e l'algoritmo UPGMA. I risultati sono stati riportati come pseudo-heat map dove sulle linee sono riportati i ceppi e sulle colonne i fattori di stress.

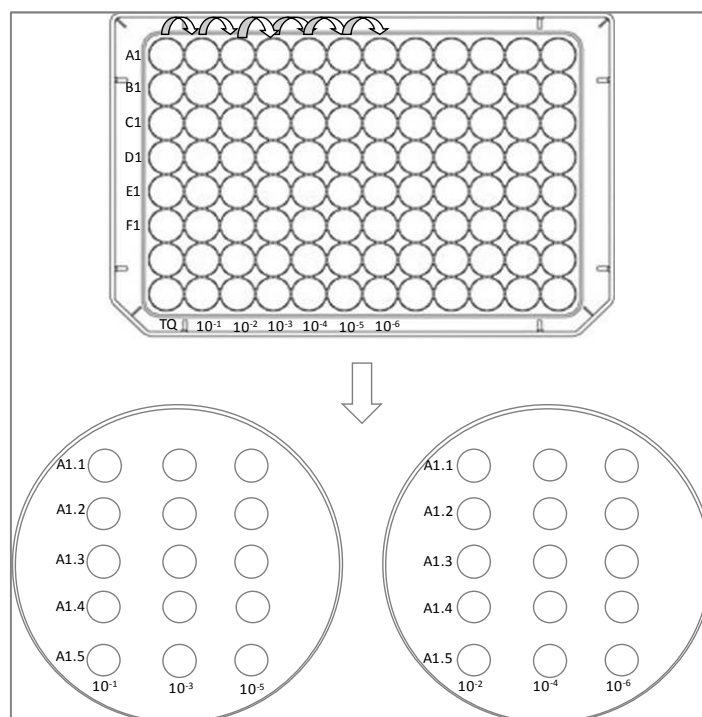


Figura 5.1 Metodo di diluizione in micropiastra

5.9 PRODUZIONE DI AMMINE BIOGENE

Dalla cluster analysis sono stati selezionati 8 ceppi appartenenti alla specie *L. plantarum* sui quali è stata valutata la capacità di produrre ammine biogene mediante due metodiche analitiche differenti.

Utilizzo del terreno di coltura

Prevede l'utilizzo di un terreno di coltura specifico al quale sono stati addizionati gli amminoacidi precursori. La composizione del terreno è riportata in tabella 5.12.

Tabella 5.12 Composizione del terreno

triptone	5g/L
estratto di lievito	5g/L
estratto di carne	5g/L
cloruro di sodio	2,1g/L
glucosio	1g/L
tween 80	1ml/L
MgSO ₄	0,02g/L
MnSO ₄	0,05g/L
FeSO ₄	0,04g/L
ammonio citrato	2g/L
K ₂ PO ₄	2g/L
piridossal-5-fosfato	0,01g/L
amminoacido	10g/L
bromocresol purple	0,06g/L
agar	20g/L
pH	5,3

Un risultato positivo, la produzione di ammine biogene, è indicato dal viraggio del colore del terreno, da marrone a viola, dovuto al cambiamento di pH. La variazione di pH è dipendente dalla produzione delle ammine biogene a partire dagli aminoacidi inizialmente inclusi nel terreno, le quali provocano un alcalinizzazione del mezzo. Questo discorso vale per tutti gli amminoacidi tranne per la tirosina, dove il risultato positivo è dato dalla presenza di un alone di chiarificazione risultante dalla scomparsa del precipitato. La tirosina, infatti, avendo una bassa solubilità, anche se utilizzata a basse concentrazioni, tende a precipitare, le piastre non risultano

traslucide, inoltre non si ha il caratteristico cambiamento di colore del terreno. Per la prova sono stati utilizzati i seguenti amminoacidi precursori: tirosina, fenilalanina, istidina, ornitina e lisina. I ceppi sono stati coltivati overnight in MRS broth a 30°C, dopodiché si è proceduto ad effettuare gli spot sulle piastre contenenti il medium con i diversi amminoacidi. La prova è stata eseguita in doppio e come controllo sono state utilizzate le piastre contenente il terreno senza aggiunta di amminoacidi dove sono stati strisciati i ceppi. Le piastre sono state incubate per 4 giorni a 30°C in giare per anaerobiosi dopodiché si è proceduto alla lettura delle piastre e all'analisi dei risultati.

RP-HPLC

Per uno studio più approfondito e per quantificare anche l'eventuale produzione o meno di ammine biogene, è stata utilizzata la tecnica RP-HPLC con rilevatore a fluorescenza. Come terreno di coltura per far crescere i ceppi è stato utilizzato MRS broth addizionato dei corrispondenti amminoacidi precursori (tabella 5.13).

Tabella 5.13 Amminoacidi precursori

Amminoacidi	
Tirosina (MRST)	2 g/L
Istidina (MRSI)	5 g/L
Ornitina (MRSO)	5 g/L
Fenilalanina (MRSF)	5 g/L
Lisina (MRSL)	5 g/L

Ogni amminoacido è stato inoculato individualmente. La tirosina è stata utilizzata ad una concentrazione più bassa, in quanto non si dissolveva bene nel mezzo di coltura. Per la prova è stato effettuato un inoculo cellulare dei ceppi, nei terreni contenenti gli amminoacidi precursori, pari a 10^8 UFC/mL dopodiché sono stati messi ad incubare a 30°C per 7 giorni sotto agitazione a 80rpm.

Trascorso il periodo di incubazione si è proceduto come di seguito riportato:

- Sono stati prelevati 2mL di brodocoltura e centrifugati a 4000rpm x 10 min a 5°C.

- E' stato raccolto il surnatante e 1mL di esso è stato filtrato con filtro da 0,22 μ m e posto nelle vials per HPLC.
- Per la prova, inoltre, è stato filtrato e messo nelle vials anche 1mL di acqua milliQ ed 1mL del terreno MRS contenente l'amminoacido senza la coltura batterica (come controllo), 1mL di tampone borato (0.4M pH10-10.5), 1mL dello standard e 1mL di OPA.

Le concentrazioni degli standard, preparati in soluzione acqua-etanolo (60:40) è riportata nella tabella 5.14 (Marcobal *et al.*, 2005).

Tabella 5.14 Ammine biogene utilizzate

Ammine	Concentrazione
Istamina	1,2 g/L
Metilamina	0,2 g/L
Etilamina	0,2 g/L
Tiramina	0,8 g/L
Feniletilamina	1 g/L
Putrescina	3 g/L
Cadaverina	3 g/L

Prima del suo utilizzo lo standard è stato diluito in una soluzione di acqua/etanolo al 10%.

Procedura di derivatizzazione

La formazione dei derivati *o*-ftalici è stata eseguita automaticamente. L'OPA-MCE è un reattivo derivatizzante, in un medio alcalino, il gruppo amminico primario dell'ammina biogena reagisce con l'ortoftalaldeide (OPA) in presenza di mercaptoetanolo (MCE) per formare dei derivati fluorescenti del tipo pseudo-indolo. I seguenti derivati possono essere separati tramite HPLC.

La soluzione di reazione risultava costituita da 350 mg di *o*-ftalaldeide (OPA) e da 2,5 mL di 2-mercaptoetanolo (MCE) in 47,5 mL di metanolo. Il reagente OPA-MCE non è stato utilizzato fino a 24 ore dopo la preparazione. Per la reazione di derivatizzazione, 16 μ L dei campioni sono stati mescolati automaticamente con 6 μ L di tampone borato (0,4 M, pH 10,5) e 12 μ L della soluzione di reazione. I campioni filtrati sono stati iniettati direttamente nel sistema HPLC.

Condizioni cromatografiche

Per la corsa sono state utilizzate la fase A costituita da disodio idrogeno fosfato dodecaidrato ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 3.6g/L pH 9) e la fase B costituita dall'1% di 2-octanolo in acetonitrile e dalla fase A (70:30 v/v). Il flusso è stato impostato a 0.80 ml/min 70% fase A e 30% di fase B.

Ogni campione è stato iniettato in doppio. Per la corsa cromatografica come strumento è stato utilizzato un WATERS 600 controller programmable solvent module (Waters, Milford, MA), un autocampionatore Wisp 710B (Waters, Milford, MA) e un rivelatore a fluorescenza (Hewlett-Packard). I dati cromatografici sono stati analizzati mediante un programma Millennium System (Waters, Milford, MA). La separazione è stata ottenuta utilizzando una colonna cromatografica Waters Nova-Pak C_{18} (150x3.9mm i.d., 60Å, 4µm) con una precolonna della stessa tipologia.

Le ammine derivatizzate sono state rilevate utilizzando un rivelatore di fluorescenza (lunghezza d'onda di eccitazione di 340nm e di emissione di 425nm).

Per controllare il sistema RP-HPLC è stato utilizzato un programma Empower Pro (Waters, Milford, MA).

5.10 EFFETTO DELLA PRE-ESPOSIZIONE A DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI ETANOLO SULLA CRESCITA DI *LB. PLANTARUM*

Al fine di valutare l'eventuale capacità di adattamento a concentrazioni di etanolo sub-letali, 8 ceppi di *Lb. plantarum*, rappresentativi dei cluster ottenuti dalla cluster analysis sono stati coltivati (pre-esposizione) in MRS broth (Oxoid) contenente il 2% (p2), 4% (p4) o 8% (p8) di etanolo. A metà fase esponenziale, i ceppi sono stati inoculati (1%) in MRS broth contenente l'8% (/8) e il 14% (/14) di etanolo. Come controllo, è stata eseguita una prova di crescita in MRS broth senza l'aggiunta di alcool etilico (p0). In totale, per ciascun ceppo, sono state eseguite 8 prove secondo il disegno sperimentale riportato in tabella 5.12. Le prove sperimentali sono state condotte alla temperatura di 28°C, e ad intervalli di tempo regolari è stata effettuata una misurazione della densità ottica delle brodocolture alla lunghezza d'onda di 600 nm (OD = 600) mediante uno spettrofotometro a singolo raggio. I dati sperimentali sono stati utilizzati per costruire delle curve di crescita utilizzando il modello dinamico di Gompertz.

Tabella 5.15 - Disegno sperimentale

Esperimento n.	% EtOH (pre-esposizione)				% EtOH (crescita)		ID esperimento
	0 (p0)	2 (p2)	4 (p4)	8 (p8)	8 (/8)	14 (/14)	
1	X				X		p0/8
2	X					X	p0/14
3		X			X		p2/8
4		X				X	p2/14
5			X		X		p4/8
6			X			X	p4/14
7				X	X		p8/8
8				X		X	p8/14

5.11 EFFETTO DELL'ETANOLO SULLA SOPRAVVIVENZA DI *LB. PLANTARUM*

Quattro ceppi di *Lb. plantarum* (M17, M28, T13 e R1), selezionati in base alla capacità di crescita in etanolo al 2% e all'8%, sono stati utilizzati al fine di valutare la sopravvivenza in etanolo al 14%. In dettaglio i ceppi sono stati coltivati in MRS broth (cellule non adattate) e in MRS broth contenente il 2% o l'8% di etanolo (cellule adattate), alla temperatura di 28°C. A metà fase esponenziale (OD~1,2), 50 mL di brodocolture sono state prelevate asepticamente e centrifugate a 7,500 $g \times$ per 15 min a 4°C. Le cellule sono state lavate due volte con tampone fosfato 1X (PBS, pH 7,5), risospese in 50 mL del medesimo tampone contenente il 14% di etanolo e incubate a 28°C per 24 h. Ad intervalli di tempo regolari è stato eseguito un conteggio vitale delle brodocolture. La capacità di sopravvivenza, è stata investigata mediante la determinazione del valore 4D, inteso come il tempo necessario affinché il 14% di etanolo provochi una riduzione della popolazione microbica di 4 cicli logaritmici. A tale scopo sono stati costruiti dei modelli primari di sopravvivenza microbica, basati sulle tecniche di regressione lineare e regressione non-lineare, utilizzando l'add-in di Microsoft Excel GinaFiT (Geeraerd et al., 2005). Al fine di scegliere il modello che meglio rappresenta la dinamica di sopravvivenza della popolazione microbica, per ciascun esperimento sono stati selezionati 3 modelli caratterizzati dall'errore quadratico medio (RMSE) più basso e successivamente è stato scelto il modello contraddistinto dal criterio d'informazione di Akaike corretto (AICc) più basso.

5.12 VALUTAZIONE DEL PROFILO PROTEICO

È stato analizzato il profilo proteico di 4 ceppi appartenenti a *Lb. plantarum* (M17, M28, T13 e R1) adattati al 2% di etanolo, allo scopo di comprendere l'effetto dell'alcol sul proteoma batterico. In dettaglio, le cellule sono state coltivate in MRS con etanolo al 2% (cellule adattate) e in MRS senza etanolo (cellule non adattate) alla temperatura di 28°C. Raggiunta la metà della

fase esponenziale (OD~1,2), le brodoculture sono state prelevate asetticamente, centrifugate a 7,500 $g \times$ per 15 min a 4°C e lavate mediante due successivi passaggi con PBS 1X al fine di allontanare eventuali residui colturali. Dal pellet cellulare sono state estratte le proteine totali mentre il surnatante è stato eliminato.

5.12.1 Estrazione delle proteine totali

Il pellet cellulare ottenuto dalla centrifugazione delle brodoculture è stato standardizzato (OD~100), risospeso in tampone d'estrazione (Tris-HCl 50 mM, Lisozima 2 mg/mL, Mutanolisina 50 U, pH 7,5) e addizionato di 8 biglie di vetro. I campioni sono stati vortexati per 3 min, incubati per 2 h a 37°C, vortexati per 3 min, sonicati per 5 min (0,8 Cycle, 100% Amplitude) e vortexati nuovamente per altri 3 min. Il surnatante contenente la frazione proteica è stato recuperato mediante centrifugazione a 16.000 $g \times$ per 30 min ad una temperatura di 4°C, mentre il pellet, contenente i frammenti cellulari, è stato eliminato. La concentrazione proteica è stata determinata mediante saggio colorimetrico basato sul metodo di Bradford.

5.12.2 SDS-PAGE

Ciascun estratto proteico è stato diluito con un'opportuna quantità di tampone di Laemmli 2X (1:2) e trattato a 100°C per 5 min, al fine di favorire la completa denaturazione delle proteine. Circa 80 μ g di proteine appartenenti a ciascun campione sono stati caricati in un gel di poliacrilammide da 1,0 mm al 4% T, 3,3% C (stacking gel) e separati in gel di running in gradiente 10-20% T, 3,3% C. Al fine di determinare il peso molecolare delle proteine, sono stati caricati degli standard molecolari (Bio-Rad) in tre pozzetti separati. La corsa elettroforetica è stata condotta per 120' a corrente costante (20 mA/gel) mediante l'apparato elettroforetico verticale Hoefer SE600 (Amersham, Biosciences). Al termine della corsa i gel sono stati colorati per 2 ore con Blu di CoomassieG-250 (BioSafe, Bio-Rad) e conservati in acqua a 4°C. Per ciascun campione sono state condotte tre corse elettroforetiche indipendenti.

5.12.3 Analisi delle immagini

I gel sono stati digitalizzati a 600 dpi mediante densitometro calibrato GS-800 (BioRad) ed elaborati con il software QuantityOne (Bio-Rad). In dettaglio, dopo aver eseguito il "background subtraction", è stato determinato il numero di bande per ciascun profilo proteico. I profili proteici dei campioni adattati in etanolo sono stati comparati con i profili proteici dei campioni non adattati. L'effetto dell'etanolo sul proteoma batterico è stato valutato da un punto di vista qualitativo (assenza/presenza di bande) e da un punto di vista quantitativo, inteso come rapporto tra il volume delle bande.

RISULTATI

6.1 RISULTATI DELLE ANALISI CHIMICO- FISICHE DEI VINI

Nella tabella 6.1 sono riportati i dati relativi alle analisi chimico-fisiche effettuate sui 23 campioni di vino. I dati mostrano che i valori di pH variano da un minimo di 3,42 (per il campione RMC) ad un massimo di 3,88 (per il campione AGA); tali valori sono in accordo esattamente con quelli tipici dei vini rossi prodotti nell'Italia Meridionale (Gambuti et al., 2007; Suzzi et al., 2012). Per quanto riguarda il contenuto in alcol i campioni di Aglianico, Taurasi, e Tintilia, come ci si aspettava, hanno mostrato i valori più alti. I dati relativi all'acidità totale mostrano valori più elevati nei campioni di Aglianico, Montepulciano e Tintilia. La variabilità nei dati ottenuti può essere attribuita a numerosi fattori quali la varietà dell'uva, l'origine, le tecniche di vinificazione, le popolazioni microbiche autoctone.

Tabella 6.1 Analisi chimico-fisiche dei vini

Campioni	Tipologia vino	Provenienza	pH	Alcol (% v/v)	ac.L-Malico (g/L)	ac.L-Lattico (g/L)	ac.totale (g/L)
AGA	Aglianico	Campania	3,88	13,6	0,1	2,3	6,9
AGB	Aglianico	Campania	3,71	13,6	0,8	2,1	6,6
MTA	Montepulciano	Molise	3,68	13,5	0,9	1,9	6,3
MTB	Montepulciano	Molise	3,70	13,3	0,6	1,4	6,4
MTG	Montepulciano	Molise	3,65	12,2	0,5	2,2	6,2
MTC	Montepulciano	Molise	3,60	13,2	1,2	2,4	6,9
MTD	Montepulciano	Molise	3,79	12,8	1,1	2,5	5,6
MTE	Montepulciano	Molise	3,80	12,6	1,4	2,3	5,4
PIN	Pentro d'Isernia	Molise	3,77	11,8	1,3	1,8	5,9
PID	Pentro d'Isernia	Molise	3,76	11,6	0,7	1,6	5,9
PDA	Piedirosso	Campania	3,68	12,6	0,4	1,9	6,1
PDS	Piedirosso	Campania	3,62	12,4	0,6	1,8	6,2
PDL	Piedirosso	Campania	3,65	12,8	0,4	2,1	6,5
RMC	Rosso Molise	Molise	3,42	13,5	0,9	1,6	5,8
RMD	Rosso Molise	Molise	3,80	12,1	1,6	2,3	5,9
TAB	Taurasi	Campania	3,76	13,2	1,5	1,8	6,0
TAS	Taurasi	Campania	3,69	13,1	1,4	1,9	5,9
TSB	Tintilia	Molise	3,54	14,6	0,2	1,9	6,2
TSD	Tintilia	Molise	3,86	14,2	0,4	2,2	6,8
TSE	Tintilia	Molise	3,76	14,0	0,6	1,9	7,4
TSG	Tintilia	Molise	3,86	14,3	0,7	1,5	7,6
PIL1	Tintilia	Molise	3,80	14,0	0,3	1,3	6,6
PIL3	Tintilia	Molise	3,70	14,4	0,8	1,8	6,5

6.2 RISULTATI ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE BATTERI

Nella tabella 6.2 sono riportati i risultati dell'analisi microbiologica eseguita sui campioni di vino rosso ed espressi in unità formanti colonie su millilitro (UFC/mL). I risultati relativi all'isolamento batterico hanno mostrato, indipendentemente dalla tipologia di vino da cui sono stati isolati, differenti valori di carica microbica che variano da $4,0 \times 10^2$ UFC/mL, nel campione MTB, a $8,8 \times 10^6$ UFC/mL nel campione TSB.

Tabella 6.2 - Risultati conteggio vitale dei batteri

Campioni	Tipologia	MRS*
AGA	Aglianico	$6,5 \times 10^4$
AGB	Aglianico	$5,0 \times 10^2$
MTA	Montepulciano	$6,0 \times 10^3$
MTB	Montepulciano	$4,0 \times 10^2$
MTG	Montepulciano	$3,3 \times 10^3$
MTC	Montepulciano	$5,5 \times 10^5$
MTD	Montepulciano	$5,8 \times 10^5$
MTE	Montepulciano	$4,8 \times 10^6$
PIN	Pentro d'Isernia	$2,4 \times 10^5$
PID	Pentro d'Isernia	$2,2 \times 10^3$
PDA	Piedirosso	$7,8 \times 10^3$
PDS	Piedirosso	$7,5 \times 10^3$
PDL	Piedirosso	$6,8 \times 10^3$
RMC	Rosso Molise	$9,8 \times 10^3$
RMD	Rosso Molise	$1,2 \times 10^5$
TAB	Taurasi	$2,3 \times 10^3$
TAS	Taurasi	$4,3 \times 10^3$
TSB	Tintilia	$8,8 \times 10^6$
TSD	Tintilia	$3,4 \times 10^5$
TSE	Tintilia	$4,5 \times 10^5$
TSG	Tintilia	$2,8 \times 10^6$
PIL1	Tintilia	$6,6 \times 10^5$
PIL3	Tintilia	$8,9 \times 10^4$

6.3 CARATTERIZZAZIONE FENOTIPICA

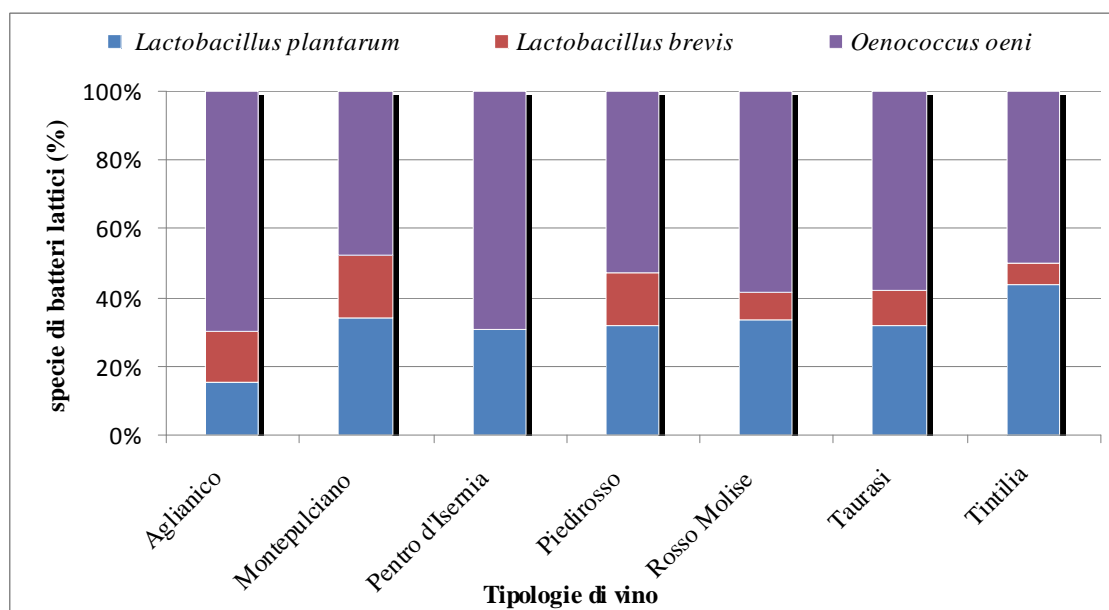
Dei 184 isolati, 80 sono risultati Gram positivi, catalasi negativi e di forma bastoncellare, quindi presumibilmente identificabili come lattobacilli, in accordo con la descrizione del genere e della specie riportata nel Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler and Weiss, 1986).

I restanti 104 isolati sono risultati di forma sferica, Gram positivi, catalasi negativi raggruppati a catenelle di piccola e media lunghezza, identificabili come cocci, presumibilmente appartenenti alla specie *Oenococcus oeni*; questi ultimi sono stati scartati perché non di interesse per lo studio condotto nel periodo del dottorato.

Gli 80 isolati presumibilmente appartenenti ai lattobacilli sono stati sottoposti a identificazione con l'impiego di gallerie API50 CHL che hanno permesso di identificarne 22 come *Lb. brevis* e 58 come *Lb. plantarum*.

Nella figura 6.1 è riportata la distribuzione, in percentuale, delle specie batteriche isolate dalle varie tipologie di vino campionati.

Figura 6.1 - Distribuzione dei batteri lattici nelle diverse tipologie di vino



Come si può notare dal grafico gli isolati ascrivibili a *Lb. plantarum* sono maggiormente presenti nei vini Tintilia.

Nella tabella 6.3 sono illustrati i risultati ottenuti dalle gallerie API50 CHL in dettaglio è riportata la sigla dei ceppi, le fonti di carbonio, i profili fermentativi dei ceppi, la specie identificata e la percentuale di affinità.

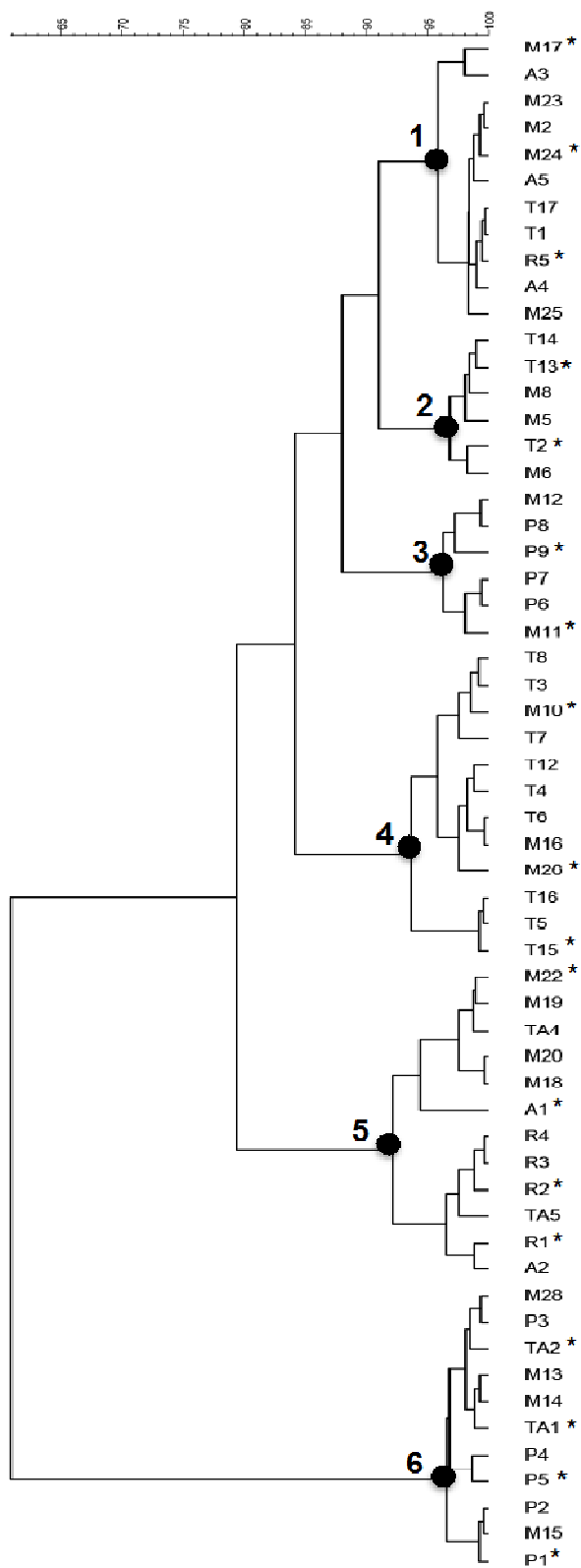
I 58 isolati presuntivamente identificati come *Lb. plantarum* sono stati mantenuti in collezione a -80°C in glicerolo al 40% e sottoposti a ulteriori prove di identificazione.

6.4 IDENTIFICAZIONE GENOTIPICA

Per confermare la preliminare identificazione dei 58 ceppi come *Lb. plantarum* è stata impiegata la tecnica PCR-DGGE. Nella figura 6.2 è riportato il dendrogramma che mostra il grado di similarità (Pearson Correlation) dei profili DGGE degli isolati.

Gli isolati sono stati raggruppati, in accordo con il loro profilo di migrazione, in 6 cluster. Dall'analisi dei cluster sono stati selezionati 18 ceppi (evidenziati nella figura mediante asterisco) e inviati ad una ditta esterna per il sequenziamento (Eurofin MWG Biotech Company, Ebersberg, Germany).

Figura 6.2 Dendrogramma dei profili DGGE dei 58 ceppi di batteri lattici con l'asterisco * sono contraddistinti i ceppi selezionati per il sequenziamento



Il sequenziamento ha permesso l'identificazione dei 18 ceppi e nella tabella 6.4 sono riportati i risultati ottenuti. Integrando questi risultati con quelli acquisiti dall'analisi dei cluster della DGGE è stato possibile identificare tutti i 58 ceppi come *Lb. plantarum*.

Tabella 6.4. Identificazione basata sul confronto dei dati del blast program in Gen Bank di 18 ceppi selezionati sulla base di analisi dei cluster DGGE

Cluster	Ceppi	Dimensioni	Specie	% di Affinità	Fonte ^a
1	M17	664	<i>Lb. plantarum</i>	100%	GU138574
	M24	584	<i>Lb. plantarum</i>	100%	GQ922601
	R5	635	<i>Lb. plantarum</i>	99%	JQ278711.1
2	T13	634	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JF728278.1
	T2	636	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JF728278.1
3	P9	636	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
	M11	635	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
4	M10	667	<i>Lb. plantarum</i>	99%	FJ915780
	M26	650	<i>Lb. plantarum</i>	99%	GU138574
	T15	616	<i>Lb. plantarum</i>	99%	JQ278711.1
5	M22	481	<i>Lb. plantarum</i>	99%	JQ278711.1
	A1	634	<i>Lb. plantarum</i>	100%	GU138574
	R2	636	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
	R1	634	<i>Lb. plantarum</i>	100%	JQ278711.1
	TA2	635	<i>Lb. plantarum</i>	99%	AB112083.1
6	TA1	637	<i>Lb. plantarum</i>	99%	AB112083.1
	P5	611	<i>Lb. plantarum</i>	99%	GU299081.1
	P1	611	<i>Lb. plantarum</i>	99%	GU299081.1

I ceppi, appartenenti alla specie *Lb. plantarum*, sono stati ulteriormente caratterizzati mediante RAPD-PCR.

I profili ottenuti con i primer M13 e D8635 hanno evidenziato una biodiversità tra i ceppi. La RAPD-PCR come riportato da alcuni autori (Andrighetto et al., 2004;. Catzeddu et al., 2006), è una buona tecnica per la biotipizzazione dei lattobacilli e per ottenere informazioni sulla diversità genetica.

In particolare dall'analisi del dendrogramma ottenuto mediante l'elaborazione dei risultati della RAPD si può notare che c'è una correlazione tra i diversi cluster e il vino di provenienza.

Considerando i profili delle bande mostrati nel dendrogramma riportato in figura 6.3, i ceppi di *Lb. plantarum* hanno clusterizzato in 11 gruppi:

Cluster A: 4 ceppi tutti isolati da vino Montepulciano.

Cluster B: 1 ceppo isolato da vino Montepulciano.

Cluster C: 10 ceppi isolati da vino Montepulciano.

Cluster D: 6 ceppi isolati da vino Montepulciano.

Cluster E: 9 ceppi isolati da vino Piediroso e Pentro d'Isernia.

Cluster F: 5 ceppi isolati da vino Aglianico.

Cluster G: 5 ceppi isolati da vino Rosso Molise.

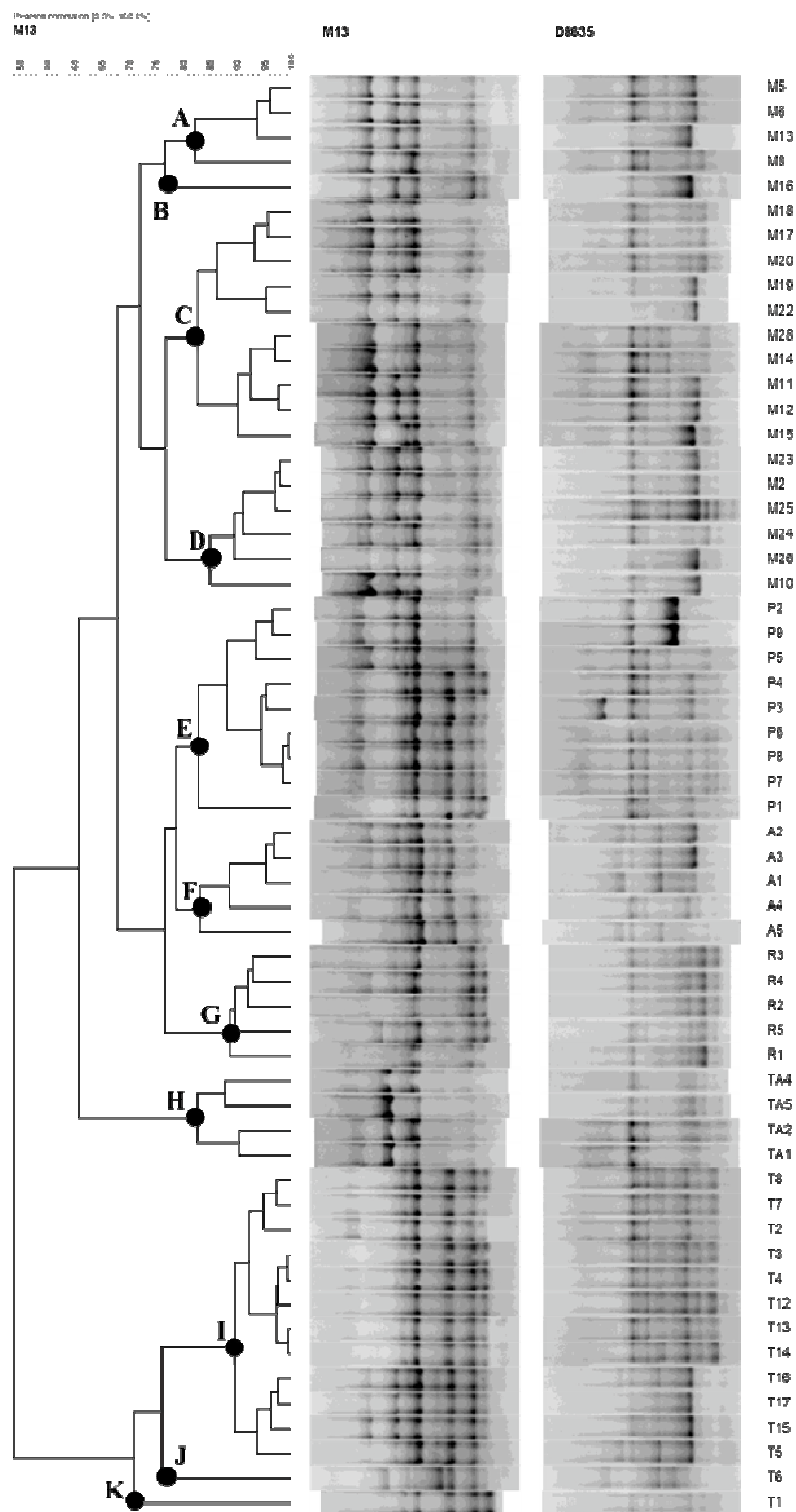
Cluster H: 4 ceppi isolati da vino Taurasi.

Cluster I: 12 ceppi isolati da vino Tintilia.

Cluster J: 1 ceppo isolato da vino Tintilia.

Cluster K: 1 ceppo isolato da vino Tintilia.

Figura 6.3. Dendrogramma che mostra i profili RAPD dei ceppi di *Lb. plantarum*.



6.5 VALUTAZIONE DELLA SOPRAVVIVENZA DI CEPPI DI *LB. PLANTARUM* IN CONDIZIONI DI STRESS

In figura 6.4 sono riportati i risultati riguardanti lo studio della capacità di sopravvivenza di 60 ceppi *Lb. plantarum* alle diverse condizioni di stress riscontrate vino. Dalla pseudo-heat mat, è possibile osservare che sia il 10% o il 14% di etanolo sia il pH 3.5 (cluster A), esercitano un'azione ingiuriosa più blanda rispetto all'azione esercitata dalla SO₂ (cluster B) e dal pH 2.5 (cluster C). Inoltre, come atteso, la risposta alle condizioni di stress è ceppo-specifica e non è correlabile alla tipologia di vino dal quale sono stati isolati i ceppi.

Dall'analisi emerge che 16 ceppi (cluster 1) si caratterizzano per una maggiore capacità di sopravvivenza alle condizioni di stress, 22 ceppi (cluster 2) mostrano una buona resistenza all'etanolo e alla SO₂ ma una scarsa resistenza al pH 2.5, 21 ceppi (cluster 3) si caratterizzano per una buona resistenza all'etanolo e al pH 3.5 e una scarsa resistenza alla SO₂ e al pH 2.5, mentre un ceppo (cluster 4) risulta essere poco resistente a tutte le condizioni. Dalla presente indagine sono stati selezionati 8 ceppi, rappresentativi dei 4 cluster, e testati al fine di valutare la capacità di crescita fino al 14% di etanolo, senza o con una precedente esposizione a concentrazioni di etanolo più basse.

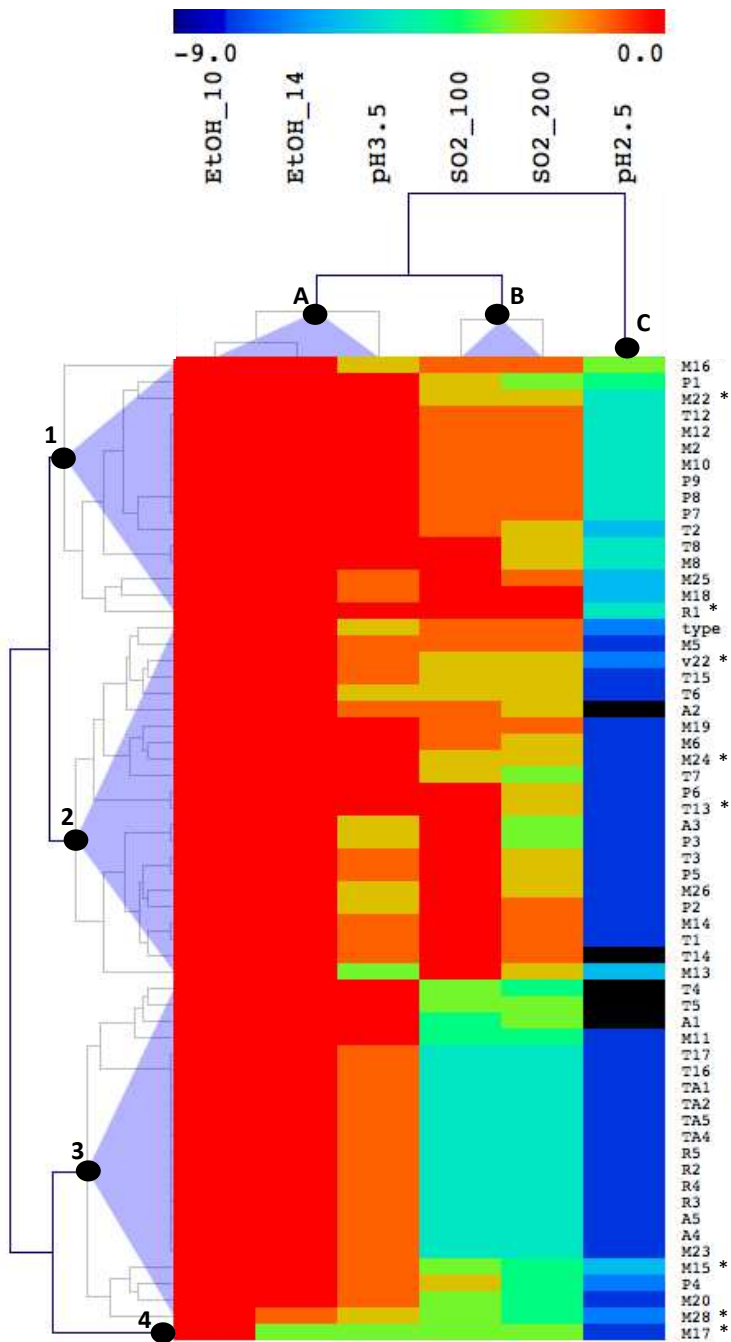


Figura 6.4. Pseudo-heat map riguardante la capacità di sopravvivenza di 60 ceppi di *Lb. plantarum*, dopo 2 ore di incubazione a 28°C in MRS broth contenente il 10% di etanolo (EtOH_10), il 14% di etanolo (EtOH_14), 100 mg/L di $K_2S_2O_5$ (SO₂ 100), 200 mg/L di $K_2S_2O_5$ (SO₂ 200) o acidificato con acido L-malico fino a pH 3.5 o 2.5.

6.6. PRODUZIONE DI AMMINE BIOGENE

Dalla cluster analysis sono stati selezionati 8 ceppi appartenenti alla specie *L. plantarum* e sono stati analizzati al fine di valutare la capacità di produrre ammine biogene. Come controllo è stato utilizzato il ceppo commerciale V22, il quale, come specificato nella scheda tecnica, risulta non produttore di ammine.

Per lo studio sono state adottate due metodiche analitiche, mediante l'impiego di un terreno di coltura specifico e RP-HPLC.

La prima determinazione è stata effettuata utilizzando uno specifico terreno di coltura addizionato dell'1% dei relativi amminoacidi precursori (metodo qualitativo).

Tutti i ceppi testati, compreso il ceppo commerciale V22, sono risultati non produttori di istamina, tiramina, putrescina, feniletilamina e cadaverina.

Successivamente, è stata effettuata un'analisi dei ceppi mediante RP-HPLC con rilevatore a fluorescenza (metodo quantitativo).

Per la prova i ceppi sono stati inoculati in MRS broth contenente i diversi amminoacidi precursori.

E' stato effettuato, in primo luogo, un conteggio vitale in piastra (MRS agar), per stimare la carica cellulare di partenza; dal conteggio si è visto che questa era compresa in un range compreso tra 1.1×10^8 e 3.2×10^8 UFC/mL.

Questa prima fase è molto importante perché ha permesso di avere un inoculo con la stessa carica cellulare per tutti i ceppi testati.

Per ogni ceppo sono stati ottenuti dei cromatogrammi dai quali è stato possibile valutare i tempi di ritenzione e la relativa comparsa dei picchi, e nell'eventualità stimare la concentrazione dell'ammina prodotta.

Integrando i risultati ottenuti con quelli dello standard e del controllo si è visto che nessun ceppo è risultato produttore di istamina, tiramina, putrescina, feniletilamina e cadaverina.

I dati ottenuti mediante RP-HPLC hanno quindi confermato i risultati acquisiti con l'utilizzo del terreno di coltura.

Nelle figure 6.5, 6.6 e 6.7 sono riportati, come esempio, i cromatogrammi del ceppo R1 relativi alle principali ammine riscontrabili nel vino, ovvero: tiramina, istamina e putrescina.

Nella figura 6.5 è riportato il cromatogramma relativo alla produzione di istamina.

Come si può notare dal grafico al tempo di ritenzione corrispondente all'istamina non c'è la comparsa del picco, infatti facendo un confronto anche con lo standard ed il controllo si può dedurre che il ceppo R1 non è produttore di istamina.

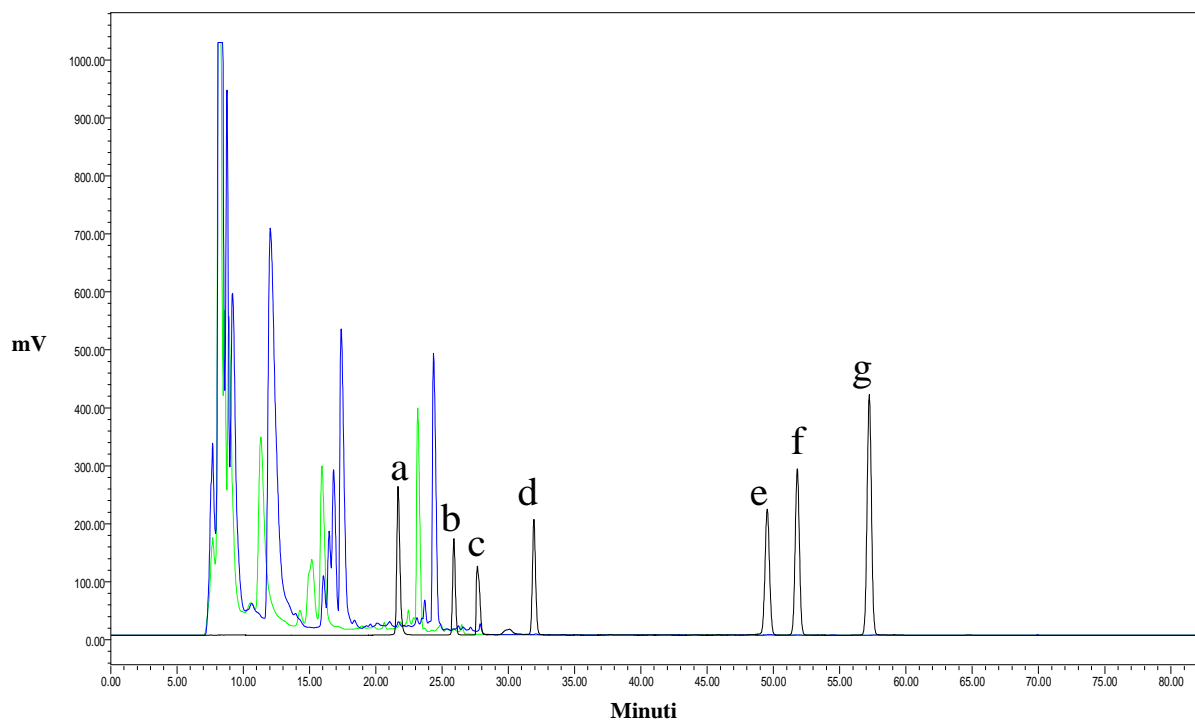


Figura 6.5 Cromatogramma del ceppo *L. plantarum* R1 relativo alla produzione di istamina

In nero è riportato il cromatogramma che mostra i picchi relativi alle ammine biogene utilizzate, le lettere indicano, nello specifico: a) Istamina; b) metilamina; c) etilamina d) tiramina; e) feniletilamina; f) putrescina; g) cadaverina. In blu è riportato il cromatogramma del ceppo R1 inoculato in MRS con aggiunta di istidina. In verde è riportato il cromatogramma relativo al controllo costituito dal terreno MRS con aggiunta di istidina, senza il ceppo batterico.

Nella figura 6.6 è riportato il cromatogramma relativo alla produzione di tiramina.

Come si può notare dal grafico al tempo di ritenzione corrispondente alla tiramina non c'è la comparsa del picco, infatti facendo un confronto anche con lo standard ed il controllo si può dedurre che il ceppo R1 è non produttore di tiramina.

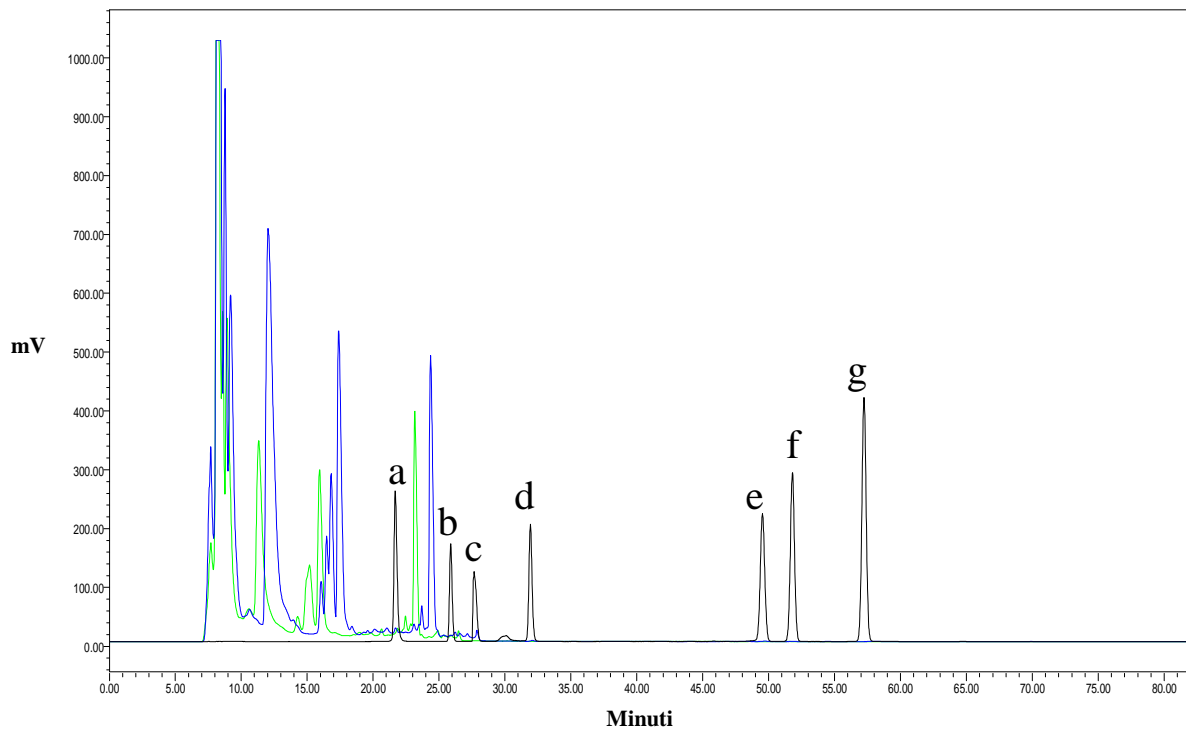


Figura 6.6 Cromatogramma del ceppo *L. plantarum* R1 relativo alla produzione di tiramina

In nero è riportato il cromatogramma che mostra i picchi relativi alle ammine biogene utilizzate, le lettere indicano, nello specifico: a) istamina; b) metilamina; c) etilamina d) tiramina; e) feniletilamina; f) putrescina; g) cadaverina. In blu è riportato il cromatogramma del ceppo R1 inoculato in MRS con aggiunta di tirosina. In verde è riportato il cromatogramma relativo al controllo costituito dal terreno MRS con aggiunta di tirosina, senza il ceppo batterico

Nella figura 6.7 è riportato il cromatogramma relativo alla produzione di putrescina.

Anche in questo caso come si può notare dal grafico al tempo di ritenzione corrispondente alla putrescina non c'è la comparsa del picco, infatti facendo sempre un confronto con lo standard ed il controllo si può dedurre che il ceppo R1 è anche non produttore di putrescina.

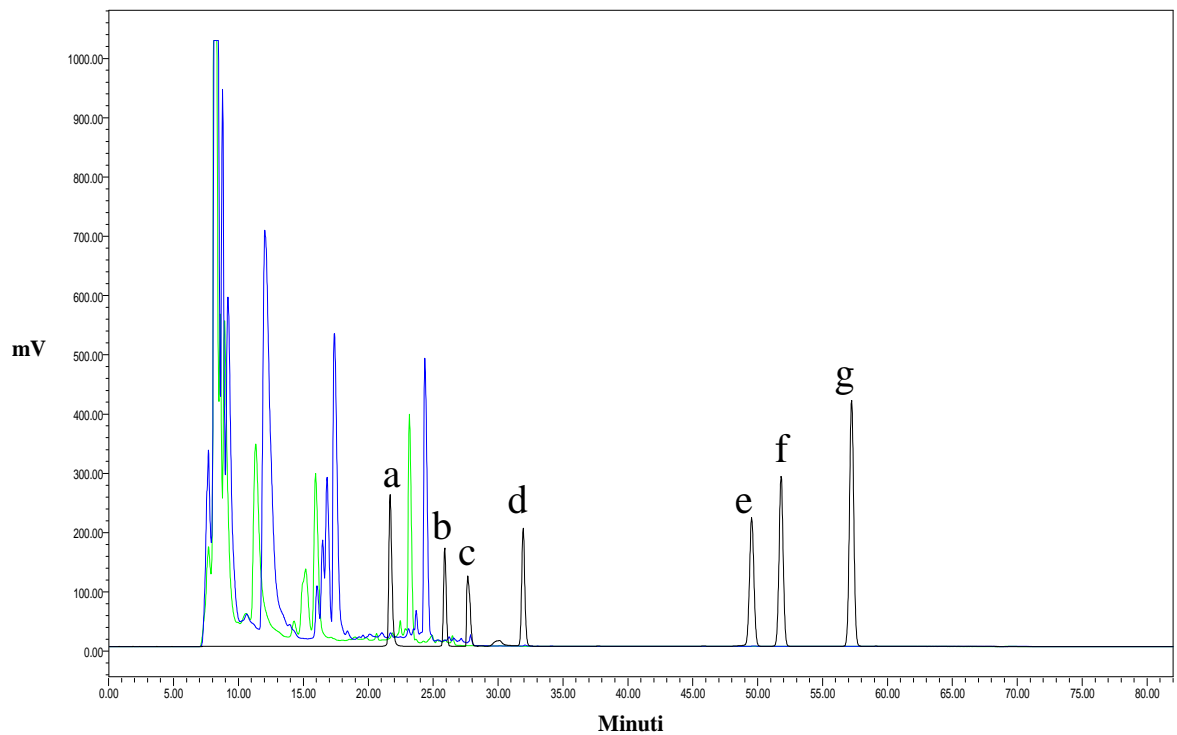


Figura 6.7 Cromatogramma del ceppo *L. plantarum* R1 relativo alla produzione di putrescina

In nero è riportato il cromatogramma che mostra i picchi relativi alle ammine biogene utilizzate, le lettere indicano, nello specifico: a) Istamina; b) metilamina; c) etilamina d) tiramina; e) feniletilamina; f) putrescina; g) cadaverina. In blu è ripottrato il cromatogramma del ceppo R1 inoculato in MRS con aggiunta di ornitina. In verde è riportato il cromatogramma relativo al controllo costituito dal terreno MRS con aggiunta di ornitina, senza il ceppo batterico

6.7 VALUTAZIONE DELLA CRESCITA ED EFFETTO DELLA PRE-ESPOSIZIONE DI *LB. PLANTARUM* IN PRESENZA DI ETANOLO

Dall'analisi dei cluster sono stati selezionati 8 ceppi appartenenti a *Lb. plantarum*, rappresentativi dei 4 cluster, e testati al fine di valutare la capacità di crescita all'8% e al 14% di etanolo, in seguito a pre-esposizione al 2%, 4% e 8% di etanolo. Come controllo sono state eseguite delle prove di crescita con ceppi non esposti all'etanolo.

In figura 6.8 e in tabella 6.5 sono riportate le curve di crescita e i parametri cinetici di *Lb. plantarum* T13 coltivato in MRS contenente l'8% o il 14% di etanolo precedentemente esposto a 0, 2, 4 e 8% di alcol; i risultati mostrano che il ceppo è in grado di crescere, seppure con cinetiche diverse in presenza di etanolo all'8%.

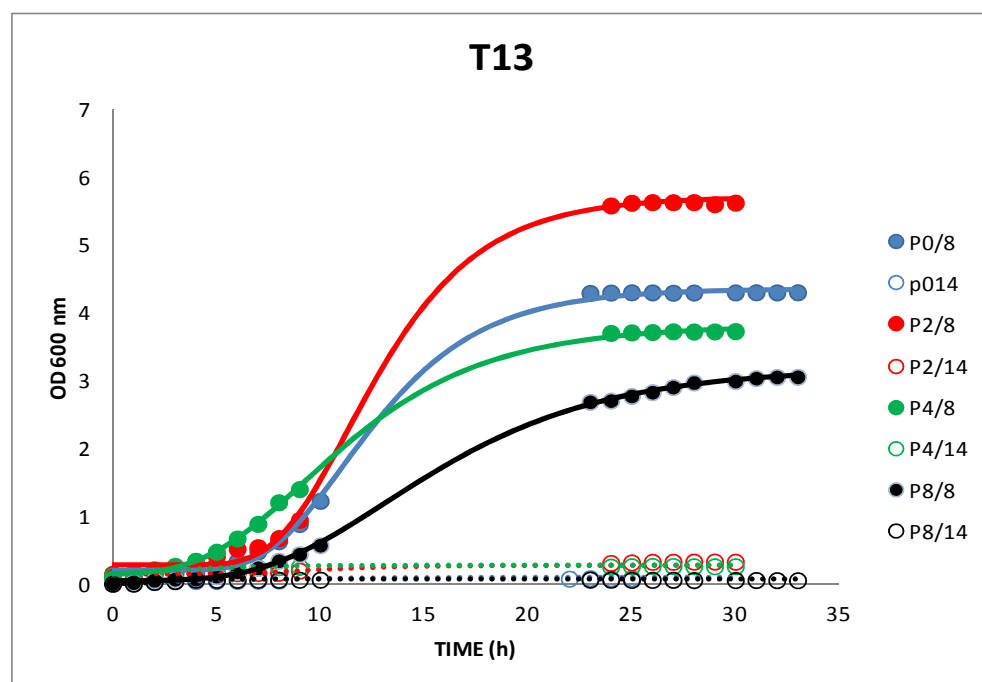


Figura 6.8 Curve di crescita di *Lb. plantarum* T13 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (P0), 2% (P2), 4% (P4) e 8% (P8) di etanolo.

Tabella 6.5 Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* T13 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (P0), 2% (P2), 4% (P4) e 8% (P8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	P0/8	P2/8	P4/8	P8/8	P0/14	P2/14	P4/14	P8/14
Lag (h)	7,4	7,8	4,4	7,3	0,0	6,1	0,0	1,1
μ_{max} (h ⁻¹)	0,42	0,57	0,28	0,20	0,01	0,02	0,02	0,03
yEnd	4,36	5,71	3,81	3,18	0,09	0,28	0,26	0,06
R ²	0,999	0,998	1,000	1,000	0,938	0,363	0,980	0,966

La cinetica di crescita è influenzata sia dalla pre-esposizione sia dalla concentrazione di etanolo.

In particolare le cellule pre-esposte al 2% sono in grado di crescere in presenza dell'8% di etanolo (p2/8) ad una velocità specifica di crescita (μ_{max}) pari a 0.57 h⁻¹ mentre le cellule che non hanno subito una pre-esposizione (p0/8) mostrano un μ_{max} pari a 0.42 h⁻¹. Tale dato suggerisce che il ceppo T13 è in grado di sviluppare dei meccanismi di adattamento soltanto quando è esposto a percentuali di alcol pari a 2 e non in assenza o in presenza di una pre-esposizione pari al 4 e all' 8%. Al contrario tali concentrazioni sembrerebbero influenzare negativamente la crescita microbica e provocare un danno cellulare pregiudicandone l'attività. Infatti si può notare che la μ_{max} cala fino a valori di 0.28 h⁻¹ e 0.20 h⁻¹ rispettivamente per p4/8 e p8/8. Un dato degno di nota riguarda la carica microbica finale (yEnd) che aumenta da 4.36 (p0/8) a 5.71(p2/8). Inoltre la fase lag aumenta solo in p2/8 e diminuisce per tutte le altre condizioni. Per quanto riguarda lo studio della capacità di crescita in presenza di etanolo al 14% sia in assenza sia in presenza di pre-adattamento non si nota crescita microbica.

I risultati riportati in figura 6.9 e in tabella 6.6 rappresentano le curve di crescita e i parametri cinetici di *Lb. plantarum* M28. I risultati rivelano che la velocità di crescita specifica (μ_{max}) di p2/8 è sostanzialmente sovrapponibile alla μ_{max} registrata in p0/8.

La fase lag aumenta da 6.8 h nella condizione p0/8 a 7.2 h in p2/8. Tale parametro aumenta fino a 9.9 h anche per p8/8. A concentrazioni di etanolo pari al 14% non si registra crescita in alcuna condizione di pre-adattamento.

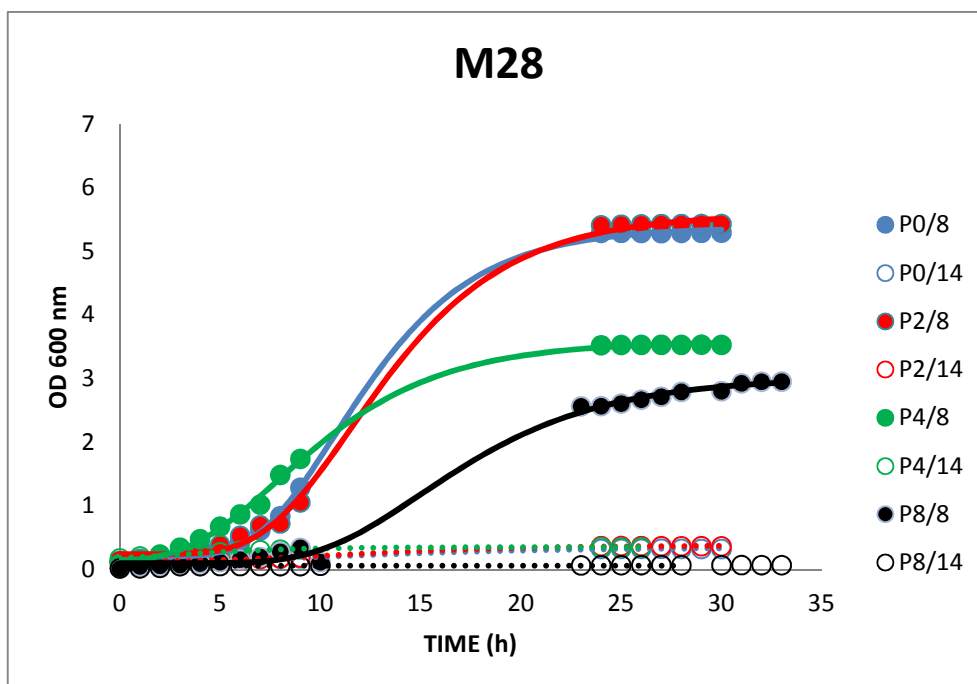


Figura 6.9. Curve di crescita di *Lb. plantarum* M28 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

Tabella 6.6. Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* M28 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (P0), 2% (P2), 4% (P4) e 8% (P8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	p0/8	p2/8	p4/8	p8/8	p0/14	p2/14	p4/14	p8/14
Lag (h)	6,8	7,2	3,4	9,9	5,1	5,1	0,0	1,8
μ_{max} (h ⁻¹)	0,49	0,45	0,28	0,21	0,01	0,02	0,02	0,02
yEnd (OD ₆₀₀)	5,4	5,6	3,6	3,0	0,3	0,4	0,4	0,1
R ²	1,000	0,999	0,999	0,997	0,993	0,997	0,989	0,837

In figura 6.10 e in tabella 6.7 sono riportati i risultati riguardanti le curve di crescita e i relativi parametri cinetici del ceppo del commercio *Lb. plantarum* V22 coltivato in MRS contenente l'8% o il 14% di etanolo dopo essere stato pre-esposto o non, a concentrazioni di etanolo pari al 2%, 4% e 8%. I dati evidenziano che *Lb. plantarum* V22 è in grado di crescere nella condizione p0/8 con una velocità specifica di crescita massima pari a 0,41 h⁻¹, valore che risulta essere leggermente inferiore a quello stimato per p0/8.

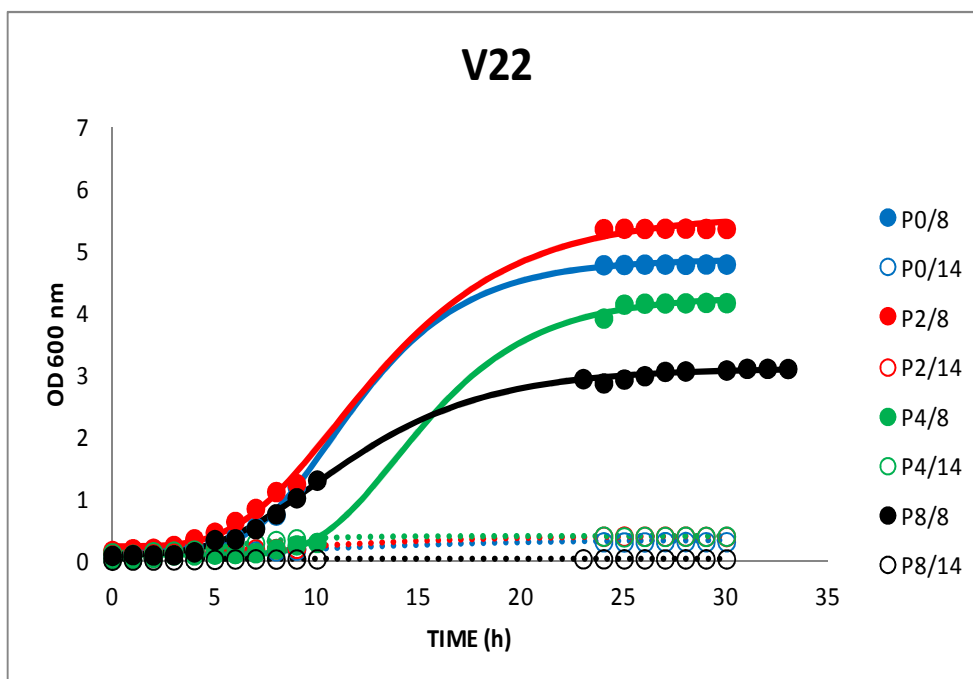


Figura 6.10. Curve di crescita di *Lb. plantarum* V22 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

Tabella 6.7. Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* V22 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (P0), 2% (P2), 4% (P4) e 8% (P8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	p0/8	p2/8	p4/8	p8/8	p0/14	p2/14	p4/14	p8/14
Lag (h)	6,9	6,1	10,1	5,1	5,3	5,6	3,2	2,6
μ_{max} (h^{-1})	0,46	0,41	0,41	0,24	0,01	0,02	0,04	0,01
yEnd (OD ₆₀₀)	4,9	5,6	4,3	3,1	0,3	0,4	0,4	0,1
R ²	1,000	0,999	0,999	0,999	0,996	0,997	0,991	0,977

Un dato simile è apprezzabile anche per quanto riguarda la fase lag, infatti in entrambe le condizioni la durata della fase lag è di circa 6-7 ore. Per quanto riguarda i parametri cinetici relativi alla condizione p4/8, la μ_{max} risulta essere uguale a quella registrata per p0/8 e p2/8 mentre la fase lag risulta essere significativamente incrementata. Meno performanti sono le cellule pre-esposte all'8% di etanolo e coltivate in MRS contenente la medesima concentrazione di alcol etilico (p8/8). In tale circostanza il valore μ_{max} risulta essere ridotto di due grandezze rispetto alle condizioni p0/8, p2/8 e p4/8. Per quanto riguarda il parametro cinetico relativo alla

concentrazione cellulare raggiunta in fase stazionaria (y_{End}), è evidenziabile che soltanto nelle condizioni sperimentali p0/8 e p2/8 è possibile apprezzare un maggiore incremento della concentrazione cellulare, mentre per concentrazioni di etanolo più elevate (p4/8 e p8/8), si assiste ad un significativo arresto della crescita. Per quanto riguarda gli esperimenti condotti al 14% di etanolo, non è possibile apprezzare alcuna crescita anche se le cellule sono state pre-esposte ad una bassa concentrazione di etanolo.

In figura 6.11 e in tabella 6.8 sono riportate le curve di crescita e i parametri cinetici del ceppo *Lb. plantarum* R1. Come per i ceppi precedentemente esaminati anche per *Lb. plantarum* R1 è possibile osservare una buona capacità di crescita quando le cellule sono coltivate in presenza di etanolo all'8% in seguito ad una pre-esposizione al 2% di alcol. In dettaglio, le cellule pre-esposte al 2% sono in grado di crescere in MRS 8% di etanolo alla velocità specifica di crescita pari a 0.56 h^{-1} , velocità che risulta essere leggermente maggiore rispetto a quella registrata in p0/8. Per entrambe le condizioni la fase lag è pari a circa 7 h. Solo per p4/8 la fase lag aumenta di circa 1h rispetto a p0/8. La carica microbica finale (y_{End}) aumenta notevolmente in p2/8 rispetto alle altre condizioni. Per quanto riguarda gli esperimenti riguardanti la crescita microbica in etanolo al 14%, in tutti i casi non è possibile assistere ad un aumento significativo della crescita microbica.

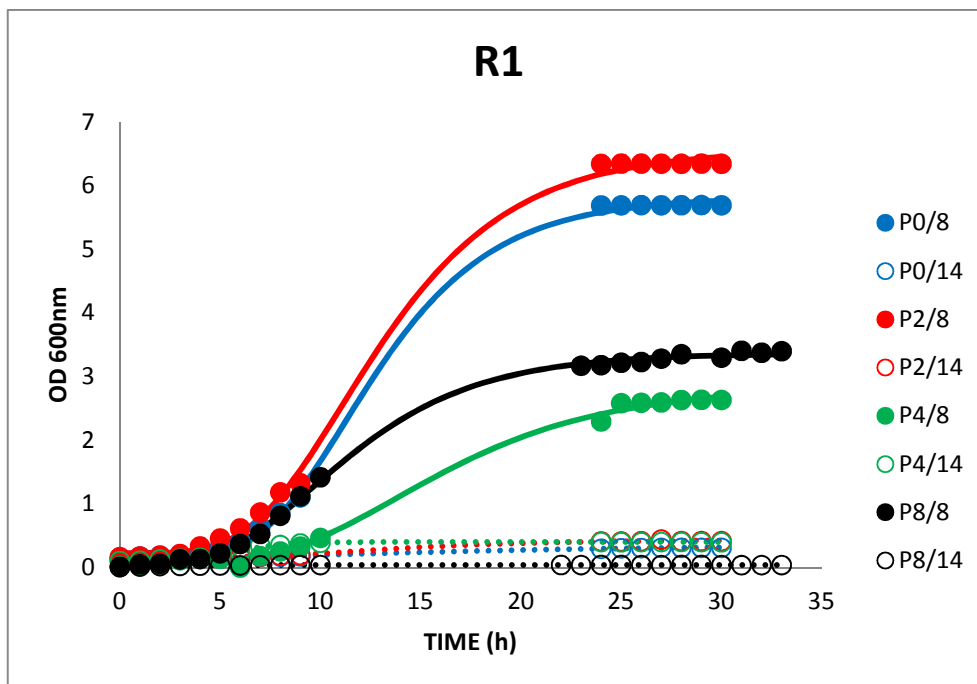


Figura 6.11. Curve di crescita di *Lb. plantarum* R1 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

Tabella 6.8. Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* R1 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (P0), 2% (P2), 4% (P4) e 8% (P8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	p0/8	p2/8	p4/8	p8/8	p0/14	p2/14	p4/14	p8/14
Lag (h)	7,2	6,5	8,1	5,1	0,0	7,0	4,1	0,0
μ_{max} (h ⁻¹)	0,51	0,56	0,18	0,27	0,01	0,02	0,07	0,01
yEnd (OD ₆₀₀)	5,8	6,6	2,9	3,4	0,3	0,4	0,4	0,0
R ²	0,999	0,999	0,998	0,999	0,994	0,996	0,988	0,973

In figura 6.12 e in tabella 6.9 sono riportati i risultati riguardanti la crescita e i parametri cinetici del ceppo *Lb. plantarum* M22. Dai dati ottenuti è possibile osservare che in condizioni di pre-adattamento al 2% di etanolo e crescita all'8% (p2/8), i valori di μ_{max} e della fase lag sono sostanzialmente invariati rispetto a quelli ottenuti dalla prova senza pre-adattamento (P0/8). Al contrario, la pre-esposizione al 4% o all'8 % di etanolo provoca l'incremento della fase lag e una sensibile riduzione della μ_{max} quando *Lb. plantarum* M22 è coltivato in presenza dell'8% di etanolo. Un ulteriore dato degno di attenzione riguarda il risultato relativo alla concentrazione

cellulare raggiunta in fase stazionaria (yEnd). Infatti, la pre-esposizione al 2% di etanolo consente di ottenere il raggiungimento una carica microbica maggiore (yEnd =6) rispetto a quella ottenuta quando il ceppo non è esposto all'etanolo o quando è esposto al 4% o all'8% di alcol etilico. Mentre in presenza del 14% di etanolo, in nessun caso è apprezzabile un significativo incremento cellulare.

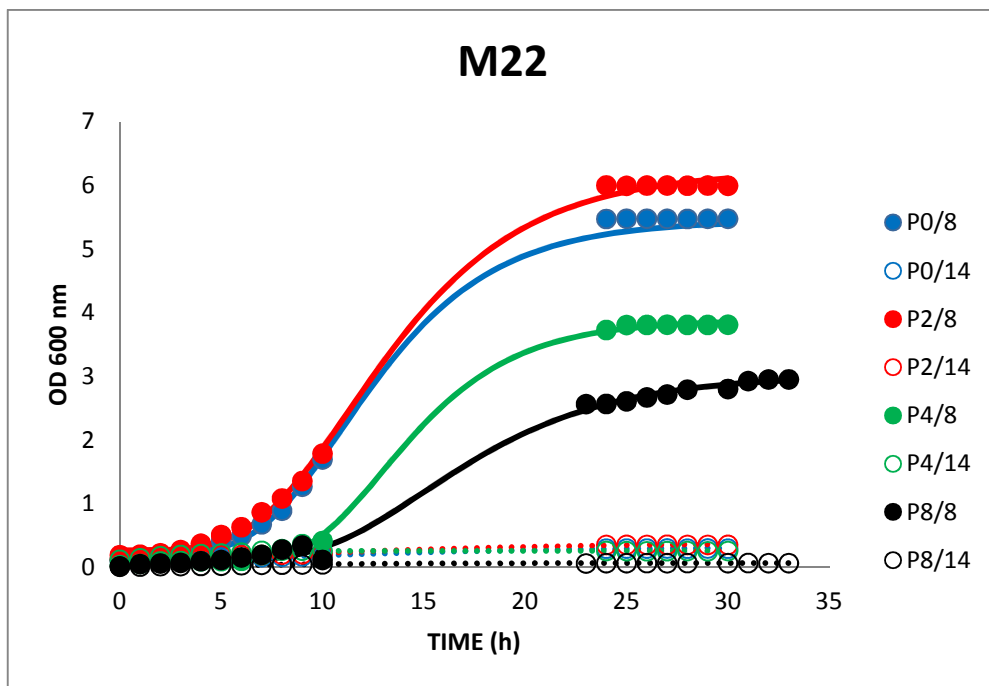


Figura 6.12. Curve di crescita di *Lb. plantarum* M22 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

Tabella 6.9. Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* M22 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	p0/8	p2/8	p4/8	p8/8	p0/14	p2/14	p4/14	p8/14
Lag (h)	6,8	6,5	9,3	9,9	3,7	0,2	0,0	0,0
μ_{max} (h ⁻¹)	0,46	0,46	0,38	0,21	0,01	0,01	0,03	0,00
yEnd (OD ₆₀₀)	5,5	6,2	3,9	3,0	0,3	0,4	0,3	0,1
R ²	0,989	0,999	0,999	0,997	0,991	0,992	0,970	0,990

In figura 6.13 e in tabella 6.10 sono riportati i risultati dei modelli cinetici relativi alla crescita di *Lb. plantarum* M24 coltivato in presenza dell'8% o del 14% di etanolo, in seguito alla pre-esposizione al 2%, 4% o 8% di etanolo. I risultati evidenziano che nella condizione p2/8 non si evidenzia un aumento della μ_{max} rispetto alla condizione p0/8. Mentre nella condizione p4/8 e p8/8 la velocità specifica di crescita massima risulta essere sensibilmente ridotta. Anche la durata della fase lag risulta essere invariata tra p0/8 e p2/8 mentre risulta essere più corta per p4/8 e significativamente maggiore per la condizione p8/8. Di interesse è il dato riguardante la concentrazione cellulare raggiunta in fase stazionaria. Infatti in seguito a pre-esposizione al 2% di etanolo (p2/8) il parametro cinetico y_{End} risulta essere maggiore in assoluto rispetto alle altre condizioni. Al contrario, in seguito alla pre-esposizione all'8% di etanolo (p8/8) il parametro cinetico y_{End} è sensibilmente ridotto. Per quanto riguarda i risultati riguardanti le prove condotte in presenza del 14% di etanolo, in tutti i casi si apprezza la completa inibizione della crescita.

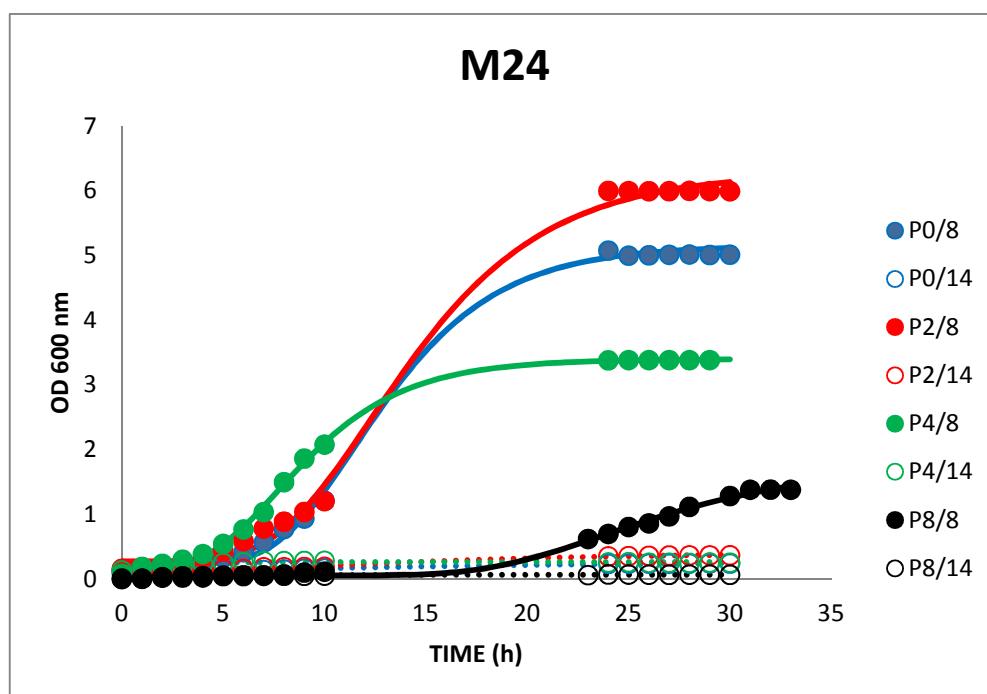


Figura 6.13. Curve di crescita di *Lb. plantarum* M24 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

Tabella 6.10 Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* M24 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	p0/8	p2/8	p4/8	p8/8	p0/14	p2/14	p4/14	p8/14
Lag (h)	7,6	7,6	4,3	18,0	0,0	3,6	0,0	0,0
μ_{max} (h ⁻¹)	0,47	0,46	0,34	0,11	0,01	0,01	0,03	0,01
yEnd (OD ₆₀₀)	5,2	6,3	3,4	1,8	0,3	0,4	0,3	0,1
R ²	0,996	0,997	0,999	0,995	0,985	0,996	0,869	0,955

I risultati relativi al ceppo *Lb. plantarum* M15 sono riportati in figura 6.14 e tabella 6.11, dai quali emerge che i parametri cinetici relativi alla condizione p2/8 risultano essere sostanzialmente invariati rispetto alla condizione p0/8. Al contrario il parametro cinetico μ_{max} è ridotto di circa 2-3 volte per p4/8 e p8/8 rispetto a quello stimato per p0/8. Anche il parametro cinetico yEnd subisce una significativa riduzione in seguito a pre-esposizione al 4% o 8% di etanolo (p4/8 e p8/8). Di interesse è il risultato riguardante l'effetto inibente del 14% di etanolo sulla crescita di *Lb. plantarum* M15 anche in seguito a pre-esposizione a basse concentrazioni di alcol etilico. Ciò sta a significare che il ceppo M15 non risponde ad alcun tipo di pre-adattamento.

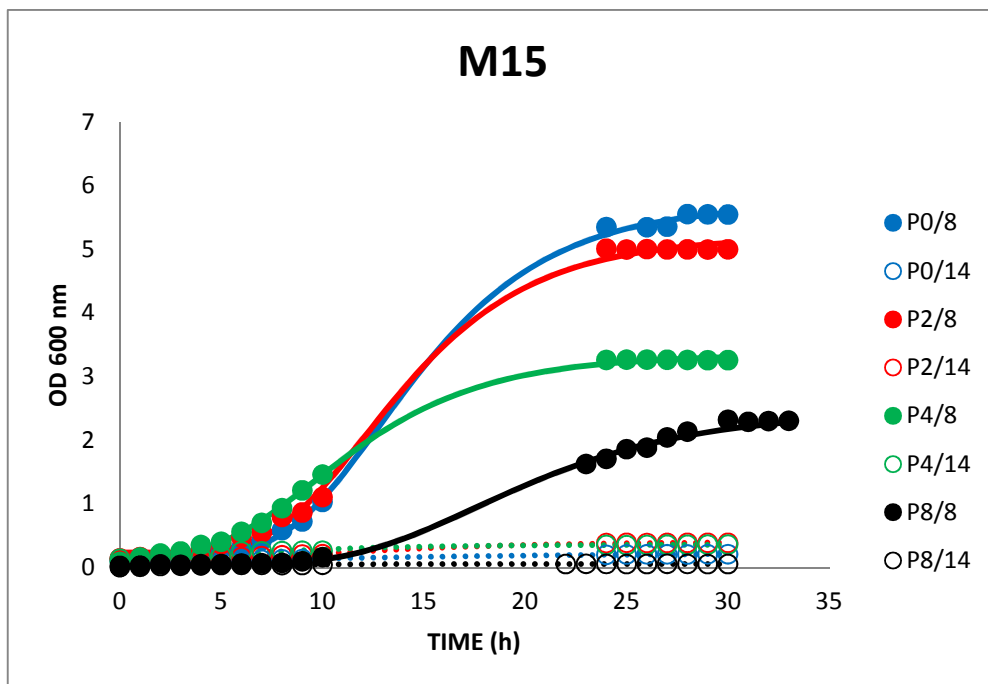


Figura 6.14. Curve di crescita di *Lb. plantarum* M15 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

Tabella 6.11. Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* M15 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	p0/8	p2/8	p4/8	p8/8	p0/14	p2/14	p4/14	p8/14
Lag (h)	8,2	7,5	4,8	11,5	2,0	5,7	0,9	0,0
μ_{max} (h ⁻¹)	0,44	0,40	0,25	0,15	0,01	0,02	0,02	0,01
yEnd (OD ₆₀₀)	5,7	5,2	3,4	2,5	0,2	0,4	0,4	0,1
R ²	0,999	0,998	0,999	0,994	0,995	0,998	0,976	0,911

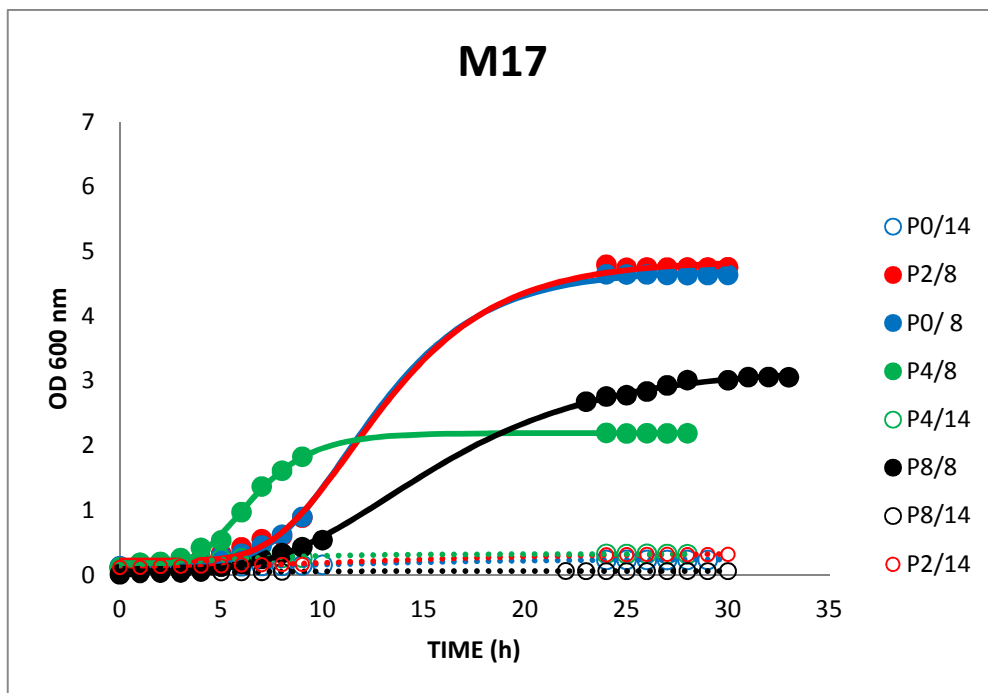


Figura 6.15. Curve di crescita di *Lb. plantarum* M17 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

Tabella 6.12. Parametri cinetici di crescita di *Lb. plantarum* M17 coltivato in MRS broth contenente etanolo all'8% (/8) o al 14% (/14), in seguito a pre-esposizione a 0% (p0), 2% (p2), 4% (p4) e 8% (p8) di etanolo.

PARAMETRI CINETICI	CONDIZIONI SPERIMENTALI							
	p0/8	p2/8	p4/8	p8/8	p0/14	p2/14	p4/14	p8/14
Lag	7,5	7,5	3,8	7,5	5,4	1,5	0,0	0,0
μ_{max}	0,45	0,45	0,37	0,20	0,01	0,01	0,02	0,01
yEnd	4,7	4,9	2,2	3,2	0,2	0,2	0,3	0,1
R ²	1,000	0,999	0,997	1,000	0,990	0,994	0,935	0,987

I dati relativi al ceppo M17 sono osservabili in figura 6.15 e in tabella 6.12. I risultati degli esperimenti mostrano che la fase lag in p0/8 e p2/8 coincidono così come i valori della velocità specifica di crescita e la carica microbica finale; non si riscontra inoltre sviluppo microbico ad una concentrazione di etanolo pari al 14%.

6.8 EFFETTO DELL'ETANOLO SULLA SOPRAVVIVENZA DI *LB. PLANTARUM*

Di seguito sono riportate le curve di sopravvivenza microbica al 14% di etanolo riguardanti i ceppi precedentemente coltivati in MRS broth (cellule non adattate) e in MRS broth addizionato di etanolo al 2% e all'8% (cellule adattate).

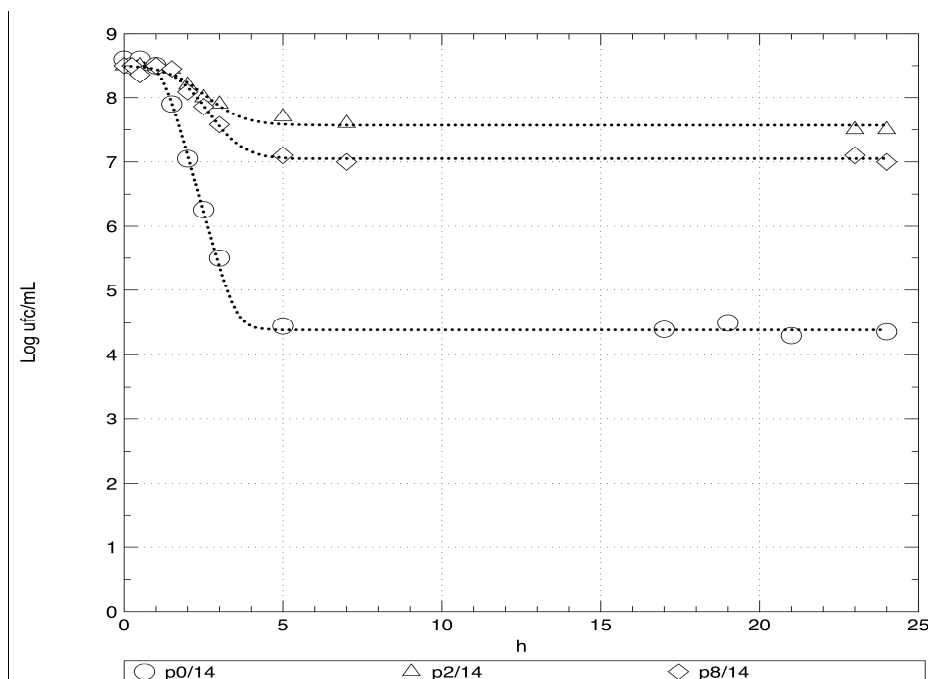


Figura 6.16. Curve di sopravvivenza di *Lb. plantarum* R1 in MRS contenente il 14% di etanolo modellate con GinaFit.I simboli rappresentano i dati sperimentali e le linee rappresentano il modello. p0/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione allo 0% di etanolo; p2/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione al 2% di etanolo; p8/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione all'8% di etanolo.

Tabella 6.13. Parametri cinetici di *Lb. plantarum* R1

Pre-esposizione	Modello	LOG10(N0)	LOG10(N_res)	SI (shoulder length)	kmax	4D	SSE	RMSE	R2_adj
p0/14	Log_lin+S+T	8,6	4,4	1,18	4,15	±3.84	0,039	0,075	0,998
	SE	0,0	0,0	0,07	0,26				
p8/14	Log_lin+S+T	8,5	7,0	1,90	2,19	>24	0,041	0,071	0,988
	SE	0,0	0,0	0,16	0,37				
p2/14	Log_lin+S+T	8,5	7,5	1,86	1,74	>24	0,040	0,067	0,974
	SE	0,0	0,0	0,23	0,43				

Il grafico relativo alle curve di sopravvivenza di *Lb. plantarum* R1 (figura 6.16), mostra un andamento descrivibile da un modello log-lineare con “spalla” e “coda” (Geeraerd et al., 2000).

La “spalla” rappresenta una forma di resistenza della popolazione micobica al fattore di stress.

In particolare nella prima fase di esposizione all'etanolo, i danni cellulari possono essere

considerati sub-letali in seguito si accumulano provocando la morte cellulare con una cinetica che dipende dal grado di pre-adattamento all'etanolo.

La “coda” rappresenta una forma di adattamento al trattamento, che può derivare da una selezione della popolazione iniziale delle cellule più resistenti, o dalla messa in atto di meccanismi cellulari che proteggono la cellula dal fattore di stress.

Si può notare dai parametri cinetici (tabella 6.13) che il ceppo presenta una prima fase di resistenza all'etanolo (SI) maggiore per le condizioni p8/14 e p2/14 rispetto alla condizione in assenza di pre-adattamento (p0/14). Un ulteriore dato degno di nota è la diminuzione della popolazione microbica dopo 24 ore che in assenza di una pre-esposizione (p0/14) passa da 8,6 log UFC/mL a 4,4 log UFC/mL, quindi con una riduzione di circa 4 cicli logaritmici e con una cinetica di morte (k_{max}) doppia rispetto a p8/14 e di circa 2.3 volte maggiore rispetto alla condizione p2/14. Al contrario, dopo una pre-esposizione all'8% , si osserva una riduzione della carica microbica di 1,5 cicli logaritmici, mentre in seguito a pre-adattamento al 2% di etanolo la riduzione risulta essere pari ad un solo ciclo logaritmico. Una significativa capacità di sopravvivenza delle cellule pre-esposte al 2% o all'8% di etanolo è evidenziabile anche dal parametro 4D, il quale è maggiore di 24h per le cellule pre-adattate, mentre risulta essere inferiore di almeno 6 volte per le cellule non pre-adattate (p0/14).

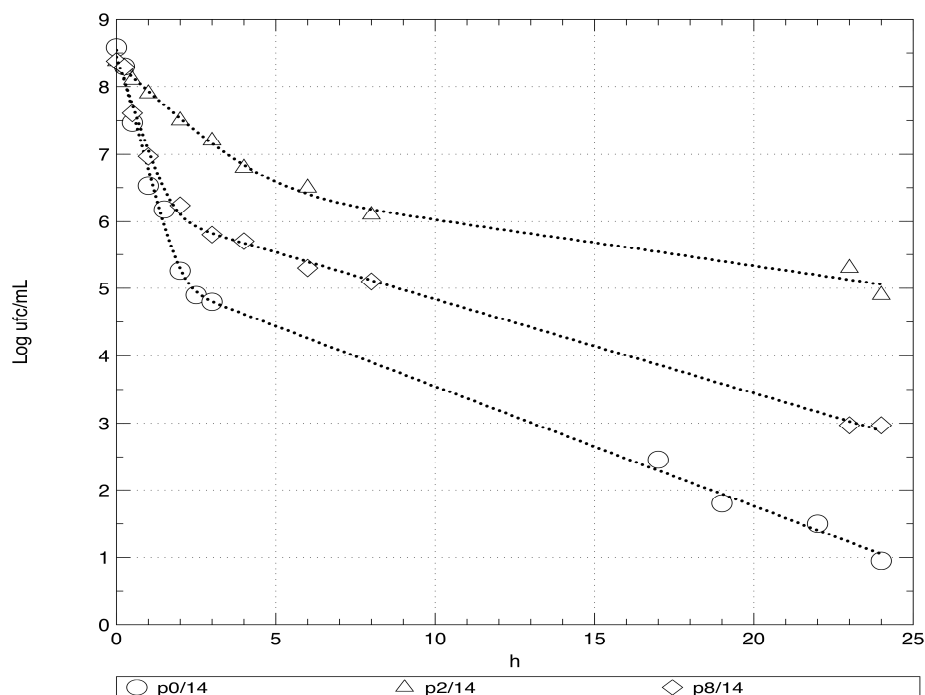


Figura 6.17. Curve di sopravvivenza di *Lb. plantarum* M28 in MRS contenente il 14% di etanolo modellate con GinaFit. I simboli rappresentano i dati sperimentali e le linee rappresentano il modello. p0/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione allo 0% di etanolo; p2/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione al 2% di etanolo; p8/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione all'8% di etanolo.

Tabella 6.14. Parametri cinetici di *Lb. plantarum* M28

Pre-esposizione	Modello	LOG10(N0)	kmax1	kmax2	4D	SSE	RMSE	R2_adj
p0/14	Bifasico	8,5	4,10	0,41	±4.56	0,265	0,182	0,995
	SE	0,1	0,34	0,02				
p8/14	Bifasico	8,4	3,29	0,32	±12.96	0,105	0,122	0,996
	SE	0,1	0,35	0,01				
p2/14	Bifasico	8,3	0,99	0,16	>24	0,095	0,107	0,992
	SE	0,1	0,10	0,02				

In figura 6.17 e in tabella 6.14 sono riportate le curve di sopravvivenza e i relativi parametri cinetici del ceppo *Lb. plantarum* M28.

Le tre curve di sopravvivenza sono rappresentabili da un modello bifasico in cui la popolazione microbica sottoposta al fattore di stress è divisa in due frazioni: una frazione iniziale più numerosa e una frazione finale meno numerosa. In seguito al trattamento, la prima frazione della popolazione, più suscettibile, muore (kmax1) con una velocità maggiore rispetto alla velocità (kmax2) della seconda frazione della popolazione.

Si evince dal grafico che una pre-esposizione al 2% (p2/14) consente una riduzione della velocità

di abbattimento di circa 2 volte rispetto alla pre-esposizione all'8% (p8/14). Tale dato è maggiormente significativo se confrontato con la condizione in assenza di pre-esposizione. Infatti la velocità di inattivazione (K_{max1}) in p0/14 risulta essere maggiore di circa 4 volte rispetto alla velocità rilevata nella condizione p2/14. Si nota inoltre che il valore 4D in p8/14 triplica rispetto a p0/14 mentre in p2/14 è maggiore di 24 ore.

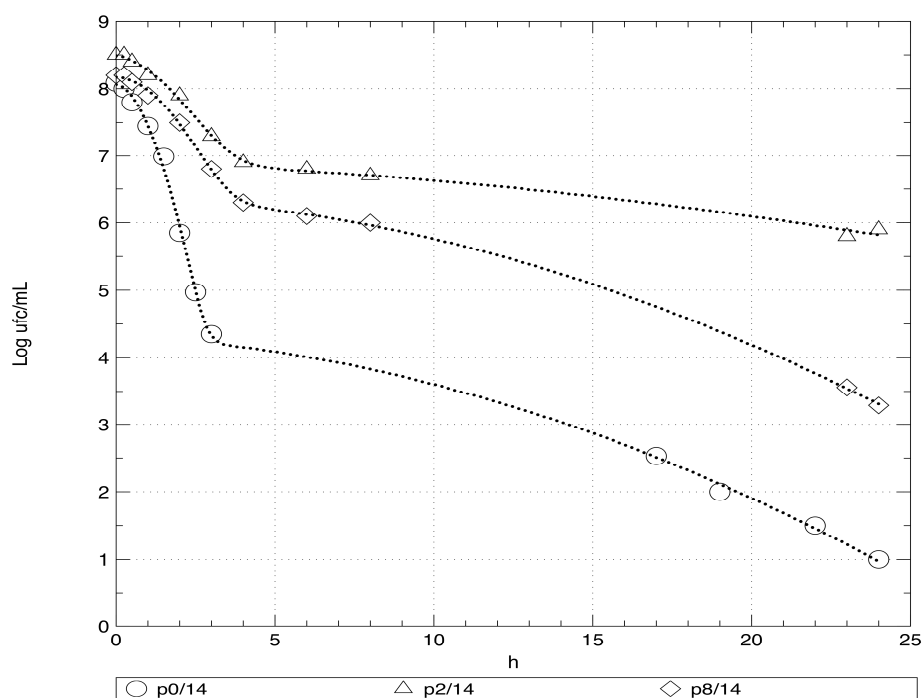


Figura 6.18. Curve di sopravvivenza di *Lb. plantarum* T13 in MRS contenente il 14% di etanolo modellate con GinaFit. I simboli rappresentano i dati sperimentali e le linee rappresentano il modello. p0/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione allo 0% di etanolo; p2/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione al 2% di etanolo; p8/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione all'8% di etanolo

Tabella 6.15. Parametri cinetici di *Lb. plantarum* T13

Pre-esposizione	Modello	LOG10(N0)	delta1	p	delta2	4D	SSE	RMSE	R2_adj
p0/14	Doppio_Weibull	8,1	1,3	1,8	12,4	±5.52	0,072	0,095	0,999
	SE	0,1	0,1	0,1	0,6				
p8/14	Doppio_Weibull	8,2	2,4	1,9	13,3	±20.16	0,013	0,043	0,999
	SE	0,0	0,1	0,1	0,6				
p2/14	Doppio_Weibull	8,5	2,5	1,7	23,3	>24	0,029	0,064	0,996
	SE	0,0	0,1	0,2	1,1				

Il grafico relativo alle curve di sopravvivenza del ceppo *Lb. plantarum* T13 sono rappresentate in figura 6.18 mentre i parametri cinetici sono riportati in tabella 6.15. Le curve seguono un andamento descrivibile dal modello doppio Weibull. Questo modello probabilistico descrive la distribuzione degli eventi letali all'interno di una popolazione microbica. Di conseguenza la curva di abbattimento può essere considerata come una forma cumulativa della distribuzione di resistenza delle cellule.

Si può osservare dal grafico che le curve sono divise in due sezioni, la prima parte rappresenta una prima frazione di popolazione, più sensibile al trattamento, mentre la parte finale della curva è rappresentata dalle cellule più resistenti al fattore di stress. Per quanto riguarda il tempo necessario affinché la prima porzione di popolazione diminuisca di un ciclo logaritmico (δ_1) possiamo notare come la pre-esposizione al 2% ($p_{2/14}$) aumenti di 2 volte tale valore rispetto a $p_{0/14}$. Ciò significa che questa condizione favorisce un adattamento cellulare tale da allungare i tempi di inattivazione microbica. Ciò viene evidenziato anche dal parametro δ_2 in cui il tempo di riduzione logaritmica della seconda porzione di popolazione raddoppia rispetto ad un'assenza di preesposizione. In etanolo 8% aumenta solo di 1 h. Per quanto riguarda il parametro $4D$ si evince che in $p_{2/14}$ è superiore a 24 ore mentre in assenza di pre-adattamento la riduzione $4D$ è pari a 6 ore circa.

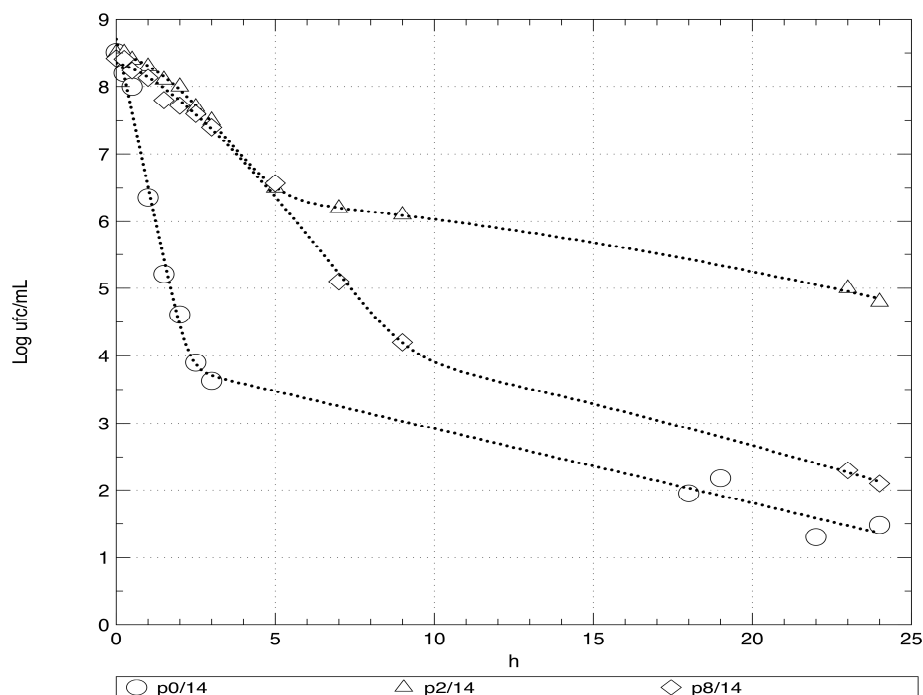


Figura 6.19. Curve di sopravvivenza di *Lb. plantarum* M17 in MRS contenente il 14% di etanolo modellate con GinaFit.I simboli rappresentano i dati sperimentali e le linee rappresentano il modello. p0/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione allo 0% di etanolo; p2/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione al 2% di etanolo; p8/14, sopravvivenza dopo pre-esposizione all'8% di etanolo

Tabella 6.16. Parametri cinetici di *Lb. planatrum* M17

Modello	alpha	delta1	p	LOG10(N0)	delta2	f	kmax1	kmax2	LOG10(N0) 4D	SSE	RMSE	R2_adj	
Bifasico						0,99998	5,0	0,3	8,7	±1.92	0,469	0,242	0,992
SE						0,00001	0,4	0,0	0,2				
Doppio_Weibull	3,8	3,0	1,4	8,4	12,8					±8.64	0,108	0,110	0,998
SE	0,4	0,2	0,1	0,1	1,5								
Doppio_Weibull	2,1	2,9	1,6	8,5					>24	0,013	0,038	0,999	
SE	0,0	0,1	0,1	0,0									

Le curve di sopravvivenza e i parametri cinetici del ceppo *Lb. plantarum* M17 sono riportate in figura 6.19 e in tabella 6.16. La curva di abbattimento in assenza di pre-esposizione è ascrivibile ad un modello bifasico, mentre le curve concernenti i preadattamenti al 2 e all'8% sono riferibili al modello doppio Weibull.

Dai risultati riportati in tabella, è possibile osservare che la sopravvivenza di *Lb. plantarum* M17 si caratterizza per il valore 4D di 8,6 ore in condizioni di preadattamento pari all'8%, circa 7 volte superiore al valore stimato per la sopravvivenza delle cellule non adattate. In presenza di

una pre-esposizione al 2% il 4D aumento fino a valori superari a 24 ore.

6.9 SDS-PAGE

Dai risultati conseguiti mediante l'analisi elettroforetica SDS-PAGE (figura 6.20) emerge che la presenza di etanolo determina per la totalità dei ceppi, una differente espressione proteica, rilevabile dalla diversità dei profili elettroforetici ottenuti per i ceppi coltivati in assenza (non adattati) e presenza di etanolo al 2% (adattati). In dettaglio, in tutti i ceppi coltivati in presenza di etanolo al 2%, è possibile osservare l'over espressione di una banda proteica dal peso molecolare di circa 62 KDa. Tale banda possiede un volume compreso tra 1,2 e 1,4 OD*mm² nei campioni non adattati, volume che nei campioni adattati è aumentato di 1,6 volte in *Lb. plantarum* M17 (profilo M17EtOH) e 2,9 volte in *Lb. plantarum* T13 (profilo T13EtOH). Inoltre, per i ceppi *Lb. plantarum* T13 e *Lb. plantarum* R1 è possibile apprezzare l'over espressione di ulteriori due bande proteiche dal peso molecolare di 34,2 e 26,8 KDa quando i ceppi sono coltivati in presenza di etanolo. La banda caratterizzata dal peso molecolare di 34,2 Kda è espressa 2,3 volte in più in *Lb. plantarum* T13 coltivato in presenza di etanolo (profilo T13EtOH) rispetto al medesimo ceppo coltivato in assenza di etanolo (profilo T13). Un dato simile è osservabile in *Lb. plantarum* R1, in quanto, tale banda è espressa 1,8 volte in più nel ceppo coltivato in presenza di etanolo (profilo R1EtOH) rispetto al ceppo coltivato in assenza di etanolo (profilo R1). Analogamente, la banda contraddistinta dal peso molecolare di 26,8 KDa possiede un volume 2,7 volte superiore nel profilo T13EtOH rispetto al profilo T13 e 4,2 volte superiore nel profilo R1EtOH rispetto al profilo R1.

Di particolare interesse sono i dati relativi alla neoformazione di una banda proteica di 17,0 Kda rilevabile solo quando *Lb. plantarum* T13 è coltivato in presenza di etanolo (profilo T13EtOH) e di due bande di neoformazione di 16,7 e 17,3 Kda evidenziabili solo in *Lb. plantarum* R1 coltivato in presenza di etanolo (profilo R1EtOH).

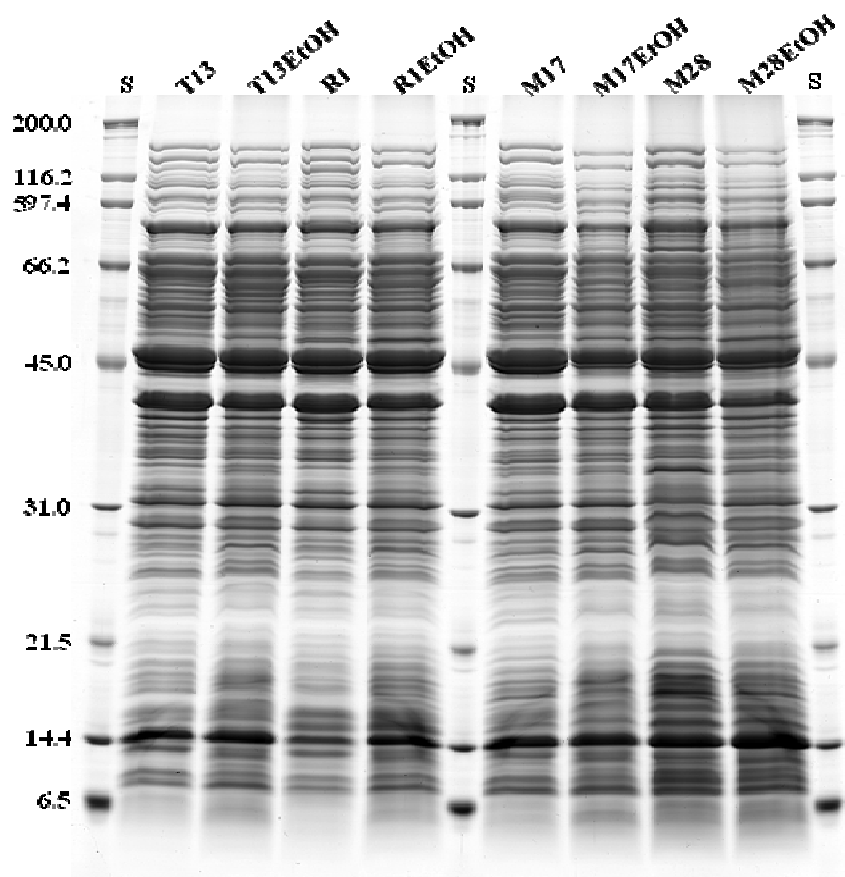


Figura 6.20 Profili elettroforetici delle proteine totali dei ceppi appartenenti a *Lb. plantarum* coltivati in assenza di etanolo (T13, M17, M28, R1) e in presenza di etanolo (T13EtOH, M17EtOH, M28EtOH, R1EtOH).

KDa	T13EtOH	R1EtOH	M17EtOH	M28EtOH
62,0	2,9	2,6	1,6	2,2
34,2	2,3	1,8	-	-
26,8	2,7	4,2	-	-
17,3	-	neo-sintesi	-	-
17,0	neo-sintesi	-	-	-
16,7	-	neo-sintesi	-	-

Tabella 6.17. Bande proteiche over espresse o di neo sintesi. dei ceppi appartenenti a *Lb. plantarum* coltivati in assenza di etanolo (T13, M17, M28, R1) e in presenza di etanolo (T13EtOH, M17EtOH, M28EtOH, R1EtOH).

Un ulteriore risultato degno di nota riguarda la riduzione dell'espressione di diverse bande proteiche nei ceppi adattati. In particolare, ad eccezione di *Lb. plantarum* R1 in EtOH, tutti i ceppi si contraddistinguono per la riduzione dell'espressione di una banda dal peso molecolare di circa 54,5 KDa. Nel profilo appartenente al ceppo *Lb. plantarum* T13 adattato in etanolo (profilo T13EtOH), è possibile apprezzare una diminuzione del volume della banda proteica di circa 3,3 volte rispetto al volume della banda rilevato nel ceppo non adattato (profilo T13). L'espressione di tale banda risulta essere ridotta 2,9 e 1,9 volte rispettivamente in *Lb. plantarum* M17 (profilo M17EtOH) e in *Lb. plantarum* M28 (profilo M28EtOH) quando i ceppi sono coltivati in presenza di etanolo.

Inoltre, una banda proteica dal peso molecolare di 51,8 KDa è espressa solo nei ceppi non coltivati in presenza etanolo (profili T13, M17, R1 e M17) mentre risulta completamente assente nei ceppi adattati (profili T13EtOH, M17EtOH, R1EtOH e M28EtOH).

Interessante è anche la variabilità con la quale una banda proteica dal peso molecolare di 127 KDa risulta espressa tra i vari ceppi e tra le diverse condizioni. In particolare, tale banda, non rilevabile nel ceppo *Lb. plantarum* M17 (profili M17 e M17EtOH) è espressa 15 volte in meno in *Lb. plantarum* R1 adattato (profilo R1EtOH) rispetto allo stesso ceppo non adattato (profilo R1). La medesima banda risulta espressa 3 volte in meno in *Lb. plantarum* T13 coltivato in presenza di etanolo (profilo T13EtOH) rispetto allo stesso ceppo non adattato (profilo T13) mentre non si apprezzano variazioni significative nel ceppo *Lb. plantarum* M28 coltivato in presenza di etanolo (profilo M28EtOH) e in assenza di etanolo (profilo M28).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lactobacillus plantarum è una specie microbica che negli ultimi anni ha suscitato notevole attenzione nel settore enologico. E' noto che tale microrganismo rappresenta, dopo *Oenococcus oeni*, la specie maggiormente presente nei vini (Beneduce et al., 2004, Testa et al., 2014) e spesso può rappresentare il principale protagonista della fermentazione malolattica. Evidenze che sono ulteriormente rafforzate e confermate dai risultati ottenuti dalle preliminari azioni della presente tesi di dottorato tese all'isolamento e all'identificazione di batteri lattici da vini a fermentazione spontanea. Infatti, come dettagliato nel precedente capitolo, dei 184 isolati di batteri lattici, 58 ceppi (35%) sono stati identificati come *Lb. plantarum* e 22 ceppi (12%) come *Lb. brevis*. Dati che sottolineano l'elevata capacità di adattamento da parte dei ceppi di *Lb. plantarum* ai bassi valori di pH (2,8-3,8), ad elevate concentrazioni di etanolo(11-15%) nonché alla presenza di SO₂ e a composti fenolici (Du Plessis et al., 2004; G-Alegria et al., 2004; Lopez et al., 2008; Mugnaio et al., 2011). Capacità, quella dell'adattamento a condizioni ambientali estreme, che è evidenziata anche dall'analisi della comunità dei lattobacilli riscontrata nelle differenti tipologie di vini oggetto di analisi. In dettaglio, i vini caratterizzati da livelli di etanolo più bassi e/o pH relativamente più alti sono contraddistinti dalla presenza di lattobacilli riferibili alla specie *Lb. brevis* accanto a *Lb. plantarum*; mentre i vini caratterizzati da concentrazioni più elevate di alcol, quali Tintilia e Taurasi, evidenziano la presenza di ceppi di lattobacilli riferibili alla sola specie di *Lb. plantarum*.

Degna di attenzione e, per taluni aspetti sorprendente, è il quadro che emerge dall'analisi del biotipo. I dodici differenti *cluster*, apprezzabili attraverso l'analisi dei profili RAPD-PCR, evidenziano l'elevata biodiversità caratterizzante i ceppi riferibili alla medesima specie di *Lb. plantarum*. Riscontro, quest'ultimo, che risulta in linea con quanto già osservato da altri Autori in merito a ceppi di lattobacilli isolati da differenti matrici alimentari (Reale et al., 2011; Zago et

al., 2015). Inatteso è il dato relativo alla forte relazione tra i diversi cluster ottenuti e la tipologia di vino dalla quale sono stati isolati i ceppi. Sulla base di quest'ultima constatazione appare lecito ipotizzare che la selezione di eventuali lattobacilli per il governo della fermentazione malo-lattica debba essere eseguita tenendo conto della tipologia, dell'origine e dell'area geografica di provenienza dei vini. Auspicio che negli ultimi anni sembra essere sostenuto anche da altri autori impegnati nella selezione di colture starter da impiegare nella disacidificazione biologica dei vini (Nisiotou et al., 2015; Berbegal et al., 2016)

La diversità di *Lb. plantarum* in funzione della tipologia di vino costituisce una fonte di ulteriori ed interessanti sviluppi. Essa, infatti può essere assunta come nota o *signum* di autenticità per i vini a forte connotazione territoriale. Risposta che apporterebbe uno straordinario avanzamento agli indirizzi di ricerca intenti nell'individuazione di marcatori in grado di proteggere i vini da pratiche di adulterazione (Kokkinofa et al., 2014).

Ceppo-dipendente è anche il carattere che emerge dall'analisi statistica (*cluster analysis*) dei dati relativi alla sopravvivenza dei ceppi oggetto di studio in presenza delle principali condizioni di stress riscontrabili nel vino. Occorre evidenziare, tuttavia, che tale diversità, a differenza di quanto emerso dai profili RAPD-PCR, non è correlabile alla fonte di isolamento.

In dettaglio, è stata apprezzata una buona resistenza e una bassa variabilità di risposta alle varie concentrazioni di etanolo (10% e 14%) e al pH 3.5, mentre una maggiore suscettibilità e una elevata variabilità è apprezzabile in presenza di SO₂ e pH 2.5. L'analisi gerarchica dei cluster ha consentito di elaborare e confrontare il comportamento di 60 ceppi in 6 differenti condizioni (360 input) restituendo una *heat-map* in grado di evidenziare in maniera chiara il comportamento dei ceppi. Dunque, l'approccio adottato può essere considerato un valido strumento al fine di individuare ceppi di interesse tecnologico o meritevoli di ulteriori indagini previste dal disegno sperimentale della tesi di dottorato, quali la crescita all'8% e al 14% di etanolo in seguito a pre-esposizione a basse concentrazioni di alcol etilico (2%, 4% e 8%).

Dall'analisi dei dati derivanti dalle innanzi citate valutazioni emerge, anche in linea con altri studi di recente pubblicazione (Berbegal et al. 2016; Sun et al. 2016), che sia la concentrazione di etanolo sia il grado di pre-esposizione all'alcol rappresentano fattori che possono influenzare in maniera significativa la crescita microbica. Di particolare interesse, è stato il risultato del pre-adattamento al 2% di etanolo, infatti, una pre-esposizione dei ceppi a tale concentrazione e la successiva crescita in 8% di alcol (p2/8) induce un adattamento della cellula microbica al fattore di stress riconducibile ad un aumento, in alcuni casi, della velocità specifica di crescita (μ_{max}), e in particolare per i ceppi T13 ed R1. Inoltre in seguito a pre-esposizione al 2% di etanolo (p2/8) è possibile assistere anche ad un incremento della carica microbica finale (y_{End}). Al contrario, la pre-esposizione alle altre concentrazioni di etanolo (p4/8, p8/8) non consente un pre-adattamento bensì causa un danno sub-letale responsabile di un significativo decremento della velocità specifica di crescita per la totalità dei ceppi saggiati.

Per quanto riguarda lo studio della capacità di crescita in presenza del 14% di etanolo, è stato possibile apprezzare una completa inibizione sia in assenza sia in presenza di pre-adattamento. Infatti, come atteso e ampiamente dimostrato anche in altri studi, molte specie microbiche non sono in grado di crescere in ambienti contenenti una concentrazione di etanolo superiore al 10%. (Bravo-Ferrada et al., 2013).

Meritevole di attenzione è stato il risultato riguardante lo studio dell'effetto del pre-adattamento sulla sopravvivenza dei ceppi M17, M28, R1 e T13 coltivati in 14% di etanolo. I risultati evidenziano che in seguito ad una fase di pre-adattamento ad una concentrazione sub-letale di alcol (2% - 8%), tutti i ceppi acquisiscono una capacità di sopravvivenza di almeno 4 volte in più rispetto ai ceppi non adattati. La capacità di adattamento di *Lb. plantarum*, in seguito ad una breve e lunga esposizione all'8% di etanolo, è stato recentemente illustrato da van Bokhorst-van de Veen et al., (2011). Analogamente a quanto evidenziato attraverso lo studio delle cinetiche di crescita, emerge che i ceppi di *Lb. plantarum* possiedono una diversa specificità di

sopravvivenza all'etanolo. Infatti, *Lb. plantarum* M17 risulta essere il ceppo maggiormente sensibile ad un'esposizione al 14% di etanolo sia in assenza sia in presenza di una pre-esposizione al 2 e all'8% di alcol etilico. Al contrario, *Lb. plantarum* R1 è il ceppo più resistente in quanto in seguito al pre-adattamento al 2% o all'8% di etanolo presenta valori 4D superiori a 24 ore. Inoltre dopo un'esposizione al 14% di alcol, previa adattamento al 2%, tale ceppo mantiene una carica microbica pari a 7.5 log UFC/mL. Questo dato è di particolare interesse se si considera che la concentrazione microbica minima necessaria per innescare la fermentazione malo lattica è pari a 10^6 UFC/mL. (Berbegal et al., 2015)

Dai risultati inoltre si desume che la pre-esposizione al 2% di etanolo consente, per tutti i ceppi oggetto di studio, una migliore sopravvivenza permettendo un adattamento della cellula con conseguente riduzione della velocità di inattivazione microbica. Risultati che, per taluni aspetti, risultano in linea con quanto riportato da altri Autori (Cecconi et al., 2009; Solieri et al., 2009; Lerm et al., 2010) che evidenziavano un aumento della resistenza all'alcol da parte dei ceppi di batteri lattici dopo adattamento a basse concentrazioni di etanolo e a bassi valori di pH.

Ulteriore dato degno di attenzione è la forma delle curve di sopravvivenza modellate mediante l'add-in di Excel GInaFit (Geeraerd et al., 2005). Infatti i risultati evidenziano che la dinamica della sopravvivenza varia in funzione del ceppo e del grado di pre-esposizione. In tutti i casi la dinamica di inattivazione è rappresentabile attraverso modelli non-lineari caratterizzati da un andamento bifasico, log-lineare con spalla e coda o raffigurabile attraverso il modello noto come doppio Weibull. I modelli non-lineari, noti anche come "nonthermal inactivation model" nonché la presenza di una elevata eterogeneità all'interno di una singola specie, sono stati ampiamente indagati in altre specie microbiche in seguito all'esposizione a differenti fattori di stress. Da tali studi è stato riscontrato che un ceppo batterico può dare luogo a curve di sopravvivenza di forme differenti in funzione al tipo di stress, all'intensità del fattore di stress, allo stato fisiologico della cellula, nonché alla condizione di adattamento al fattore avverso (Coroller et al.,

2006). L'adattamento dei ceppi di *Lb. plantarum* in condizioni di stress alcolico richiede specifici cambiamenti dei meccanismi molecolari. I risultati evidenziano che in seguito alla pre-esposizione al 2% di etanolo tutti i ceppi mostrano dei profili proteici differenti da quelli relativi ai ceppi non adattati. Tali dati, anche se del tutto preliminari ma sicuramente degni di attenzione, evidenziano il coinvolgimento di alcune proteine che potrebbero avere un ruolo centrale nella resistenza allo stress alcolico in *Lb. plantarum*. Ad esempio la banda proteica dal peso molecolare di circa 62 KDa, over espressa in tutti i ceppi adattati, potrebbe essere ascrivibile al chaperone molecolare GroEL. Tale proteina ben nota nella risposta allo stress acido e termico (De Angelis e Gobbetti, 2011), è coinvolta anche nei meccanismi di risposta allo stress da alcol etilico (van Bokhorst-van de Veen et al., 2011). Anche la banda dal peso molecolare di circa 34,2 KDa, over espressa nei ceppi *Lb. plantarum* T13 e R1 adattati in etanolo, potrebbe essere ascrivibile ad un'altra chaperonina nota come Heat shock protein 33 (Hsp33). La chaperonina Hsp33 è una proteina regolata dallo stato redox della cellula, è inattiva in ambiente ridotto e attiva in ambiente ossidato (Jakob et al., 1999). E' noto che l'etanolo altera lo stato redox della cellula provocando sia il decremento della sintesi di proteine (es. inosina-5'-monofosfato deidrogenasi e fosfogluconato deidrogenasi) che generano composti ridotti (NADH e NADPH) sia l'incremento della sintesi di glutatione reduttasi (GR), il quale è una ossidoreduttasi che consuma NADPH (da Silveira et al., 2004). In *O. oeni* la glutatione reduttasi è indotta circa tre volte durante lo stress da etanolo. Il suo ruolo è mantenere costante il potere riducente delle proteine e altre molecole non proteiche dalla reazione dell'acetaldeide (prodotta dall'ossidazione dell'etanolo) con i gruppi tiolici delle molecole d'interesse biologico, quali la cisteina e il GSH (Jones, 1989).

Inoltre dai risultati si evince che altre bande proteiche di neo-sintesi o diversamente espresse sono presenti nei profili proteici. Ciò suggerisce che diversi meccanismi cellulari possono essere coinvolti nella resistenza allo stress da etanolo. Recentemente è stato dimostrato che *Lb.*

plantarum è in grado di modulare l'espressione di 57 geni dopo 10 minuti dall'inoculo in MRS contenente l'8% di etanolo e ben 916 geni già dopo 30 minuti di esposizione (van Bokhorst-van de Veen et al., 2011).

Dunque dagli ultimi risultati oggetto di analisi e discussione si evince che una pre-esposizione al 2% di etanolo consente una migliore crescita dei ceppi e induce un adattamento della cellula con conseguente miglioramento della sopravvivenza microbica e una riduzione nella velocità di inattivazione cellulare. Tale comportamento è sicuramente attribuibile alla riorganizzazione del corredo proteico che comporta la neo-sintesi o l'over-espressione di proteine già prodotte o la repressione di proteine che sono normalmente sintetizzate dalla cellula. Inoltre la risposta adattiva, caratterizzata sia da meccanismi generici sia da meccanismi ceppo specifici, promuove l'insorgenza di una maggiore resistenza ad una concentrazione alcolica elevata (14%). Pertanto nei processi di individuazione di ceppi microbici da impiegare nel processo di vinificazione appare fondamentale la comprensione del comportamento di *Lb. plantarum* in presenza di un fattore di stress quale l'etanolo nonché comprendere i meccanismi che sono alla base dell'adattamento.

I risultati ottenuti attraverso la presente tesi di dottorato, nel loro insieme, hanno consentito di delineare taluni criteri da adottare nell'individuazione e nella selezione di colture di lattobacilli di interesse enologico nonché di acquisire nuove conoscenze tali da permettere una corretta progettazione delle modalità di impiego di *Lb. plantarum* nei processi di disacidificazione biologica.

BIBLIOGRAFIA

Ahrné S, Nobaek S, Jeppsson B, Adlerberth I, Wold AE, Molin G (1998). The normal *Lactobacillus* flora of healthy human rectal and oral mucosa. *J Appl Microbiol* 85:88-94.

Alegria EG, López I, Ruiz JI, Saenz J, Fernández E, Zarazaga M, Dizy M, Torres C, Ruiz-Larrea F (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *FEMS Microbiology Letters* 230:53-61.

Alzamora SM, Tapia MS, Welti-Chanes J (2003). The control of water activity. In: Zeuthen P, Bøgh Sørensen L (eds) Food preservation techniques. CRC Press, Boca Raton.

Ammor MS, Mayo B (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: an update. *Meat Science* 76, *Appl Environ Microbiol* 65.:3418–3426.

Archibald FS, Fridovich I (1981). Manganese, superoxide dismutase, and oxygen tolerance in some lactic acid bacteria. *J Bacteriol* 146:928-936.

Bâati L, Fabre-Gea C, Auriol D, Blanc PJ (2000). Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. *Int J Food Microbiol* 59:241-247.

Baranyi J, Roberts TA (1994). An approach to predicting bacterial growth in food. *Int J. Food Microbiol* 23: 277-294.

Barbagallo RN, Spagna G, Palmieri R, Torriani S (2004). Assessment of β -glucosidase activity in selected wild strains of *Oenococcus oeni* for malolactic fermentation. *Enzyme Microb Tech* 34:292-296.

Bass S, Gu Q, Christen A (1996). Multicopy suppressors of *prc* mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated R1pA. *J Bacteriol* 178:1154-1161.

Bender GR, Marquis RE (1987). Membrane ATPases and acid tolerance of *Actinomyces viscosus* and *Lactobacillus casei*. *Appl Environ Microbiol* 53:2124-2128.

Beneduce L, Spano G, Vernile A, Tarantino D, Massa S (2004). Molecular characterization of lactic acid populations associated with wine spoilage. *J Basic Microbiol* 44:10-16. *Biol Chem* 271:10060-10065.

Berbegal C, Benevent-Gil Y, Pardo I, Ferrer S (2015). A novel culture medium for *Oenococcus oeni* malolactic starter production. *Food Science and Technology* 64:24-31.

Berbegal C, Peña N, Russo P, Grieco F, Pardo I, Ferrer S, Spano G, Capozzi V (2016). Technological properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from grape must fermentation. *Food Microbiology* 57:187-194.

- Bolotin A, Wincker P, Mauger S, Jaillon O, Malarne K, Weissenbach J, Ehrlich SD, Sorokin A (2001). The complete genome sequence of the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403. *Genome Res* 11:731-753.
- Bou M, Krieger S (2004). Alcohol-tolerant malolactic strains for the maturation of wines with average or high pH (2004 - Pub. N°: WO / 2004 / 111179).
- Bourdineaud JP, Nehmé B, Tesse S, Lonvaud-Funel A (2003). The *ftsH* gene of the wine bacterium *Oenococcus oeni* is involved in protection against environmental stress. *Appl Environ Microbiol* 69:2512-2520.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*.72:248-254.
- Bravo-Ferrada BM, Hollmann A, Delfederico L, Valdés La Hens D, Caballero A, Semorile L (2013). Patagonian red wines: selection of *Lactobacillus plantarum* isolates as potential starter cultures for malolactic fermentation. *World J Microbiol Biotechnol* 29:1537-1549.
- Bravo-Ferrada BM, Tymczyszyn EE, Gomez-Zavaglia A, Semorile L (2014). Effect of acclimation medium on cell viability, membrane integrity and ability to consume malic acid in synthetic wine by oenological *Lactobacillus plantarum* strains. *J Appl Microbiol* 116:360-367.
- Bringel F, Castioni A, Olukoya DK, Felis GE, Torriani S, Dellaglio F (2005). *Lactobacillus plantarum* subsp. *argentoratensis* subsp. nov., isolated from vegetable matrices. *Int J Syst Evol Microbiol* 55(4):1629-34.
- Brits TJ, Tracey RP (1990). The combination effect of pH, SO₂, ethanol and temperature on the growth of *Leuconostoc oenos*. *J Appl Bacteriol* 68:23-31.
- Bruno-Bárcena JM, Azcárate-Peril MA, Hassan HM (2010). Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids. *Appl Environ Microbiol* 76:2747-2753.
- Buchanan R, Whiting R, Damert W (1997). When is simple good enough: a comparison of the gompertz, baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food Microbiol* 14:313 -326.
- Bukau B, Horwich AL (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366.
- Buttke TM, Ingram LO (1978). Mechanism of ethanol-induced changes in lipid composition of *Escherichia coli*: inhibition of saturated fatty acid synthesis in vivo. *Biochemistry* 17:637-644.
- Buttke TM, Ingram LO (1980). Ethanol-induced changes in lipid composition of *Escherichia coli*: inhibition of saturated fatty acid synthesis in vitro. *Arch Biochem Biophys* 203:565-571.
- Carreté R, Reguant C, Bordons A, Constantí M (2005). Relationship between a stress membrane protein of *Oenococcus oeni* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *Appl Biochem Biotechnol* 127:43-51.

Carreté R, Vidal MT, Bordons A, Constantí M (2002). Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of *Oenococcus oeni*. *FEMS Microbiol Lett* 211:155-159.

Catzeddu P, Mura E, Parente E, Sanna M, Farris GA (2006). Molecular characterization of lactic acid bacteria from sourdough breads produced in Sardinia (Italy) and multivariate statistical analyses of results. *Systematic and Applied Microbiology* 29:138-144.

Cecconi D, Milli A, Rinalducci S, Zolla L, Zapparoli G (2009). Proteomic analysis of *Oenococcus oeni* freeze-dried culture to assess the importance of cell acclimation to conduct malolactic fermentation in wine. *Electrophoresis* 30:2988-2995.

Chamkha M, Sayadi S, Bru V, Godon JJ (2008). Microbial diversity in Tunisian olive fermentation brine as evaluated by small subunit rRNA - single strand conformation polymorphism analysis. *Int J Food Microbiol* 122:211-215.

Christensen J, Dudley E, Pederson J, Steele J (1999). Peptidases and Amino Acid Catabolism in Lactic Acid Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76:217-46.

Chu-Ky S, Tourdot-Marechal R, Marechal PA, Guzzo J (2005). Combined cold, acid, ethanol shocks in *Oenococcus oeni*: effects on membrane fluidity and cell viability. *Biochim Biophys Acta* 1717:118-124.

Cohen DPA, Renes J, Bouwman FG, Zoetendal EG, Mariman E, de Vos WM, Vaughan EE (2006). Proteomic analysis of log to stationary growth phase *Lactobacillus plantarum* cells and a 2-DE database. *Proteomics* 6:6485-6493.

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

Coroller L, Leguerinel I, Mettler E, Savy N, Mafart P (2006). General Model, Based on Two Mixed Weibull Distributions of Bacterial Resistance, for Describing Various Shapes of Inactivation Curves. *Appl. Environ Microbiol* 72:6493-6502.

Corsetti A, Perpetuini G, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G (2012). Application of starter cultures to table olive fermentation: an overview on the experimental studies. *Front Microbiol* 3:248

Costantini A, Rantsiou K, Majumder A, Jacobsen S, Pessione E, Svensson B, Garcia-Moruno E, Cocolin L (2015). Complementing DIGE proteomics and DNA subarray analyses to shed light on *Oenococcus oeni* adaptation to ethanol in wine-simulated conditions. *Int J of Proteomics* 123:114-127.

Cotter PD, Hill C (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol Mol Biol Rev* 67:429-453.

Da Silveira MG, Golovina EA, Hoekstra FA, Rombouts FM, Abee T (2003). Membrane fluidity adjustments in ethanol-stressed *Oenococcus oeni* cells. *Appl Environ Microbiol* 69:5826-5832.

Dal Bello F, Clarke CI, Ryan LAM, Ulmer H, Schober TJ, Strom K, Sjogren J, Van Sinderen D, Schnurer J, Arendt EK (2007). Improvement of the quality and shelf - life of wheat bread by

fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J Cereal Sci* 45: 309-318.

De Angelis M, Bini L, Pallini V, Coconcelli PS, Gobbetti M (2001). The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiology* 147:1863-1873.

De Smet I, Van Hoorde L, Vande Woestyne M, Christiaens H, Verstraete W (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J Appl Bacteriol* 79:292-301.

De Vries MC, Vaughan EE, Kleerebezem M, De Vos WM (2006). *Lactobacillus plantarum* – survival, functional and potential probiotic properties in the human intestinal tract. *Int Dairy J* 16:1018-1028.

Derré I, Rapoport G, Msadek T (1999). CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls clp and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 31:117-131.

Derzelle S, Hallet B, Ferain T, Delcour J, Hols P (2002). Cold shock induction of the cspL gene in *Lactobacillus plantarum* involves transcriptional regulation. *J Bacteriol* 184:5518-5523.

Derzelle S, Hallet B, Francis KP, Ferain T, Delcour J, Hols P (2000). Changes in cspL, cspP, and cspC mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 182:5105-5113.

Diels AM, Michiels CW (2006). High-pressure homogenization as a non-thermal technique for the inactivation of microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 32(4):201-216.

Direttiva 2006/52/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 5 luglio 2006 che modifica la direttiva 95/2/CE relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti e la direttiva 94/35/CE sugli edulcoranti destinati ad essere utilizzati nei prodotti alimentari.

Direttiva 95/2/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 20 febbraio 1995 relativa agli additivi alimentari diversi dai coloranti e dagli edulcoranti.

Dombek KM, Ingram LO (1984). Effects of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *J Bacteriol* 157:233-239.

Du Toit M, Engelbrecht L, Lerm E, Krieger-Weber S (2011). *Lactobacillus*: the next generation of malolactic fermentation starter cultures. *Food Bioprocess Technol* 4:876–906

Foster JW, Hall HK (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 173:5129-5135.

Fridovich I. (1999). Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 893:13-18.

Fumi MD, Krieger-Weber S, Déléris-Bou M, Silva A, du Toit M (2010). A new generation of malolactic starter cultures for high pH wines. WB3 microorganisms-malolactic fermentation Proceedings International IVIF Congress 2010

- G-Alegría E, López I, Ruiz JI, Sáenz J, Fernández E, Zarazaga M, Dizy M, Torres C, Ruiz-Larrea F (2004). High tolerance of wild *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains to lyophilisation and stress environmental conditions of acid pH and ethanol. *Microbiol Lett* 230:53-61.
- Gerez CL, Carbajo MS, Rollan G, Torres L, de Valdez GF (2010). Inhibition of citrus fungal pathogens by using Lactic acid bacteria. *J Food Sci* 75: 354-359.
- GerezCL, Torino MI, Obregozo MD, de Valdez GF (2010). A ready-to-use antifungal starter culture improves the shelf life of packaged bread. *J Food Prot* 73: 758-762.
- Glaasker E, Konings WN, Poolman B (1996a). Glycine betaine fluxes in *Lactobacillus plantarum* during osmotic stress and hyper- and hypo-osmotic shock. *J Biol Chem* 271(17):10060-5
- Glaasker E, Konings WN, Poolman B (1996b). Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 178:575-582.
- Gobbetti M (1998) The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in Food Science & Technology* 9(7):267-274
- Gómez-Ruiz JA, Cabezas L, Martínez-Castro I, González-Viñas MA, Poveda JM (2008). Influence of a defined-strain starter and *Lactobacillus plantarum* as adjunct culture on volatile compounds and sensory characteristics of Manchego cheese. *Eur Food res Technol* 227:18–190.
- González-Arenzana L, López R, Santamaría P, Tenorio C, López-Alfaro I (2012). Dynamics of indigenous lactic acid bacteria populations in wine fermentations from La Rioja (Spain) during three vintages. *Environ Microbiol* 63:12–19.
- Graumann PL, Marahiel MA (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* 23:286-290.
- Guzzo J, Delmas F, Pierre F, Jobin MP, Samyn B, Van Beeumen J, Cavin JF, Diviès C (1997). A small heat shock protein from *Leuconostoc oenos* induced by multiple stresses and during stationary growth phase. *Lett Appl Microbiol* 24:393- 396.
- Guzzo J, Jobin MP, Delmas F, Fortier LC, Garmyn D, Tourdot-Maréchal R, Lee B, Diviès C (2000). Regulation of stress response in *Oenococcus oeni* as a function of environmental changes and growth phase. *Int J Food Microbiol* 55:27-31.
- Hecker M, Schumann W, Völker U (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:417-428.
- Hendrick JP, Hartl FU (1993). Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62:349-384.
- Hertel C, Schmidt G, Fischer M, Oellers K, Hammes WP (1998). Oxygen-dependent regulation of the expression of the catalase gene *katA* of *Lactobacillus sakei* LTH677. *Appl Environ Microbiol* 64(4):1359-65.

http://ac.els-cdn.com/S0740002015300964/1-s2.0-S0740002015300964-main.pdf?_tid=adcaeda2-f75e-11e5-9552-00000aacb35f&acdnat=1459442352_d6855d1f3ea30d6b11782aff5efc5641

http://ac.els-cdn.com/S0740002015002464/1-s2.0-S0740002015002464-main.pdf?_tid=c40159d8-f760-11e5-956b-00000aab0f01&acdnat=1459443248_9f7266c30fd16e1efa951e3b9ada6114

Ingmer H, Vogensen FK, Hammer K, Kilstrup M (1999). Disruption and analysis of the *clpB*, *clpC*, and *clpE* genes in *Lactococcus lactis*: ClpE, a new Clp family in gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 181:2075-2083.

Ingram LO. (1976). Adaptation of membrane lipids to alcohols. *J Bacteriol* 125:670-678.

Ingram LO (1990). Ethanol tolerance in bacteria. *Crit Rev Biotechnol* 9:305-319.

International Commission on Microbiological Specification of Foods (ICMSF) (1980). Microbial ecology of foods, Volume 1, Factors affecting life and death of microorganisms. Academic Press, Orlando, p 311

Iucci L, Patrignani F, Vallicelli M, Guerzoni E, Lanciotti R (2007). Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18(5): 558-565

Jackson R (2008). Wine Science. Academic Press, USA.

Jaeger H, Meneses N, Knorr D (2009). Impact of PEF treatment in homogeneity such as electric field distribution, flow characteristics and temperature effects on the inactivation of *E. coli* and milk alkaline phosphatase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 10(4): 470-480

Jakob U, Muse W, Eser M, Bardwell JCA (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96:341-352.

Jay JM, Loessner MJ, Golden DA (2009) Microbiologia degli alimenti. Springer, Milano

Jobin MP, Delmas F, Garmyn D, Diviès C, Guzzo J (1997). Molecular characterization of the gene encoding an 18-kilodalton small heat shock protein associated with the membrane of *Leuconostoc oenos*. *Appl Environ Microbiol* 63:609-614.

Jobin MP, Garmyn D, Diviès C, Guzzo J (1999). Expression of the *Oenococcus oeni* *trxA* gene is induced by hydrogen peroxide and heat shock. *Microbiology* 145:1245-1251.

Kim WS, Perl L, Park JH, Tandianus JE, Dunn NW (2001). Assessment of stress response of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Curr Microbiol* 43:346-350.

Kleerebezem M, Boekhorst J, van Kranenburg R, Molenaar D, Kuipers OP, Leer R, Turchini R, Peters SA, Sandbrink HM, Fiers MW, et al. (2003). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1990-1995.

- Knoll C, Fritsch S, Schnell S, Grossmann M, Krieger-Weber S, Du Toit M, Rauhut D (2012). Impact of different malolactic fermentation inoculation scenarios on Riesling wine aroma *World J Microbiol Biotechnol* 28:1143–1153.
- Kokkinofta R, Economidou N, Tzioni E, Damianou K, Poulli K, Savvidou C, Louka C, Kanari P (2014) Studies on the authenticity of local wines by spectroscopic and chemometric analysis. *J Chem Chem Eng* 8:101–107
- Kostinek M, Specht I, Edward VA, Schillinger U, Hertel C, Holzapfel WH, Franz CM (2005). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol* 6:527–540.
- Krieger-Weber S (2009). Application of yeast and bacteria as starter cultures. In: König, H., Uden, G. & Fröhlich, J. (eds). *Biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*. Springer, Berlin. pp. 498-511.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.
- Lanvaud-Funel A (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:317-331.
- Leão C, Van Uden N (1984). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 774:43-48.
- Le Blanc JG, Todorov SD (2011). Bactetiocin producing lactic acid bacteria isolated from boza, a traditional fermented beverage from Balcan Peninsula – from to application. pp.1311-1320. In: *Science against Microbial Pathogens: Communucating Current Reserch and Thecnological Avances*, A. Méndez-Vilas (Ed.), Badajoz, Spain
- Lee SG, Lee KW, Park TH, Park JY, Han NS, Kim JH (2012). Proteomic analysis of proteins increased or reduced by ethanol of *Lactobacillus plantarum* ST4 isolated from Makgeoli, traditional Korean rice wine. *J Microbiol Biotechnol* 22:516–525.
- Lerm E, Engelbrecht L, du Toit M (2010). Malolactic fermentation: the ABC0 s of MLF. *S Afr J Enol Vitic* 31:186–192.
- Lerm E, Engelbrecht L, du Toit M (2011). Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic starter cultures. *S Afr J Enol Vitic* 32:280– 295.
- Lim EM, Ehrlich SD, Maguin E (2000). Identification of stress-inducible proteins in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Electrophoresis* 21:2557-2561.
- Lindquist S, Craig EA (1988). The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 22:631- 677.
- Liu S, Skinner-Nemec KA, Leathers TD (2008). *Lactobacillus buchneri* strain NRRL B-30929 converts a concentrated mixture of xylose and glucose into ethanol and other products. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:75-81.

- Liu SQ (2002). A review: malolactic fermentation in wine - beyond deacidification. *J Appl Microbiol* 92:589-601
- Llaubères RM, Richard B, Lanvaud-Funel A, Dubourdieu D (1990). Structure of an exocellular β -D-glucan from *Pediococcus* sp, a wine lactic acid bacterium. *Carbohydr Res* 203:103-107.
- Lomovskaya O, Lewis K (1992). Emr, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89:8938-8942.
- Lonvaud-Funel A (1999). Lactic acid bacteria in the quality improvement and depreciation of wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76:317-331.
- Lopez I, Lopez R, Santamaria P, Torres C, RuizLarrea F (2008). Performance of malolactic fermentation by inoculation of selected *Lactobacillus plantarum* and *Oenococcus oeni* strains isolated from Rioja red wines. *Vitis* 47:123–129.
- Lorca GL, Font de Valdez G (2009). *Lactobacillus* stress responses. In: Ljungh A, Waldström T (Eds), *Lactobacillus* molecular biology. Caister Academic Press, Norfolk, pp. 115–137.
- Lu Z, Breidt JF, Fleming HP, Altermann E, Klaenhammer TR, (2003). Isolation and characterization of a *Lactobacillus plantarum* bacteriophage, AJL-1, from a cucumber fermentation. *Int J Food Microbiol* 84:225–235.
- Macklaim J M, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond J-A, Reid G, Gregory B (2013). Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome* 1:12
- Maldonado A, Ruiz-Barba JL, Floriano B, Jimenez-Diaz R (2002). The locus responsible for production of plantaricin S, a class IIb bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, is widely distributed among wild-type *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations. *Int J Food Microbiol* 77:117–124.
- Mañas P, Pagán R, Alvarez I, Condón Usón S (2003). Survival of *Salmonella senftenberg* 775 W to current liquid whole egg pasteurization treatments. *Food Microbiology* 20(5): 593-600
- Marquis RE, Bender GR, Murray DR, Wong A (1987). Arginine deiminase system and bacterial adaptation to acid environments. *Appl Environ Microbiol* 53:198-200.
- Martinac B, Adler J, Kung C (1990). Mechanosensitive ion channels of *E. coli* activated by amphipaths. *Nature* 348:261-263.
- Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SK, Guigas C, Franz C, Holzapfel WH (2008). Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya. *Current Microbiol* 56:315–321.
- McCormick ML, Buettner GR, Britigan BE (1998). Endogenous superoxide dismutase levels regulate iron-dependent hydroxyl radical formation in *Escherichia coli* exposed to hydrogen peroxide. *J Bacteriol* 180:622-625.

Mills S, Serrano LM, Griffin C, O'Connor PM, Schaad G, Bruining C, Hill C, Ross RP, Meijer WC (2011). Inhibitory activity of *Lactobacillus plantarum* LMG P-26358 against *Listeria innocua* when used as an adjunct starter in the manufacture of cheese. *10th Symposium on Lactic Acid Bacterium*.

Mira De Orduña R, Patchett ML, Liu SQ, Pilone GJ (2001). Growth and arginine metabolism of the wine lactic acid bacteria *Lactobacillus buchneri* and *Oenococcus oeni* at different pH values and arginine concentrations. *Appl Environ Microbiol* 67:1657-1662.

Miyoshi A, Rochat T, Gratadoux J-J, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, Azevedo V (2003). Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2:348-359.

Molenaar D, Bringel F, Schuren FH, de Vos WM, Siezen RJ, Kleerebezem M (2005). Exploring *Lactobacillus plantarum* genome diversity by using microarrays. *J Bacteriol* 187(17):6119-27.

Moore MM, Dal Bello F, Arendt EK (2007). Sourdough fermented by *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 improves the quality and shelf life of gluten-free bread. *Eur Food Res Technol* 226: 1309-1316.

Moreno-Arribas MV, Polo MC (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Food Sci Nutr* 45(4):265-86.7

Narberhaus F (2002). Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:64-93.

Nedwell DB (1999). Effect of low temperature on microbial growth: lowered affinity for substrates limits growth at low temperature. *FEMS Microbiology Ecology* 30(2):101-111

Nisiotou, A.A., Dourou, D., Filippousi, M.-E., Diamantea, E., Fragkoulis, P., Tassou, C., Banilas, G., 2015. Genetic and technological characterisation of vineyard- and winery-associated lactic acid bacteria. *BioMed Res. Int.* 2015. Article ID 508254

Olguín N, Champomier-Vergès M, Anglade P, Baraige F, Cordero-Otero R, Bordons A, Zagorec M, Reguant C (2015). Transcriptomic and proteomic analysis of *Oenococcus oeni* PSU-1 response to ethanol shock. *Food Microbiol* 51:87-95.

Onetto CA, Bordeu E (2015). Pre-alcoholic fermentation acidification of red grape must using *Lactobacillus plantarum*. *Antonie Leeuwenhoek* 108(6):1469-1475.

Osman YA, Ingram LO (1985). Mechanism of ethanol inhibition of fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. *J Bacteriol* 164:173-180.

O'Sullivan E, Condon S (1997). Intracellular pH is a major factor in the induction of tolerance to acid and other stresses in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 63:4210-4215.

Panoff JM, Thammavongs B, Guéguen M (2000). Cryoprotectants lead to phenotypic adaptation to freeze-thaw stress in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* CIP 101027T. *Cryobiology* 40:264-269.

- Parente E, Villani F (2012). Ecofisiologia dei microrganismi negli alimenti. In: Farris GA, Gobbetti M, Neviani E, Vincenzini M (eds) *Microbiologia dei prodotti alimentari*. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 37-68
- Pepe O, Blaiotta G, Anastasio M, Moschetti G, Ercolini D, Villani F (2004). Technological and Molecular diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from naturally fermented sourdoughs. *Syst Appl Microbiol* 27: 443-453.
- Pérez Pulido R, Ben Omar N, Abriouel H, Lucas López R, Martínez Cañamero M, Guyot JP, Gálvez A (2007). Characterization of lactobacilli isolated from caper berry fermentations. *J Appl Microbiol* 102:583-590.
- Pichereau V, Hartke A, Auffray Y (2000). Starvation and osmotic stress induced multiresistances. Influence of extracellular compounds. *Int J Food Microbiol* 55:19-25.
- Plengvidhya V, Breidt JF, Lu Z, Fleming HP (2007). DNA fingerprinting of lactic acid bacteria in sauerkraut fermentations. *Appl Environ Microbiol* 73:7697-7702
- Poolman B, Glaasker E (1998). Regulation of compatible solute accumulation in bacteria. *Mol Microbiol* 29:397-407.
- Quatravaux S, Remize F, Bryckaert E, Colavizza D, Guzzo J (2006). Examination of *Lactobacillus plantarum* lactate metabolism side effects in relation to the modulation of aeration parameters. *J Appl. Microbiol* 101:903-912.
- Raybaudi-Massilia RM, Mosqueda-Melgar J, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O (2009). Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(3):157-180
- Reale A, Tremonte P, Succi M, Sorrentino E, Coppola R (2005). Exploration of lactic acid bacteria ecosystem of sourdoughs from the Molise region. *Annals of Microbiology* 55(1):17-22.
- Reale A, Di Renzo T, Succi M, Tremonte P, Coppola R, Sorrentino E (2011). Identification of lactobacilli isolated in traditional ripe wheat sourdoughs by using molecular methods. *World J Microbiol Biotechnol* 27(2):237-244.
- Regolamento (CE) N. 761/1999 della commissione del 12 aprile 1999 recante modifica del regolamento (CEE) n. 2676/90 che determina i metodi di analisi da utilizzare nel settore del vino.
- Renault P, Gaillardin C, Heslot H (1989). Product of the *Lactococcus lactis* gene required for malolactic fermentation is homologous to a family of positive regulators. *J Bacteriol* 171:3108-3114.
- Rigomier D, Bohin JP, Lubochinsky B (1980). Effects of ethanol and methanol on lipid metabolism in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 121:139-149.

Rodriguez – Romo LA, Yousef AE (2005). Microbial stress adaptation and safety of produce. In: Microbiology of fruits and vegetables. *CRC Press*.

Rodríguez-Bencomo JJ, Muñoz-Gonzales C, Andujar-Ortiz I, Martín-Alvarez P, Moreno-Arribas MV, Pozo-Bayon MA (2011). Assessment of the effect of the non-volatile wine matrix on the volatility of typical wine aroma compounds by headspace solid phase microextraction/gas chromatography analysis. *J Sci Food Agr* 91:2484-2494.

Ross AIV, Griffiths MW, Mittal GS, Deeth HC (2003) Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 89(2-3):125-138

Salimei E, Capilongo V, Simoni A, Peiretti PG, Maglieri C, Romano CA, Mannina L, Coppola R, Sorrentino E (2007). *Lactobacillus rhamnosus* as additive for maize and sorghum ensiling. *J Agric Food Chem* 55:9600-9607.

Sakamoto K, Margolles A, van Veen HW, Konings WN (2001). Hop resistance in the beer spoilage bacterium *Lactobacillus brevis* is mediated by the ATP-binding cassette multidrug transporter HorA. *J Bacteriol.*183:5371-5375.

Samelis J, Sofos JN (2003). Organic acids. In: Roller S (ed) Natural antimicrobials for the minimal processing of foods. CRC Press, Boca Raton

Schmidt G, Hertel C, Hammes WP (1999). Molecular characterisation of the dnaK operon of *Lactobacillus sakei* LTH681. *Syst Appl Microbiol* 22:321-328.

Sedewitz B, Schleifer KH, Götz F (1984). Purification and biochemical characterization of pyruvate oxidase from *Lactobacillus plantarum*. *J Bacteriol* 160:273-278.

Seseña S, Palop ML (2007). An ecological study of lactic acid bacteria from Almagro eggplant fermentation brines. *J Appl Microbiol* 103:1553-1561.

Shah NP (2007). Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal* 17:1262-1277.

Shane Gold R, Meagher MM, Hutkins R, Conway T (1992). Ethanol tolerance and carbohydrate metabolism in lactobacilli. *Journal of Industrial Microbiology* 10:45-54.

Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV (1967). Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* 28:815-820.

Siezen RJ, Tzeneva VA, Castioni A, Wels M, Phan HTK, Rademaker JLW, Starrenburg MJC, Kleerebezem M, Molenaar D, van Hylckama Vlieg JET (2010). Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environ Microbiol* 12:758-773.

Siezen RJ, van Hylckama Vlieg JE (2011). Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microbial Cell Factories* 10:1-13.

Silveira MG, Baumgärtner M, Rombouts FM, Abee T (2004). Effect of adaptation to ethanol on cytoplasmic and membrane protein profiles of *Oenococcus oeni*. *Appl Environ Microbiol* 70:2748-2755.

Sinensky M (1974). Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 71:522-525.

Singh AK, Ramesh A (2008). Succession of dominant and antagonistic lactic acid bacteria in fermented cucumber: insights from a PCR – based approach. *Food Microbiol* 25: 278-287.

Siragusa S, De Angelis M, Di Cagno R, Rizzello CG, Coda R, Gobbetti M (2007). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* 4(1):106-122.

Smeds A, Varmanen P, Palva A (1998). Molecular characterization of a stressinducible gene from *Lactobacillus helveticus*. *J Bacteriol* 180:6148-6153.

Solieri L, Genova F, De Paola M, Giudici P (2009). Characterization and technological properties of *Oenococcus oeni* strains from wine spontaneous malolactic fermentations: a framework for selection of new starter cultures. *J Appl Microbiol* 108:285-298.

Sorrentino E, Reale A, Tremonte P, Maiuro L, Succi M, Tipaldi L, Di Renzo T, Pannella G, Coppola R (2013). *Lactobacillus plantarum* 29 inhibits *Penicillium* spp. involved in the spoilage of black truffles (*Tuber aestivum*). *Jl of Food Sci* 78(8):M1188–M1194.

Spano G, Capozzi V, Vernile A, Massa S (2004). Cloning, molecular characterization and expression analysis of two small heat shock genes isolated from wine *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Microbiol* 97:774-782.

Spano G, Massa S, (2006). Environmental stress response in wine lactic acid bacteria: beyond *Bacillus subtilis*. *Critical Reviews in Microbiology* 32:77-86.

Stratiotis AL, Dicks LMT (2001). Identification of *Lactobacillus* spp. isolated from different phases during the production of a South African fortified wine. *S Afr J Enol Vitic* 23:14-21.

Sugimoto S, Al-Mahin A, Sonomoto K (2008). Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties. *J Biosci Bioeng* 106:324–336.

Suzuki CK, Rep M, van Dijn JM, Suda K, Grivell LA, Schatz G (1997). ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis. *Trends Biochem Sci* 22:118-123.

Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius LS (2005). Yeast and bacteria modulation of wine aroma and flavour. *Aus J Grape Wine Res* 11:139-173.

Synthesis of γ -aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses. *Appl and Env Microbiol* 73:7283-7290.

Teixeira P, Castro H, Mohácsi-Farkas C, Kirby R (1997). Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. *J Appl Microbiol* 83:219- 226.

- Testa B, Lombardi SJ, Tremonte P, Succi M, Tipaldi L, Pannella G, Sorrentino E, Iorizzo M, Coppola R (2014). Biodiversity of *Lactobacillus plantarum* from traditional Italian wines. *World J Microbiol Biotechnol* 30(8):2299-2305.
- Thomas LV, Delves-Broughton J (2005). Nisin. In: Davidson PM, Sofos JN, Branen AL (eds) *Anti - microbials in Food*. Taylor & Francis, Boca Raton, pp 237-274
- Tyopponen S, Petaja E, Mattila-Sandholm T (2002). Bioprotectives and probiotics for dry sausages. *Int J Food Microbiol* 98:1-12.
- Van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, Barbe V, Bryson K, Nicolas P, Robert C, Oztas S, Mangenot S, Couloux A, Loux V, Dervyn R, Bossy R, Bolotin A, Batto JM, Walunas T, Gibrat JF, Bessières P, Weissenbach J, Ehrlich SD, Maguin E (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(24):9274-9.
- Van de Guchte M, Serror P, Chervaux C, Smokvina T, Ehrlich SD, Maguin E (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82:187-216.
- Van der Meulen R, Scheirlinck I, Van Schoor A, Huys G, Vancanneyt M, Vandamme P, De Vuyst L (2007). Population dynamics and metabolite target analysis of lactic acid bacteria during laboratory fermentations of wheat and spelt sourdoughs. *Appl Environ Microbiol* 73:4741-4750.
- Wang Y, Xu N, Xi A, Ahmed Z, Zhang B, Bai X (2009). Effects of *Lactobacillus plantarum* MA2 isolated from Tibet kefir on lipid metabolism and intestinal microflora of rats fed on high-cholesterol diet. *Appl Microbiol Biotechnol* 84:341-347.
- Weitzel G, Pilatus U, Rensing L (1987). The cytoplasmic pH, ATP content and total protein synthesis rate during heat-shock protein inducing treatments in yeast. *Exp Cell Res* 170:64-79.
- Wilson PDG, Brocklehurst TF, Arino S, Thuault D, Jakobsen M, Langee M, Farkas J, Wimpenny JWT, Van Impeh JF (2002) Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *Int J Food Microbiol* 73(2-3):275-289.
- Wouters JA, Mailhes M, Rombouts FM, de Vos WM, Kuipers OP, Abee T (2000). Physiological and regulatory effects of controlled overproduction of five cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. *Appl Environ Microbiol* 66:3756-3763.
- Yomano LP, York SW, Ingram LO (1998). Isolation and characterization of ethanol-tolerant mutants of *Escherichia coli* KO11 for fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol* 20:132-138.
- Zhang ZY, Liu C, Zhu YZ, Zhong Y, Zhu YQ, Zheng HJ, Zhao GP, Wang SY, Guo XK (2009). Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* JDM1. *J Bacteriol* 191:5020-5021.