

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL MOLISE

CAMPOBASSO



FACOLTÀ DI AGRARIA

XXV CICLO DI DOTTORATO IN

BIOTECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI

TITOLO

Identificazione, caratterizzazione e industrializzazione di ceppi di

Streptococcus thermophilus per la produzione di yogurt

Scienze e Tecnologie Agroalimentari (AGR/15) Microbiologia Agraria

(AGR/16)

Coordinatore Prof. Emanuele Marconi

Tutor Prof.ssa Elena Sorrentino

Dottoranda: Sara D'Alonges

Matr. 141487

Anno Accademico 2010/2012

INDICE	II
RIASSUNTO	IV
1. INTRODUZIONE	1
1.1 Biotecnologie dei Batteri Lattici in campo alimentare	2
1.2 Classificazione tassonomica ed identificazione dei batteri lattici	3
1.2.1 Classificazione tassonomica dai batteri lattici	3
1.2.2 Analisi genomica dei batteri lattici	6
1.2.3 Identificazione dei batteri lattici	8
1.3 Metabolismo e Proprietà tecnologiche dei batteri lattici in campo lattiero-caseario	14
1.3.1 Fermentazione degli zuccheri e potere acidificante	15
1.3.2 Produzioni di composti aromatici	21
1.3.3 Produzione di polisaccaridi	26
1.3.4 Produzione di batteriocine	29
1.3.5 Resistenza a batteriofagi	32
1.4 Batteri lattici in campo lattiero-caseario	36
1.4.1 Batteri lattici e produzione di formaggi	36
1.4.2 Batteri lattici e produzione di yoghurt	41
1.5 Fermentazione industriale dei batteri lattici	44
1.5.1 Fasi preparatorie del reattore e del substrato	45
1.5.2 Fermentazione	47
1.5.3 Separazione dei prodotti finiti	49
1.6 Obiettivo della tesi	50
2. MATERIALI E METODI	52
2.1 Substrati principali	53
2.2 Colture oggetto di studio	54
2.3 Identificazione dei ceppi	55
2.3.1 Identificazione fenotipica e biochimica	55
2.3.2 Identificazione biomolecolare degli isolati	56
2.3.3 Bio-tipizzazione dei ceppi	58
2.4 Valutazione tecnologica dei ceppi microbici	59
2.4.1 Capacità acidificante	59
2.4.2 Capacità addensante	60
2.4.3 Capacità proteolitica	62

2.4.4	Capacità aromatizzante	63
2.4.5	Sensibilità fagi	63
2.5	Industrializzazione dei ceppi	64
2.5.1	Fermentazioni su scala laboratorio	65
2.5.2	Fermentazioni in fermentatore	65
2.5.3	Concentrazione cellulare	65
2.5.4	Liofilizzazione	66
2.6	Valutazione di colture liofilizzate per la produzione di yoghurt	66
2.6.1	Formulazione di colture miste per la fermentazione di yogurt	66
2.6.2	Valutazione delle caratteristiche tecnologiche delle miscele	67
3.	RISULTATI	69
3.1	Identificazione di colture lattiche	70
3.1.1	Identificazione fenotipica e biochimica	70
3.1.2	Identificazione biomolecolare degli isolati	72
3.1.3	Bio-tipizzazione dei ceppi	73
3.2	Valutazione tecnologica di colture lattiche	74
3.2.1	Capacità acidificante	74
3.2.2	Capacità addensante	84
3.2.3	Capacità proteolitica	87
3.2.4	Capacità aromatizzante	88
3.2.5	Selezione di batteriofagi specifici e valutazione di host-range	89
3.3	Produzione industriale di batteri lattici	90
3.3.1	Fermentazioni in laboratorio	90
3.3.2	Fermentazioni industriale	91
3.3.3	Concentrazione e liofilizzazione	91
3.4	Valutazione di colture liofilizzate per la produzione di yoghurt	92
3.4.1	Capacità acidificante	93
3.4.2	Capacità addensante	95
3.4.3	Capacità aromatizzante	96
4.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	97
5.	IMMAGINI	103
6.	BIBLIOGRAFIA	116

RIASSUNTO

Il contesto globale del comparto agro-alimentare richiede ad oggi una ricerca continua per assicurare qualità e sicurezza degli alimenti.

La produzione moderna di alimenti richiede elevato grado di standardizzazione, particolarmente la produzione gli alimenti fermentati che include un processo biotecnologico in cui la componente biotica gioca un ruolo fondamentale

Di qui la necessità disporre di un'ampia gamma di microrganismi atti alla conduzione del processo fermentativo in modo da imprimere caratteristiche specifiche all'alimento fermentato; aspetto fondamentale nella conduzione delle fermentazione in campo lattiero-caseario, particolarmente per la produzione dello yogurt.

Il presente progetto di dottorato ha volto la sua attenzione alla selezione da matrici alimentari di ceppi di batteri lattici (LAB); in particolare le matrici oggetto di studio sono stati campioni di yogurt artigianale e latte fermentato.

Gli isolati ottenuti sono stati sottoposti sia ad indagini per l'identificazione genotipica di specie e di ceppo sia ad indagini per la caratterizzazione pro-tecnologica, al fine di individuare i microrganismi più idonei alla conduzione di fermentazioni controllate per la produzione di yogurt.

L'identificazione è stata realizzata mediante l'impiego di tecniche molecolari innovative (PCR-DGGE, RAPD-PCR, etc.) per la determinazione della specie e la tipizzazione dei ceppi microbici. Tutti gli isolati oggetto di studio sono stati identificati come *Streptococcus thermophilus*.

La caratterizzazione pro-tecnologica dei ceppi di streptococchi è stata incentrata sullo studio di caratteri peculiari in funzione della loro potenziale applicazione per la

produzione di yogurt. In particolare sono state studiate caratteristiche di interesse tecnologico quali: capacità e velocità di acidificazione, produzione di EPS, produzione di composti aromatici, attività proteolitica, resistenza fagica.

Infine lo studio è stato incentrato su prove di industrializzazione in scala pilota dei ceppi di *Streptococcus thermophilus* che presentavano caratteri tecnologici interessanti.

L'ottenimento di una coltura liofilizzata industriale su scala pilota ha permesso di valutare la possibile applicazione degli streptococchi come starter microbico selezionato per la produzione di yogurt.

In particolare i ceppi utili sono stati impiegati in formulazioni complesse di starter microbici per la fermentazione di yogurt per valutarne le *performance* tecnologiche.

Lo studio ha confermato che alcuni ceppi di streptococchi presentavano caratteristiche determinati sia per la conduzione delle fermentazione sia per le proprietà finali dello yogurt ottenuto; questo rende i ceppi selezionati dei buoni candidati nell'applicazione in colture starter per la produzione di yogurt.

1. INTRODUZIONE

1.1 Biotecnologie dei Batteri Lattici in campo alimentare

I batteri lattici (Lactic Acid Bacteria - LAB) costituiscono un gruppo eterogeneo di batteri Gram positivi con metabolismo di tipo fermentativo in cui l'acido lattico è il metabolita chiave. I batteri lattici sono molto diffusi nell'ambiente dove occupano nicchie ecologiche molto diverse che vanno dalla superficie delle piante al tratto gastrointestinale di molti animali. Si tratta di batteri di forma sferica o a bastoncino, isolati o raggruppati in corte catene, immobili, catalasi negativi, non sporigeni.

L'impiego sicuro nei diversi settori alimentare li qualifica con lo status di GRAS (Generally Recognized As Safe) che unitamente a diverse caratteristiche metaboliche li rende atti ad un ampio spettro di applicazioni industriali (Klaenhammer *et al.*, 2005).

Proprietà quali aroma, struttura e conservabilità di molti alimenti fermentati tra cui prodotti lattiero-caseari, carni e vegetali fermentati, prodotti da forno ed insilati sono legate sia alla presenza sia all'attività metabolica di batteri lattici afferenti a diversi generi: *Lactobacillus* (latte, carni, vegetali, cereali) *Lactococcus* (latte), *Leuconostoc* (latte, vegetali) *Pediococcus* (vegetali, carni) *Oenococcus* (vino) *Enterococcus* (latte) e *Streptococcus* (latte) (Klaenhammer *et al.*, 2005).

L'uso dei batteri lattici negli alimenti fermentati ha origine antichissima e gli accorgimenti che tradizionalmente sono stati impiegati per favorire lo sviluppo dei microrganismi utili a scapito di quelli alteranti sono il risultato di esperienze derivanti da pratiche empiriche.

La fermentazione affidata ai microrganismi naturalmente presenti nella materia prima dà risultati generalmente accettabili ma non garantisce la migliore qualità organolettica e talvolta neppure quella igienico-sanitaria. E' per questo motivo che già da molto tempo si è imposta la necessità di controllare le fermentazioni con starter microbici selezionati capaci di dare risultati sicuri e prevedibili (Zambonelli, 2001).

L'applicazione biotecnologica dei batteri lattici in modo razionale e standardizzato consente di controllare lo sviluppo microbico all'interno dell'ecosistema alimento garantendo la qualità dei prodotti finiti. La trasformazione per via fermentativa è uno dei metodi ad oggi più seguiti per la conservazione dei prodotti alimentari e per il miglioramento della loro qualità (Klaenhammer *et al.*, 2005).

1.2 *Classificazione tassonomica e identificazione dei batteri lattici*

1.2.1 Classificazione tassonomica dei batteri lattici

La più recente e aggiornata classificazione tassonomica dei batteri lattici è basata sulla classificazione fenotipica che fa riferimento al *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Vos *et al.*, 2009). I principali generi sono di seguito riportati.

- Genere *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus* appartiene alla Famiglia delle *Lactobacillaceae*, ordine *Lactobacillales*, Classe *Bacilli* del Phylum *Firmicutes*. Sono microrganismi Gram positivi, anaerobi, catalasi negativi, asporigeni, immobili. Le cellule sono di forma regolare, allungate, sottili, possono essere avvolte, corte e ricurve, e possono formare lunghe catene. Sono microrganismi sia eterofermentanti sia omofermentanti,

microaerofili; hanno temperature ottimali di sviluppo variabili, il valore di pH ottimale è compreso tra 5,5-6,2. Il genere comprende differenti specie suddivise in 3 gruppi: Lattobacilli omofermentanti, Lattobacilli omofermentanti e/o eterofermentanti facoltativi, Lattobacilli eterofermentanti obbligati (Vos *et al.*, 2009).

- Genere *Pediococcus*

I batteri del genere *Pediococcus* appartengono alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Questi batteri hanno un metabolismo omofermentativo e producono, a partire dagli esosi, acido D(-)lattico o L(+)lattico, a seconda delle specie. Le cellule sono sferiche, mai allungate, raramente isolate e non formano mai catene. Si dividono alternativamente in due piani perpendicolari, che determinano la formazione di tetradi; tutte le specie sviluppano bene a 30° C, ma la loro temperatura ideale di crescita è compresa tra 25 e 40° C, a seconda della specie. Sono esigenti in fattori di crescita e aminoacidi e richiedono terreni particolarmente ricchi. La loro scarsa attività proteolitica e la generale incapacità di fermentare il lattosio, li rendono incapaci di coagulare il latte (Vos *et al.*, 2009).

- Genere *Aerococcus*

Il genere *Aerococcus* è classificato nella famiglia *Aerococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Questo genere comprende cocci Gram positivi, disposti in tetradi o grappoli, anaerobi, catalasi negativi. Dagli streptococchi e dagli enterococchi si distinguono per la disposizione cellulare. Sono batteri α -emolitici, immobili, sensibili alla vancomicina, la maggior parte idrolizza

l'ippurato, positivi alla bile-esculina, crescono in presenza di NaCl al 6,5%, non crescono a 10°C e a 45°C.

- Genere *Carnobacterium*

Il genere *Carnobacterium* è classificato nella famiglia *Carnobacteriaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*.

I batteri del genere *Carnobacterium* hanno forma bastoncellare, tolleranza a pH elevati ma non al di sotto di 5,4. Producono batteriocine, alcune delle quali a spettro relativamente ampio.

- Genere *Enterococcus*

Il genere è classificato nella famiglia *Enterococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Gli enterococchi sono batteri di forma coccica, hanno un metabolismo omofermentativo e producono acido L(+)lattico. Si possono generalmente distinguere dagli altri batteri lattici a forma coccica per la presenza dell'antigene del gruppo D e per la loro capacità di crescere a 10 e 45°C, in presenza del 6,5 % di NaCl o del 40% di bile e a pH 9,6. (Vos *et al.*, 2009).

- Genere *Leuconostoc*

I batteri appartenenti al genere *Leuconostoc* appartengono alla famiglia delle *Leuconostocaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Le cellule sono sferiche e si presentano sia singolarmente sia in catenelle. Sono Gram positivi, non mobili, non sporigeni e facoltativamente anaerobi. La temperatura di crescita ideale è compresa tra 20 e 30°C, ma crescono in intervallo di temperatura che va da 5 a 20°C. La loro crescita dipende dalla presenza nel mezzo colturale di

aminoacidi quali acido nicotico, tiamina, biotina ed acido pantotenico (Vos *et al.*, 2009).

- Genere *Streptococcus*

Il genere è ascritto alla famiglia *Streptococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Questi batteri di forma coccica, sono disposti in catene di lunghezza variabile, hanno un metabolismo omofermentativo e producono esclusivamente acido L(+)lattico. Si distinguono per la presenza dell'antigene del gruppo N, per il carattere debolmente α -emolitico e non β -emolitico. Crescono in condizioni ottimali di 37 e 45°C (Vos *et al.*, 2009).

- Genere *Lactococcus*

Il genere è ascritto alla famiglia *Streptococcaceae*, ordine *Lactobacillales*, classe *Bacilli*, phylum *Firmicutes*. Questi batteri di forma coccica, sono disposti in catene di lunghezza variabile, hanno un metabolismo omofermentativo e producono esclusivamente L(+)acido lattico. Si distinguono per la presenza dell'antigene del gruppo N, per il carattere debolmente α -emolitico e non β -emolitico, per la termosensibilità e l'incapacità di crescere in presenza del 6,5% di NaCl e a pH di 9,6 (Vos *et al.*, 2009).

1.2.2. Analisi genomica dei batteri lattici

L'attuale classificazione tassonomica dei batteri lattici tiene conto di un approccio integrato in cui sono presi in considerazione diversi aspetti genetici.

Attualmente la classificazione batterica è integrata sulla base dell'esito delle analisi delle sequenze complete del gene codificante per il 16S rRNA (**Figura 1.1**).

La DNA-DNA re-association è la tecnica di base impiegata nella delimitazione di specie nell'ambito della tassonomia batterica, unico limite è rappresentato dalla scelta della percentuale di re-association utile, normalmente del 70%.

La valutazione del contenuto percentuale di GC è il metodo basato sull'analisi del DNA nella tassonomia batterica. I LAB normalmente hanno un contenuto di GC% al di sotto del 50%.

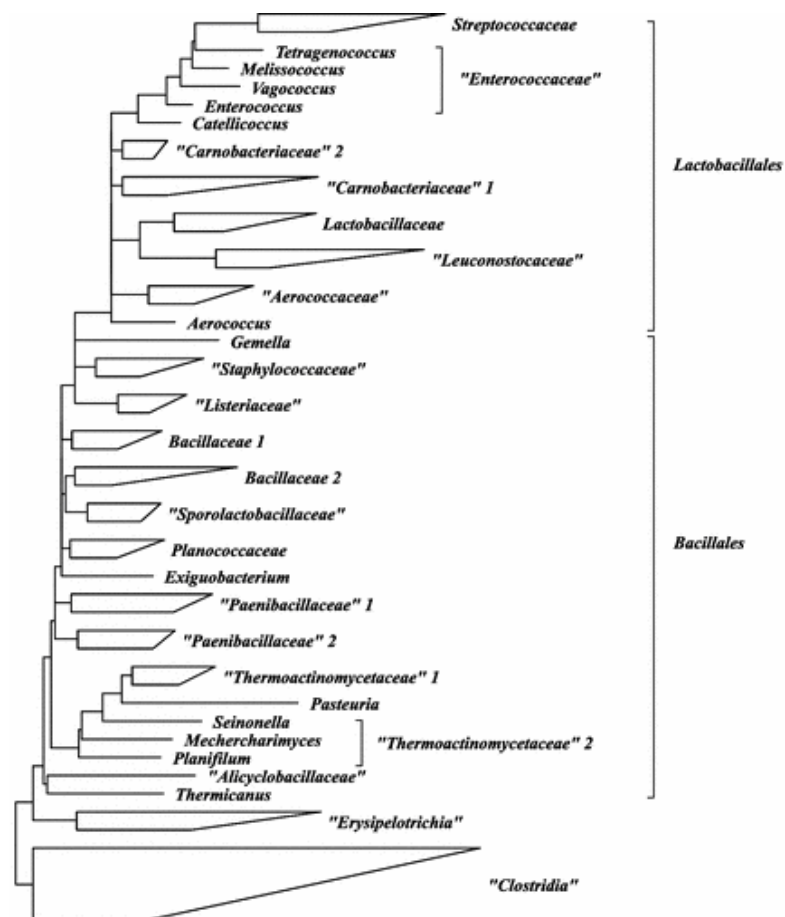


Figura 1.1. Classificazione tassonomica sulla base dell'analisi della sequenza 16S rRNA (Vos *et al.*, 2009).

L'integrazione delle diverse tecniche di classificazione può risultare l'approccio più efficace per comprendere la storia evolutiva di un dato microrganismo e la corretta collocazione tassonomica.

I batteri lattici presentano genoma di piccole dimensioni compreso tra 1,8 e 3,3 Mbp e bassa percentuale di GC.

Per quelle specie in cui il genoma è stato completamente sequenziato è emerso un quadro della storia evolutiva delle diverse specie in relazione alle diverse capacità metaboliche e biosintetiche. Il numero di geni codificanti proteine varia da 1700 a 3200 risultato degli eventi di “*gene loss*” e “*gene gain*” durante la loro storia evolutiva. L’analisi genomica comparativa dimostra che i geni di diverse vie biosintetiche sono stati persi nel tempo mentre è stata acquisita la capacità di metabolizzare zuccheri ed aminoacidi mediante trasferimento genico orizzontale o duplicazione genica. In generale si è osservata perdita di geni ancestrali con conseguente semplificazione metabolica indice di una tendenza evolutiva di adattamento a nicchie ecologiche ricche di nutrienti.

1.2.3 Identificazione dei batteri lattici

L’uso dei batteri lattici in campo industriale è legata all’espressione di caratteristiche peculiari di ceppi di cui non è sempre necessaria la definizione tassonomica fino a livello di ceppi. L’identificazione a tal fine deve rappresentare un buon bilancio tra risoluzione tassonomica e certezza di applicazione includendo lavoro, tempo e costi.

In generale i metodi di identificazione fenotipica sono in alcuni casi più economici, in altri casi non sono del tutto utili a discriminare situazioni in cui vi è discordanza tra espressione fenotipica e genotipo. I metodi fenotipici includono tecniche di: caratterizzazione morfologica (analisi al microscopio); caratterizzazione fisiologica (caratteristiche di sviluppo); caratterizzazione biochimica (assimilazione e

fermentazione degli zuccheri); profilo proteico (elettroforesi su gel di poliacrilammide di proteine cellulari).

L'analisi morfologica comprende quella delle cellule (la forma delle cellule, la presenza di endospore, di flagelli, di organelli, d'inclusioni, colorazione di Gram) e quella della colonia (colore, dimensione, forma e consistenza).

L'analisi del metabolismo include la modalità di fermentazione del glucosio nei diversi generi di LAB, distinguendo:

- omofermentanti obbligati, che fermentano solo gli esosi e non i pentosi,
- eterofermentanti obbligati, che fermentano esosi e pentosi mediante la stessa via metabolica,
- eterofermentanti facoltativi, che fermentano esosi e pentosi mediante due diverse vie metaboliche.

Altri test biochimici e fisiologici impiegati a fini identificati prevedono diverse tipologie di analisi: temperature limite di crescita, fattori di crescita richiesti, idrolisi dell'arginina, formazione di acetoina (test di Voges-Prescauer), tolleranza al sale/bile, emolisi (soprattutto per il genere *Streptococcus*); presenza di specifici enzimi (β -galattosidasi e β -glucuronidasi).

I test fisiologici, nutrizionali e biochimici risultano laboriosi, con tempi lunghi di risposta e qualcuno difficile da standardizzare ma continuano ad aver ampia rilevanza nella classificazione tassonomica considerando la buona discriminazione che mostrano a livello di genere che risulta però meno attendibile a livello di specie.

Unica eccezione è costituita dall'analisi dei profili proteici che consente una buona discriminazione anche a livello di specie.

L'identificazione genotipica consente un differente potere di discriminazione sia a livello di specie sia a livello di ceppo (*typing*). Tali metodologie sono distinte in metodi correlati alla riproduzione o all'arricchimento delle colture batteriche (*culture - dependent*) ed altri metodi che non prevedono la coltivazione delle colture batteriche (*culture - independent*) (Temmermann *et al.*, 2004).

Gran parte dei metodi genotipici sono basati sulla Reazione a Catena della Polimerasi (*Polymerase Chain Reaction- PCR*). La reazione prevede l'amplificazione selettiva di frammenti di DNA *target* mediante l'uso di *primer*, oligonucleotidi, in condizioni di reazione controllate. Attualmente sono disponibili *primer* specie-specifici, che amplificano parte del rRNA 16S, per identificare numerose specie di LAB. Alternativamente, quando nuovi isolati devono essere identificati, il sequenziamento (*sequencing*) del rRNA 16S o 23S è la tecnica più utile per discriminare la specie. Le sequenze, così ottenute, possono essere comparate con sequenze precedentemente collocate in banca dati *online* per giungere all'identificazione della specie (Temmermann *et al.*, 2004).

Diverse sono le tecniche basate sulla PCR impiegate nella tassonomia dei LAB sia per l'identificazione di specie sia per il *biotyping* delle colture lattiche, tra cui: la tecnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) la RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e la rep-PCR (*Ripetitive Genomic Element-PCR*) (Ventura *et al.*, 2003), l'AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Dellaglio *et al.*, 2005).

L'analisi del polimorfismo dei frammenti di restrizione (RFLP) del DNA batterico prevede la digestione del DNA genomico con enzimi di restrizione *rare-cutting* per

produrre pochi frammenti di grandi dimensioni. I frammenti ottenuti sono separati per dimensioni con la PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) utile soprattutto per la separazione dei frammenti genomici di grandi dimensioni. Il profilo ottenuto è caratteristico di ogni specie o ceppo batterico dato che dipende dalla specificità dell'enzima di restrizione utilizzato e dalla sequenza del genoma batterico. Ulteriore evoluzione della tecnica RFLP è lo studio del polimorfismo di lunghezza dei segmenti ristretti del gene codificante per il 16S e 23S rDNA (RFLP) o *Ribo-typing*. La ribotipizzazione è una variante della tradizionale analisi RFLP in cui si ha ibridazione di frammenti di DNA genomici digeriti da enzimi di restrizione con sonda specifica diretta ai tratti di DNA codificanti per l'RNA ribosomiale del batterio in esame; il marker è specifico per la singola combinazione sonda-enzima di restrizione. La tecnica prevede la digestione del DNA genomico in piccoli frammenti, separati per elettroforesi su gel. I frammenti sono trasferiti dal gel su membrana mediante *Southern Blotting* ed ibridati con una sonda universale marcata, specifica per specifici domini conservati dei geni codificanti per le subunità dell'RNA ribosomiale, 16S e 23S. A seguito dell'ibridazione, il marcatore legato alla sonda permette di evidenziare come bande colorate i frammenti ibridati dalla sonda. I profili ottenuti, chiamati ribotypes, sono usati per l'analisi numerica di similarità nell'ambito di un database di ceppi di riferimento e l'identificazione di isolati batterici sconosciuti (Randazzo *et al.*, 2009).

La RAPD è una tecnica ampiamente documentata come rapida, sensibile e poco costosa per la tipizzazione genetica di diversi ceppi di LAB. La RAPD prevede l'impiego di *primer*, costruiti arbitrariamente, che in particolari condizioni di reazione

(*low stringency*) consentono di ottenere frammenti di DNA amplificati casualmente, che forniscono profili caratteristici di ogni ceppo (Amor *et al.*, 2007).

La Rep-PCR amplifica regioni di DNA costituite da elementi ripetuti, quali ERIC, BOX o (GTG)₅.

L'AFLP combina RFLP e metodi basati sulla PCR legando *primer*-sequenze riconosciute (adattatori) al DNA digerito. Il DNA genomico totale è digerito con due enzimi di restrizione. I nucleotidi adattatori a doppio filamento sono, in genere, legati ai frammenti di DNA fungendo da siti di ancoraggio per i *primer* per l'amplificazione nella PCR. L'impiego di *primer* complementari all'adattatore ed alla sequenza dei siti di restrizione genera profili di amplificazione ceppo-specifici.

Queste tecniche permettono l'analisi di specie singole, isolati o ceppi a seguito dell'accrescimento, ma non consentono di discriminare contestualmente popolazioni di colture lattiche miste o batteri presenti in concentrazioni molto basse, difficilmente riproducibili.

A tal fine possono essere impiegate tecniche molecolari *culture-independent*, tra cui l'impiego di tecniche di *Probing* (impiego di sonde) e le tecniche PCR-DGGE e PCR-TGGE. Le tecniche di *Probing* sono basate sull'ibridazione di oligonucleotidi disegnati sulla base di specifiche sequenze del DNA batterico. Le sonde sono marcate con sostanze radioattive o fluorescenti per rilevare l'avvenuta ibridazione con la regione di DNA *target*. Le sonde marcate possono essere impiegate in numerosi saggi inclusi saggi su colonia, *dotblot* e ibridazione *in situ*. La tecnica più diffusa è la FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) che impiega sonde marcate a fluorescenza per la rilevazione al microscopio a fluorescenza dei batteri marcati.

L'elettroforesi in gel a gradiente denaturante (*DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) analizza i segmenti dei geni dell'unità 16S dell'RNA ribosomiale, amplificati mediante PCR. Mediante analisi DGGE la doppia elica di DNA è denaturata in un gradiente denaturante e crescente di urea e formamide a temperature elevate. I frammenti di DNA si separano, durante la corsa elettroforetica, per effetto dell'aumento del gradiente denaturante, da frammenti a doppio filamento (*double stranded DNA - dsDNA*) a parziali singoli filamenti (*single stranded DNA - ssDNA*) (**Figura 1.2**). La denaturazione dei filamenti non è uniforme, ma è correlata alla sequenza e al contenuto in GC (Ercolini, 2004). Ne risulta un profilo che riflette il diverso comportamento di fusione delle diverse sequenze. La successiva identificazione di specifici gruppi batterici o di specie presenti nel campione, può essere ottenuta per sequenziamento delle bande asportate o mediante ibridazione delle stesse utilizzando sonde filogenetiche (Ercolini, 2004).

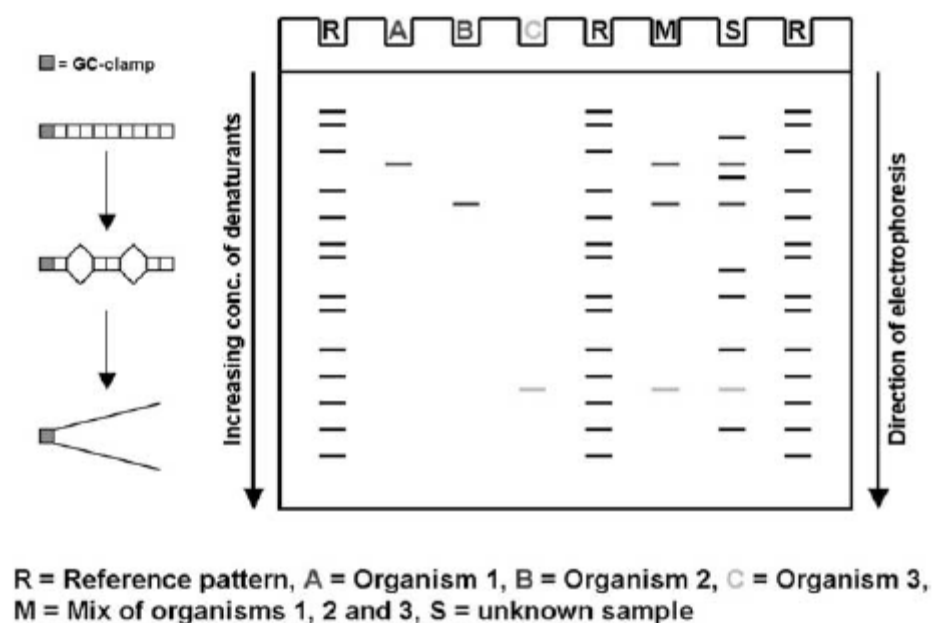


Figura 1.2. Descrizione del metodo di analisi DGGE (Temmermann, 2004)

Alternativamente la tecnica TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*) prevede la separazione di frammenti di DNA mediante corsa elettroforetica per effetto dell'aumento della temperatura.

I metodi di *fingerprinting* genetici sono risultati utili nell'identificazione e classificazione tassonomica di LAB ma il risultato non è sempre ripetibile (Randazzo *et al.*, 2009). I metodi basati sulla sequenza del segmento 16S dell'RNA ribosomiale (amplificazione PCR o sondaggio degli acidi nucleici) rappresentano una valida soluzione per una rapida ed affidabile identificazione dei LAB; tali tecniche possono quindi risultare utili per assicurare la qualità di ceppi lattici starter e ceppi probiotici utilizzati nei prodotti alimentari e per il monitoraggio nel tempo della loro stabilità genetica ed integrità.

1.3 *Metabolismo e Proprietà Tecnologiche dei batteri lattici in campo lattiero-caseario*

Diverse sono le proprietà metaboliche dei batteri lattici che determinano le caratteristiche qualitative dell'alimento che fermentano. La caratterizzazione tecnologica dei ceppi di interesse alimentare è necessaria al fine di selezionarli per l'impiego in fermentazioni guidate e controllate. La selezione di batteri lattici destinati all'impiego in campo lattiero-caseario prevede l'individuazione di ceppi con caratteristiche peculiari, le principali sono di seguito riportate:

- fermentazione degli zuccheri e potere acidificante, che esprime la prontezza e la rapidità con la quale il ceppo dà luogo alla fermentazione, condizionata principalmente dal metabolismo glucidico;
- produzione di composti aromatici, che include sia la produzione diretta di molecole aromatiche come il diacetile sia la produzione di metaboliti da attività enzimatiche particolari quali proteolisi e lipolisi;
- produzione di esopolisaccaridi, legata alla capacità di sintetizzare polimeri glucidici extracellulari che conferiscono vischiosità ai mezzi;
- produzione di batteriocine, cioè di composti peptidici a basso peso molecolare con proprietà inibenti sia su ceppi della stessa specie ma anche su specie alteranti e/o patogene;
- resistenza a batteriofagi, capacità di resistere ai virus specifici parassiti di batteri lattici.

1.3.1. Fermentazione degli zuccheri e potere acidificante

La principale via metabolica nei batteri lattici prevede la completa ossidazione del glucosio; processo noto comunemente come fermentazione.

La fermentazione prevede la formazione di fruttosio 1,6 difosfato diviso in gliceraldeide-3fosfato e diidrossiacetonfosfato, entrambi convertiti in acido piruvico.

L'acido piruvico è ridotto ad acido lattico con l'ossidazione di NADH in NAD⁺ (nicotinammide adenina di nucleotide) e produzione di energia sottoforma di ATP.

L'acido piruvico è un intermedio fondamentale nel processo fermentativo, da cui è possibile ottenere diversi prodotti finali, in base alle fermentazioni batteriche. Nella

fermentazione omolattica l'unico prodotto finale è l'acido lattico ottenuto per riduzione diretta dell'acido piruvico e quindi rigenerazione di NAD^+ . Questa fermentazione è tipica di *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp. e di alcune specie di *Lactobacillus* ed è usata per ottenere vari prodotti lattiero caseari.

Nella fermentazione eterolattica si ha la produzione di altri metaboliti quali anidride carbonica ed etanolo o acido acetico, come riportato in **Figura 1.3** (Salminen *et al.*, 2004).

In base alla presenza di un unico prodotto finale di fermentazione o di più prodotti si distinguono rispettivamente batteri omofermentanti ed eterofermentanti. Gli eterofermentanti utilizzano delle vie alternative di catabolizzazione del glucosio in cui si ha l'ossidazione diretta del glucosio-6 fosfato a acido 6-fosfogluconico e per decarbossilazione e ulteriore ossidazione si ha la sintesi del pentosofosfato. Il pentosofosfato, ad opera dell'enzima chiave fosfochetolasi, è scisso in 3-fosfogliceraldeide e acetilfosfato.

A partire dalla 3-fosfogliceraldeide si ha la stessa sequenza di reazioni della glicolisi e quindi la formazione di acido piruvico che viene ridotto ad acido lattico. L'acetilfosfato per riduzione dà origine all'acetaldeide, ridotta ad etanolo. Questa via metabolica è impiegata da *Leuconostoc* spp e da alcune specie di *Lactobacillus* eterofermentanti (Salminen *et al.*, 2004).

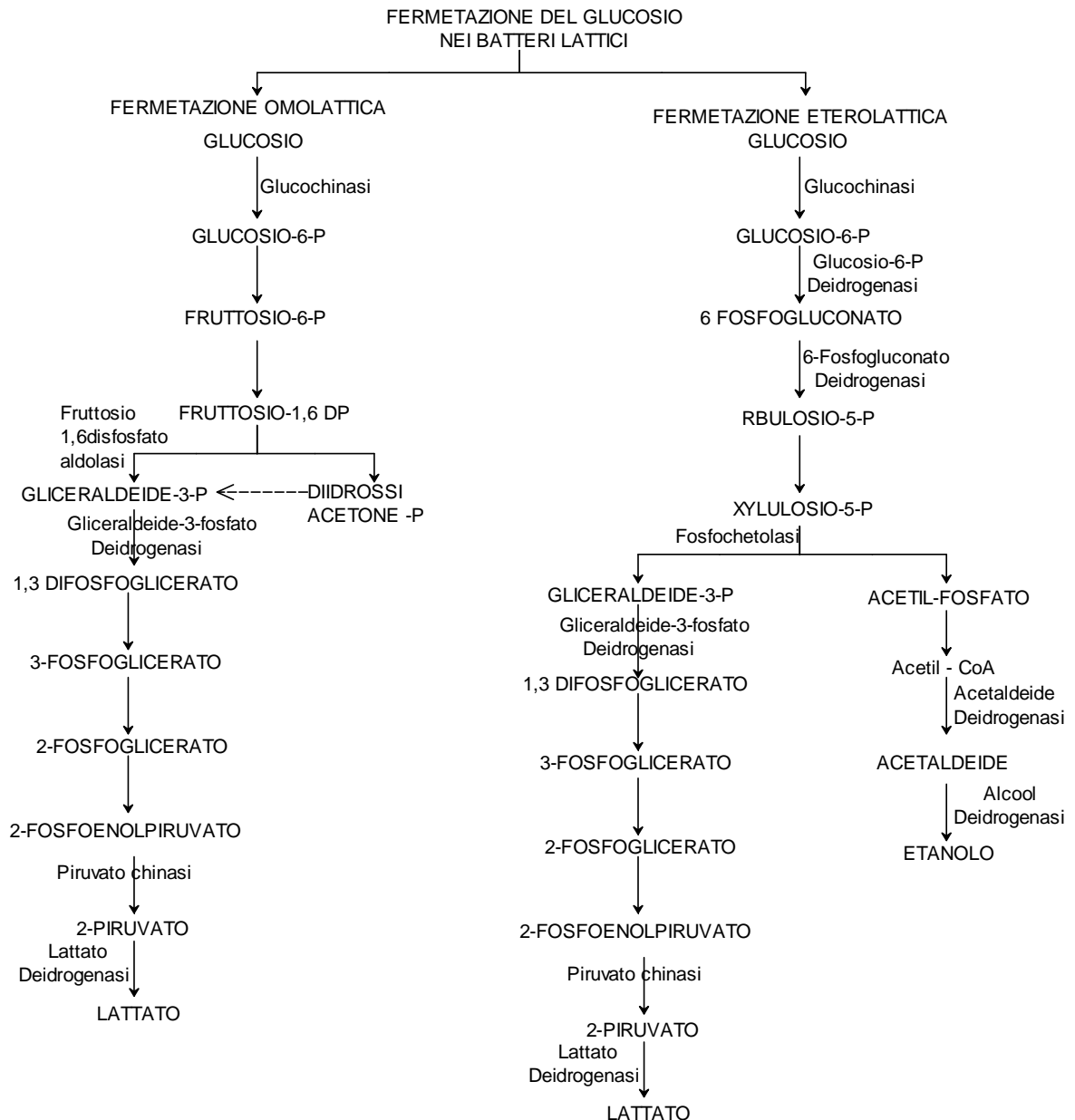


Figura 1.3. Vie metaboliche di fermentazione del glucosio (Salminen *et al.*, 2004).

L'*uptake* degli zuccheri avviene mediante trasporto attivo con consumo di energia. Nei batteri lattici le molecole di mono e disaccaridi possono essere trasportate essenzialmente attraverso due sistemi di trasporto denominati PEP-PTS (Fosfo-Enolpiruvato Fosfostrasferasi) e Sistema Permeasico. La stessa molecola può essere trasportata attraverso il sistema PEP-PTS in una specie batterica e attraverso il Sistema Permeasico in un'altra specie. Analogamente, nella stessa specie batterica

alcuni zuccheri vengono trasportati attraverso il sistema PEP-PTS mentre altri mediante il Sistema Permeasico (Salminen *et al.*, 2004).

Nel sistema PEP-PTS gli zuccheri sono trasportati entro la cellula in forma fosforilata, mentre il sistema permeasico è un simporto. Nel secondo caso lo zucchero trasporta con se un H^+ attraverso una permeasi specifica. Una volta all'interno della cellula, a causa di un cambiamento di conformazione della permeasi, zucchero e H^+ sono rilasciati nel citoplasma.

I batteri utilizzano le fonti di carbonio attraverso sistemi rigorosamente controllati in maniera gerarchica per i quali essi hanno sviluppato meccanismi che governano e coordinano l'assunzione e il metabolismo delle fonti di carbonio. Questo è stato possibile per la presenza di sistemi CCR (*Carbon Catabolite Repression*) che intervengono prevalentemente a livello trascrizionale. I sistemi CCR permettono ai batteri di percepire il proprio livello nutrizionale permettendo di controllare le attività cataboliche. Tra i sistemi CCR, il controllo della trascrizione e il controllo delle proteine denominato induzione per esclusione/espulsione sono quelli principali. Entrambi i sistemi si basano sui componenti del sistema fosfotransferasico (PTS). I sistemi di *uptake* cellulare degli zuccheri sono principalmente PTS-dipendenti. Le HPr chinasi/fosfatasi (HPrK/P) (facenti parte del sistema PTS) e la proteina CcpA (*Catabolite control protein*) sono coinvolti nella valutazione dello stato fisiologico della cellula e nella regolazione del metabolismo delle fonti di carbonio. La fosforilazione di HPr è a carico del PEP cellulare, responsabile del trasporto intracellulare di mono e disaccaridi, ed è catalizzata da enzimi fosfotransferasici (EI). Quando le molecole di mono e disaccaridi vengono metabolizzate, il livello cellulare

di intermedi glicolitici (fruttosio1,6-difosfato) si alza e stimola l'attività di HPrK/P che aumenta a sua volta il livello di HPr fosforilato. La fosforilazione di Hpr (a livello di serina HPr-ser-P) non consente ulteriori reazioni di fosforilazione e quindi non è più disponibile per EI. Di conseguenza HPr-ser-P non può più intervenire nel sistema PTS per introdurre nella cellula ulteriori molecole di zuccheri. Al contrario quando il livello cellulare di intermedi glicolitici decresce (basso livello energetico) l'enzima bi-funzionale HPr chinasi/fosfatasi catalizza la reazione di defosforilazione di HPr-ser-P rendendo la molecola disponibile alla fosforilazione di EI che genera HPr-his-P a sua volta disponibile per il trasporto di nuove molecole di zuccheri.

Streptococcus thermophilus è una specie omofermentante che possiede delle caratteristiche particolari in merito al sistema CCR e all'assunzione del lattosio. *S. thermophilus* preferisce il lattosio al glucosio come fonte di carbonio, rispetto ad altri batteri lattici, e utilizza un sistema di simporto per il suo trasporto; *S. thermophilus* incorpora lattosio mediante un sistema di simporto permeasico (LacS) lattosio/H⁺ e/o lattosio/galattosio. In quest'ultimo caso, il lattosio è trasferito nella cellula secondo gradiente e contemporaneamente viene espulso galattosio; è quindi deducibile che *S. thermophilus* utilizza solo il glucosio che compone il lattosio per la glicolisi. La fermentazione in substrato contenente lattosio è controllata da un sistema CCR mediato da CcpA che interviene positivamente a livello glicolitico sul gene codificante la lattato-deidrogenasi. CcpA interviene anche livello trascrizionale su LacS (Lattosio Permeasi) che viene represso quando le cellule crescono in presenza di lattosio. L'aumento del numero di permeasi a livello di membrana fa aumentare il flusso di lattosio cellulare. Un ulteriore livello di controllo a carico di LacS è stato

recentemente individuato: la presenza di un dominio proteico simile a quello di un enzima del sistema PTS in LacS, rende quest'ultima molecola soggetta a fosforilazione per opera di Hpr-his-P. LacS fosforilato diviene più efficiente nella reazione di trasporto/scambio lattosio/galattosio. In condizioni di crescita stazionaria, il rapporto Hpr-his-P/Hpr-ser-P diventa favorevole per Hpr-his-P, favorendo l'aumento della velocità di trasporto del lattosio che compensa la sua bassa concentrazione nel mezzo colturale (Salminen *et al.*, 2004).

La regolazione dei sistemi di *uptake* degli zuccheri è fondamentale nella comprensione del comportamento dei batteri durante la fermentazione e la conduzione dei processi tecnologici.

I batteri lattici, a seconda della specie, producono a seguito della fermentazione degli zuccheri prevalentemente acido lattico ed in misura minore, acido acetico, acido formico, etc. Questi acidi organici sono responsabili dell'abbassamento del pH negli alimenti, rendendo l'ambiente ostile allo sviluppo di microrganismi indesiderati. L'acidificazione, inoltre, contribuisce alla definizione di altre caratteristiche importanti quali le qualità sensoriali e strutturali degli alimenti fermentati.

Il potere acidificante è inteso principalmente come velocità di acidificazione, la variazione del pH nel tempo, che varia a seconda della specie e del ceppo, fattore essenziale nella selezione dei microrganismi idonei a condurre un determinato processo fermentativo (De Vuyst, 2000).

Nei processi lattiero-caseari, la velocità di acidificazione rappresenta un parametro molto importante sia sotto l'aspetto tecnologico sia sotto l'aspetto economico.

Dal punto di vista tecnologico, l'abbassamento del pH è fondamentale durante la fase di coagulazione nella caseificazione; infatti l'acidificazione operata dai batteri lattici nella fase iniziale facilita l'azione degli enzimi del caglio nella formazione del coagulo, determinando la destabilizzazione della carica superficiale delle micelle caseiniche, già a pH di poco inferiori a quelli del latte; a livelli bassi di pH migliora l'azione degli enzimi del caglio che hanno un optimum di attività a pH 5.5.

Per quanto riguarda la preparazione di lattici fermentati (yogurt e similari) l'acidificazione del latte è il fattore più importante per la corretta riuscita del prodotto.

In questo caso, poiché le specie di batteri lattici coinvolte (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) sono termofile, il processo di fermentazione è condotto a temperature comprese tra 37 e 45°C. Il processo di fermentazione a queste temperature comporta costi non trascurabili (riscaldamento di centinaia di litri di latte) e di conseguenza il potere acidificante nella fermentazione è un importante parametro tecnologico per la selezione e dei ceppi batterici.

Numerosi altri fattori influenzano il potere acidificante quali la capacità di fermentare il lattosio, l'attività ureasica, l'attività proteasica e l'attività dell'arginina deaminasi.

1.3.2 Produzione di composti aromatici

I batteri lattici contribuiscono alla determinazione delle caratteristiche sensoriali degli alimenti mediante la produzione di composti aromatici o loro precursori.

Nei prodotti lattiero-caseari la fermentazione lattica contribuisce alla formazione dell'aroma sia per la produzione di acido lattico sia per la produzione di composti

aromatici, principalmente diacetile, acetoina, acetaldeide ed altri metaboliti quali anidride carbonica ed etanolo (Smit *et al.*, 2005).

Tra i principali composti aromatici prodotti vi è il diacetile; le specie responsabili della produzione di importanti quantità di diacetile sono *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* e *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* attraverso il metabolismo del citrato. I geni codificanti per gli enzimi chiave della sintesi del diacetile sono localizzati a livello di plasmide (Smit *et al.*, 2005).

Il citrato è trasportato mediante una citrato permeasi dentro la cellula batterica. Il citrato è convertito in ossalacetato e acetato, mediante citrato liasi; l'ossalacetato è decarbossilato a piruvato e anidride carbonica mediante l'ossalato decarbossilasi. Il piruvato è condensato con acetaldeide attiva per ottenere un intermedio instabile il 2-acetolattato. L' α -acetolattato può essere decarbossilato portando alla formazione di acetoino, che in presenza di ossigeno forma diacetile, oppure ridotto a diacetile mediante la diacetile sintasi, come riportato in **Figura 1.4**.

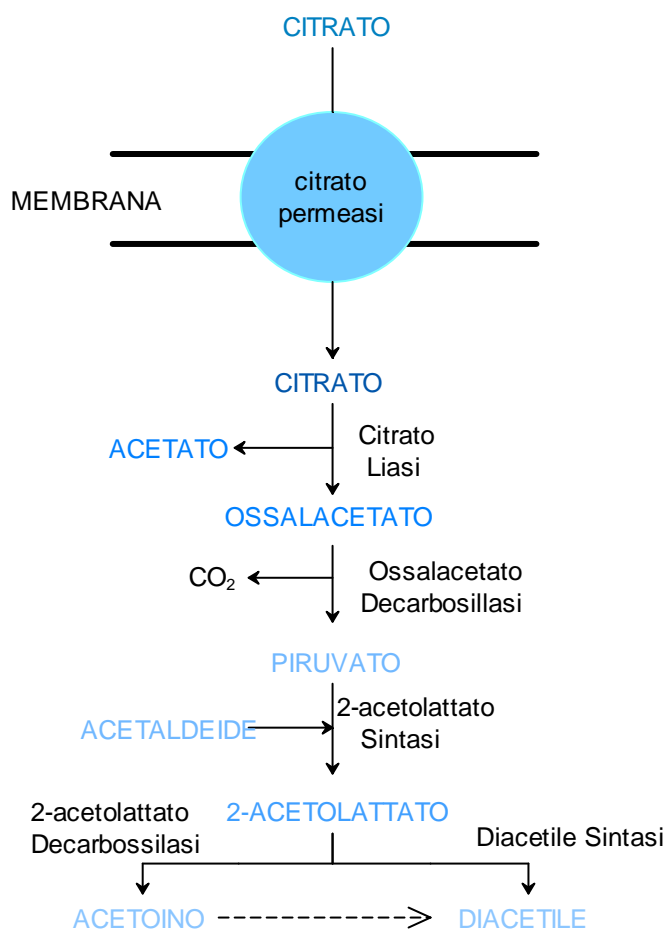


Figura 1.4. Via metabolica del citrato.

La produzione di diacetile è fondamentale nella determinazione dell'aroma di diversi formaggi e in particolare del burro.

Il tipico aroma dello yogurt è determinato dall'attività metabolica dei batteri lattici impiegati nella produzione che producono numerosi composti organici.

Importante ruolo tecnologico nei lattici fermentati è determinato dalla produzione di acetaldeide da parte dei batteri lattici impiegati nella fermentazione, *S. thermophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Il contenuto di aldeide acetica nello yogurt può risultare estremamente variabile da 5 a 20 mg/l in base alla capacità metaboliche dei ceppi impiegati (Beshcova et al, 1998).

La produzione di aldeide acetica, secondo molti autori, è attribuita principalmente a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* mentre minore è il contributo di *S. thermophilus*. Durante la fermentazione l'acetaldeide può essere prodotta attraverso diverse vie metaboliche. Questo metabolita può derivare dal metabolismo del lattosio sia per via diretta per decarbossilazione del piruvato, mediante l'attività degli enzimi piruvato decarbossilasi e piruvato ossidasi, sia per via indiretta quale metabolita intermedio ottenuto dall'attività degli enzimi piruvato deidrogenasi e piruvato formato liasi.

L'acetaldeide può essere prodotta per degradazione della timidina mediante l'enzima deossiriboaldolasi. Infine l'aldeide acetica può essere prodotta dal metabolismo degli aminoacidi, la treonina è convertita in acetaldeide e glicina mediante l'enzima treonina aldolasi. Quest'ultima via metabolica rappresenta la via metabolica principale per la produzione di acetaldeide, con quantità di acetaldeide prodotta maggiori nella specie *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ma (Chaves *et al.*, 2002).

Altri processi biochimici sono determinanti nella produzione di aroma dai batteri lattici e dipendono dalle attività enzimatiche di proteolisi e lipolisi.

La proteolisi e le sue reazioni secondarie svolgono un ruolo importante nei formaggi stagionati, rendendo l'idrolisi della caseina ed i suoi rapporti con lo sviluppo del sapore, un'area d'intenso interesse per la ricerca da decenni.

Il contributo delle proteinasi e delle peptidasi dei LAB interviene su proteine già parzialmente degradate, trasformandole in peptidi ed aminoacidi liberi, solubili in acqua. La proteolisi delle micelle caseiniche influenza l'aroma nei formaggi. La proteolisi primaria determina la rottura della rete di caseine modificando la *texture* del formaggio, processo attuato dal correndo di proteasi presente nel latte. I peptidi a

basso peso molecolare prodotti in queste reazioni, influenzano direttamente il sapore conferendo gusto dolce, amaro o maltato. I peptidi sono ulteriormente digeriti con il rilascio di amminoacidi liberi che influenzano direttamente l'aroma del formaggio.

Il contributo del sistema enzimatico di proteasi e peptidasi batteriche è fondamentale per la determinazione delle proprietà organolettiche nei prodotti lattiero-caseari (El-Ghaish *et al.*, 2010). L'attività proteolitica ha inizio con la degradazione delle proteine in peptidi per mezzo di un sistema enzimatico extra-cellulare costituito da CEP (*Cell Envelope Proteinase*). Numerose CEP sono state caratterizzate nei LAB impiegati nel settore lattiero caseario (Savijoki *et al.*, 2006). Queste sono biosintetizzate in forma di preproteasi, attivate solo dopo secrezione dalla cellula. I peptidi sono traslocati entro la cellula per mezzo di un sistema di trasporto di oligopeptidi (*Opp – Oligopeptide transport system*). Il sistema di trasporto è costituito da proteine della superfamiglia *ATP-binding cassette* (ABC). Le amminopeptidasi intracellulari degradano i peptidi in aminoacidi.

L'attività proteolitica dei batteri lattici può essere valutata per mezzo di tecniche molecolari e analisi chimiche in grado di verificare l'efficienza del sistema enzimatico sopra descritto. L'analisi *SDS-PAGE* consente di evidenziare la degradazione delle proteine in peptidi. Il profilo di degradazione delle proteine è rilevato mediante elettroforesi in presenza del denaturante SDS in gel di poliacrilammide. L'analisi cromatografica HPLC rileva gli aminoacidi liberati al termine del processo di degradazione enzimatica (El-Gaish *et al.*, 2010).

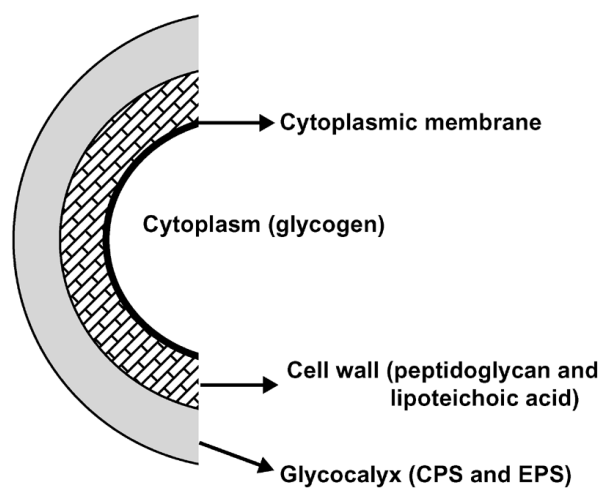
I sistemi lipasi / esterasi dei batteri lattici offrono un contributo sicuramente inferiore dei sistemi proteolitici. I batteri del genere *Lactococcus* spp. risultano debolmente

lipolitici, ma i lattococchi possono essere responsabili della liberazione di elevate quantità di acidi grassi, quando presenti in elevate cariche o in stagionature prolungate. Sono state studiate le lipasi / esterasi dei ceppi di *Lactococcus* localizzate all'interno della cellula (Smit *et al.*, 2005) così come quelle dei lattobacilli omofermentanti obbligati utilizzati come starter.

1.3.3 Produzione di polisaccaridi

La capacità di produrre polisaccaridi è comune a molti batteri. Questi composti possono essere adesi alla parete batterica oppure liberi nel *medium* colturale come esopolisaccaridi (EPS) come mostrato in Figura 1.5 (Ruas-Mediedo & de los Reyes-Gavilán, 2005).

Gram-positive



Gram-negative

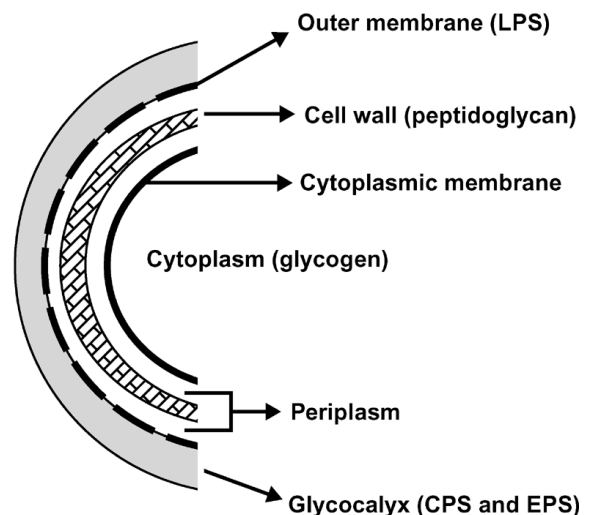


Figura 1.5. Localizzazione dei polisaccaridi (Ruas Madieno, 2002)

La produzione di esopolisaccaridi garantisce ai batteri una fonte di carboidrati non utilizzabile da altri microrganismi e una sorta di protezione dall'ambiente esterno.

Gli esopolisaccaridi sono classificabili in omopolisaccaridi, costituiti da monosaccaridi uguali, ed eteropolisaccaridi, costituiti da monosaccaridi differenti

(Ruas-Madieno *et al.*, 2002). Gli omopolisaccaridi possono essere classificati in quattro gruppi principali:

- α -D-glucani che includono destrani, mutani e alternani prodotti da *Leuconostoc* e *Streptococcus*;
- β -D-glucani, polimeri prodotti da *Streptococcus* e *Pediococcus*
- Fruttani, che includono levani e polimeri inulina-simili prodotti da *Streptococcus*;
- Poligalattani, prodotti da *Lactococcus*.

Gli omopolisaccaridi sono molecole ceppo-specifiche in relazione al grado di polimerizzazione, di ramificazione e dei siti di legame. Queste molecole presentano elevato peso molecolare per l'elevato livello di aggregazione in soluzione acquosa.

Gli eteropolisaccaridi sono prodotti da diversi batteri lattici mesofili e termofili costituiti da unità ripetute, risultanti dalla combinazione di D-glucosio, L-ramnosio, N-acetilglucosammina e N-acetilgalattosammina; possono essere presenti anche componenti non glucidici come fosfati, acetile e glicerolo (Ruas-Madieno *et al.*, 2002).

La biosintesi degli EPS è regolata da numerosi *cluster* di geni responsabili della sintesi di enzimi coinvolti nella polimerizzazione, trasformazione ed esportazione del polimero (De Vuyst & Degeest, 1999).

Gli esopolisaccaridi secreti dai batteri lattici hanno un importante ruolo tecnologico e risultano anche funzionali per la salute umana (Ruas-Madieno *et al.*, 2002).

Gli EPS migliorano le proprietà reologiche del prodotto fermentato, agiscono da stabilizzanti e aumentano la capacità di idratazione della matrice. Tuttavia la

funzionalità degli EPS dipende dalla loro struttura, dalla composizione e dall'interazione con altre molecole quali principalmente ioni e proteine (Ruas-Madieno *et al.*, 2002).

Per queste ragioni le proprietà reologiche degli EPS purificati possono differire da quelle degli EPS prodotti nella matrice alimentare. Le più importanti proprietà reologiche degli EPS sono: la viscosità, intesa come capacità di resistere alla deformazione, ad esempio la fluidità in yogurt e l'elasticità, intesa come la capacità di tornare allo stato iniziale dopo la deformazione, che corrisponde ad esempio alla compattezza di uno yogurt (Duboc & Mollet, 2001).

Numerose tecniche sono state proposte per la rilevazione degli EPS. Alcune tecniche qualitative consistono nell'accrescimento di batteri lattici in substrato sintetico sia solido sia liquido; le colonie dei batteri produttori di EPS in substrato sintetico presentano aspetto viscoso, *ropy* o *slime*, mentre le colture dei batteri produttori di EPS sviluppate in substrato liquido lo rendono viscoso e filante.

Gli EPS, in seguito ad isolamento e purificazione dal substrato, possono essere quantificati mediante tecniche spettrofotometriche o tecniche cromatografiche abbinate alla misura dell'indice di rifrazione. L'analisi cromatografica è utile per determinare la struttura primaria degli EPS e per identificare la natura dei singoli monomeri (Ruas-Mediedo & de los Reyes-Gavilán, 2005).

La selezione accurata di ceppi batterici e il monitoraggio durante le fasi del processo di trasformazione sono necessari per controllare gli effetti del metabolismo batterico sul processo produttivo (De Vuyst, 2000).

1.3.4 Produzione di batteriocine

Le batteriocine sono designate come sostanze di origine batterica capaci di inibire, anche a basse concentrazioni, la crescita di batteri filogeneticamente correlati. La loro classificazione è correlata a vari aspetti: specie batteriche di produzione, proprietà chimico-fisiche, dimensioni molecolari, spettro di azione, modalità di azione.

Le batteriocine sono polipeptidi secreti a livello ribosomiale con il ruolo primario di assicurare competizione per spazio e per nutrienti causando la morte di microrganismi *competitor*. I geni codificanti per le batteriocine sono codificati a livello di plasmidi a differenza di altre sostanze antibiotiche derivanti dal metabolismo secondario.

Alcuni geni chiave coinvolti nella sintesi sono localizzati in siti diversi: a livello plasmidiale nel caso di pediocinine prodotte da *Pediococcus* spp. e lattocine prodotte da *Lactococcus lactis*; alcuni sono localizzati a livello cromosomiale come nel caso di plantaracina A e sakacina 674; alcuni correlati a trasposoni come per la nisina prodotta da *L. lactis*.

La struttura dei geni coinvolti nella sintesi di molte batteriocine è stata bene determinata, i geni sono organizzati in operoni coinvolti nella sintesi e nel trasporto attraverso la membrana. Le batteriocine sono trasferite all'esterno della cellula in forma inattiva caratterizzata da un propeptide con una testa N-terminale e C-terminale. A seguito della secrezione le molecole sono trasformate in forma attiva dopo il taglio enzimatico di specifiche peptidasi (De Souza *et al.*, 2005).

Il ruolo delle batteriocine prodotte da batteri lattici può diventare cruciale nella moderna gestione della produzione e protezione degli alimenti. Infatti sia la

legislazione in campo alimentare sia le esigenze dei consumatori inducono l'industria alimentare alla produzione di alimenti sicuri e a ridotto contenuto di sostanze chimiche conservanti.

Nuove prospettive nella conservazione degli alimenti sono rappresentate dall'impiego di metodiche integrate denominato "Sistema Antimicrobico Naturale" che include l'impiego di prodotti di origine vegetale, animale e microbica con proprietà antimicrobiche per la protezione degli alimenti (de Souza *et al.*, 2005).

Le sostanze antimicrobiche di origine microbica possono contribuire al miglioramento della qualità dell'alimento. Numerosi sono, i batteri lattici di interesse lattiero-caseario che producono sostanze antimicrobiche.

Table 1 - Bacteriocins of lactic acid bacteria and their main characteristics

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action	Characteristics
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram-positive bacteria	Class I lantibiotic, 3,5 kDa, 34 amino-acids, commercially available
	Lacticin 3147	<i>Clostridium</i> sp <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Propionibacterium acne</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Class I two-component lantibiotic, 4,2 kDa, heat-stable, active under acid and physiological pH
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactococcin B	<i>Lactobacillus</i>	Class II bacteriocin, approx. 5 kDa, narrow spectrum of action
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocin CH5	Gram-positive bacteria <i>Lactobacillus</i>	Class II bacteriocin, forms high molecular weight aggregates
	Lactacin F	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Class II bacteriocin, 6,3 kDa, 57 amino-acids, heat-stable at 121° C for 15 minutes
	Lactacin B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Class III bacteriocin, 6,3 kDa, heat-stable, detected only in cultures maintained between pH 5.0 to 6.0
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Class II bacteriocin, 4,8 kDa, 50 amino-acids, narrow spectrum of activity
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocin 705	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Class II two-component bacteriocin (33 amino-acids each component), 3,4 kDa.
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocin A	<i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 3,9 kDa, 37 amino-acids, stable at low pH values, even after heating (100° C for 20 min)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericin Y105	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 3,8 kDa, 37 amino-acid residues, heat stable (60° C for 120 min at pH 4.5)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin F	Gram-positive bacteria	Class II bacteriocin, 4,5 kDa, sensitive to proteolytic enzymes, resistant to heat and organic solvents, active under a wide range of pH
	Pediocin PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 4,6 kDa, 44 amino-acids,
	Pediocin AcH	Gram-positive and Gram-negative bacteria under stressing situations	Class II bacteriocin, 4,6 kDa, 44 amino-acids, broad spectrum of action
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocin A	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Listeria</i> <i>Clostridium</i>	Class II bacteriocin, 2,7 kDa, sensitive to proteolytic enzymes and heat stable (10 min 100° C)
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocin A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pediococcus</i>	Class II bacteriocin, 4,8 kDa, 47 amino-acid residues, heat-stable
<i>Lactobacillus sake</i>	Lactocin S	<i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i>	Class I bacteriocin, 3,7 kDa, active between pH of 4,5 and 7,5
	Sakacin P	<i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 4,4 kDa, heat-stable
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacin A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Class II bacteriocin, 4,3 kDa
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticin J	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Class III bacteriocin, 37 kDa, narrow spectrum of action, sensitive to proteolytic enzymes, reduction of activity after 100° C for 30 min

Tabella 1.1. Tipologie di batteriocine prodotte da batteri lattici (de Souza *et al.*, 2005).

1.3.5 Resistenza fagica

I batteriofagi sono virus in grado di parassitizzare specificamente le cellule batteriche, inclusi i batteri lattici, conducendole alla morte.

La struttura morfologica tipica dei batteriofagi è di tipo allungato ed include diversi componenti: una testa a struttura icosaedrica della capsida, un collare, una coda costituita da una struttura tubulare cava avvolta da una guaina contrattile, una piastra esagonale basale a cui sono connesse sei lunghe fibre caudali.

Le dimensioni dei batteriofagi sono variabili; alcuni possono essere molto piccoli e contenere 5 o 6 geni, altri molto grandi e contenerne più di 100.

Le relazioni tra batteriofago e cellula batterica è sia specie-specifica sia soprattutto ceppo-specifica.

L'azione dei batteriofagi è correlata all'attuazione del proprio ciclo vitale all'interno della cellula ospite. Gli *step* attuati durante il ciclo vitale sono comuni a tutti i batteriofagi e includono: adesione alla cellula batterica, separazione dell'acido nucleico dalle proteine capsidiche e suo trasferimento nella cellula batterica, espressione e replicazione dell'acido nucleico, produzione del capsida, assemblaggio del batteriofago, rilascio dei batteriofagi e trasmissione dei batteriofagi.

L'adsorbimento del batteriofago avviene in due stadi: un primo stadio reversibile di riconoscimento e contatto del batteriofago sulla superficie cellulare, un secondo stadio irreversibile in cui le fibre caudali si legano al recettore della cellula. A seguito dell'attacco la parete cellulare è resa penetrabile mediante l'azione di enzimi litici specifici contenuti nel capsida (Weinbauer, 2004).

A questo punto l'acido nucleico è trasferito dentro la cellula, mentre il capsido rimane all'esterno della cellula. A seguito dell'iniezione il materiale genetico può sia essere integrato nel genoma ospite sia rimanere libero nel citoplasma.

Il genoma del batteriofago entro la cellula è funzionale ai seguenti step: espressione di geni specifici per dar luogo alla replicazione del genoma fagico, espressione genica per la formazione del capsido e delle strutture fagiche ed infine espressione genica per all'assemblaggio del genoma nel capsido.

La fase di latenza dell'infezione fagica è la fase in cui non sono individuabili nuovi batteriofagi liberi ed include la parte del ciclo vitale che va dall'adsorbimento alla cellula ospite alla lisi cellulare. La fase esponenziale di sviluppo è la fase in cui nuovi batteriofagi sono liberati a seguito della lisi cellulare. Il numero di batteriofagi liberati per ogni ciclo litico è noto come *burst size* del batteriofago (Weinbauer, 2004).

I batteriofagi presentano due principali cicli vitali: litico e lisogeno. Nel ciclo litico i fagi virulenti impiegano direttamente le strutture della cellula ospite per la produzione di nuovi fagi, come descritto. Nel ciclo lisogenico il genoma del batteriofago (detto temperato e lisogenico) rimane nella cellula ospite in uno stato di dormienza, stadio di profago, legato al genoma ospite, con cui viene replicato fino all'induzione del ciclo litico (Weinbauer, 2004).

Il ciclo litico ed il ciclo lisogeno sono riportati in **Figura 1.6**.

I principali meccanismi di resistenza fagica sono correlati alla limitazione dell'attuazione del ciclo litico: inibizione dell'adsorbimento, inibizione della penetrazione del DNA, Restrizione-Modificazione (R-M) e Infezione Abortiva (Abi). (Pridmore *et al.*, 2000).

La genomica dei batteriofagi in grado di attaccare lattococchi e streptococchi di interesse lattiero-caseario è stata oggetto di studi approfonditi (Desiere *et al.*, 2002).

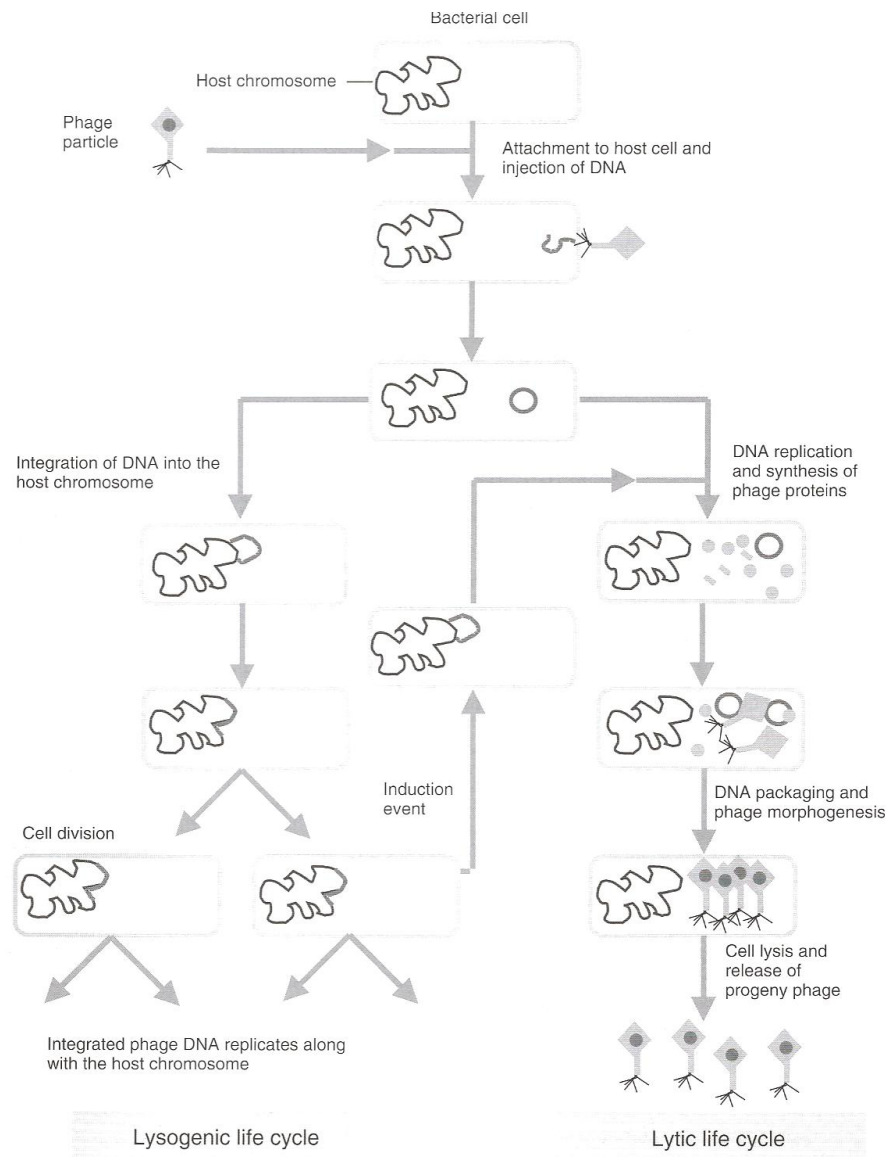


Figura 1.6. Ciclo litico e ciclo lisogeno di batteriofagi (Fox, 2004).

L'elevato tasso di riproduzione di microrganismi nel latte durante i processi lattiero-caseari espone le cellule batteriche a un elevato rischio di infezione da batteriofagi (Fox, 2004).

Durante la produzione lattiero-casearia la corretta conduzione della fermentazione è assicurata da un'attività pressoché costante dei batteri lattici, un cambiamento

nell'attività in termini di rallentamento della velocità di acidificazione può indicare un problema di infezione fagica.

La lisi causata da batteriofagi di batteri lattici impiegati come starter durante la produzione può determinare nei casi più gravi un blocco della fermentazione lattica, compromettendo la qualità dell'alimento e in alcuni casi la produzione stessa.

Le infezioni fagiche rappresentano una problematica rilevante nell'industria lattiero-casearia, in alcuni casi inevitabile, legata ai diversi aspetti di gestione dei processi tecnologici stessi: la contaminazione fagica è spesso già presente nella materia prima in quanto non si opera su substrato sterile (latte pastorizzato); i processi produttivi sono attuati sempre più secondo tempi e schemi molto stretti e rigorosi; l'impiego di colture molto specializzate a ridotta variabilità; la persistenza dei batteriofagi nell'ambiente di lavorazione e nei residui di lavorazione (Salminen *et al.*, 2004).

La prevenzione dell'infezione fagica è risultata il modo più efficace per limitare i problemi legati all'infezione fagica. In primo luogo l'accurata sanificazione degli ambienti, dei macchinari e degli strumenti che vengono a contatto con il latte. Il tipo starter impiegato è fondamentale nella prevenzione dell'infezione fagica, in particolare, negli starter naturali, quali latte-innesti o siero-innesti, la presenza di una popolazione microbica complessa riduce la sensibilità fagica rispetto alle colture starter selezionate. Ciò nonostante la composizione non ben definita e costante di uno starter naturale non assicura totalmente dalla protezione di un'infezione fagica.

Le colture starter selezionate possono assicurare la protezione da infezione fagica se costituite da più ceppi microbici con diversa sensibilità fagica e se sono inserite in corretto programma di rotazione delle colture (rotazione fagica).

La rotazione fagica è attualmente la tecnica che maggiormente consente di prevenire il problema fagi nell'industria lattiero-casearia mantenendo livelli contenuti di infezione fagica.

L'isolamento dei fagi e lo studio delle loro caratteristiche è quindi fondamentale per poter approntare sistemi di difesa e gestire l'uso delle colture starter selezionate.

Il conteggio dei batteriofagi nelle matrici alimentari si effettua abitualmente in terreno agarizzato sulla base del numero di placche di lisi formatesi su uno strato di cellule sensibili.

1.4 Batteri lattici in campo lattiero-caseario

1.4.1 Batteri lattici e produzione di formaggi

Tradizionalmente i formaggi sono prodotti utilizzando inconsapevolmente la microflora presente nel latte crudo per realizzare il processo di caseificazione e di maturazione, spesso con conseguente presenza di numerosi difetti legati alla fermentazione incontrollata dei batteri presenti, di qui la necessità di “selezionare” l'innesto o starter (Randazzo *et al.*, 2009).

Si distinguono sia latte-innesti, colture spontanee di batteri lattici derivanti dal latte, sia siero-innesti, colture di batteri lattici accresciute nel siero di fine caseificazione.

I latte-innesti sono impiegati in piccole produzioni di formaggi tradizionali.

La pressione selettiva usata per la preparazione dell'innesto prevede la termizzazione del latte crudo (62-65°C per 10-15 min) seguito da incubazione a 37-45°C sino al raggiungimento dell'acidità desiderata.

I siero-innesti, invece, vengono preparati incubando, in condizioni selettive e per tempi diversi, una parte di siero restante dalla lavorazione precedente e trovano ad oggi impiego nella produzione di formaggi a pasta dura quali del Parmigiano Reggiano e del Grana Padano, paste filate italiane e formaggi a lunga stagionatura.

Gli starter naturali sono considerati altamente resistenti all'infezione fagica, perché si sono riprodotti in presenza di fagi e questo porta ad una dominanza di ceppi resistenti o tolleranti.

Ma la fluttuazione nella composizione degli starter naturali genera performance variabili e questo non sempre è accettabile nella moderna pratica casearia.

Nella produzione di molti formaggi, gli starter naturali sono sostituiti da starter commerciali, ottenuti a loro volta della specifica selezione di ceppi "naturali".

Gli starter commerciali, sono prodotti in condizioni controllate e vengono distribuiti ai caseifici e impiegati direttamente (inoculo diretto) in caldaia (Parente & Cogan, 2004).

Gli starter ad inoculo diretto sono riprodotti in grosse quantità a partire dalle colture di ottenute in fermentatore, in seguito concentrate (normalmente per centrifugazione) e congelate o congelate e liofilizzate per la conservazione ed il trasporto al caseificio.

Gli starter ad inoculo diretto possono risultare vantaggiosi soprattutto per le aziende che non dispongono di personale specializzato e macchinari specifici per la preparazione dello starter. Inoltre, la propagazione e concentrazione dello starter di un fornitore esterno, riduce la probabilità di contaminazione dello stesso da parte dei fagi provenienti dall'ambiente aziendale.

La produzione del formaggio, così, può avvenire in condizioni ideali d'igiene e di stabilità di *performance*, potendo preliminarmente standardizzare e testare l'inoculo dello starter.

Ma l'uso di starter industriali ha ridotto le diversità tra i prodotti caseari fermentati a causa della limitata disponibilità commerciale di nuove colture starter.

Ad oggi la ricerca è sempre più orientata verso la selezione di potenziali organismi *starter* dal pool di ceppi autoctoni isolati da latte crudo e da formaggi tradizionali e/o artigianali; tra cui i siero-innesti, utilizzati nella produzione di formaggi stagionati, che possono rappresentare una fonte d'isolamento interessante.

Il contributo dei batteri lattici nella produzione di numerosi prodotti lattiero - caseari quali formaggi, latti fermentati, yogurt e burro è molto diversificato.

Nella produzione di formaggi lo starter indirizza il processo di fermentazione, principalmente mediante produzione acido lattico a partire dal lattosio. Durante la fermentazione lattica, la diminuzione del pH influenza diversi aspetti del processo di caseificazione: la coagulazione del latte, la tessitura e la composizione finale della pasta, l'inibizione di specie alteranti.

Inoltre il decremento del pH influisce indirettamente sull'aroma controllando l'attività proteolitica ed influenzando le reazioni biochimiche coinvolte nella formazione di altri composti aromatici.

I batteri lattici usati come starter sono coinvolti anche nella produzione di composti aromatici che definiscono le caratteristiche sensoriali dei prodotti caseari (migliorando aroma e *texture*) e determinano l'identità specifica dei prodotti lattiero-caseari. Lo sviluppo di composti aromatici, può derivare dalla fermentazione di

lattosio e citrato, dalla degradazione di proteine e grasso del latte nonché dal metabolismo degli aminoacidi ed acidi grassi liberi. Il contributo aromatico al prodotto finale dipende da un elevato numero di fattori come, specifiche caratteristiche metaboliche dei ceppi starter, condizioni di fermentazione del latte, tipi di prodotti e composizione, condizioni di maturazione, stoccaggio ecc. Le condizioni acide, il ridotto pH dei prodotti lattiero caseari fermentati insieme alla produzione da parte di alcuni ceppi di metaboliti secondari ad attività inibente (come batteriocine, perossido di idrogeno e diacetile), prevengono la crescita o la sopravvivenza di numerosi batteri patogeni ed alteranti e assicurano la qualità igienico sanitaria dell'alimento.

Generalmente i LAB sono capaci di produrre esopolisaccaridi che possono migliorare le caratteristiche di tessitura in alcuni prodotti caseari

La classificazione delle colture starter, può essere fatta in base alla loro funzione, alla loro temperatura di crescita ed alla loro composizione.

Le colture starter, in base alla temperatura d'incubazione e di lavorazione del prodotto nel quale vengono introdotte, possono essere mesofile o termofile. Le colture mesofile crescono e producono acido lattico ad una temperatura ottimale attorno a 30°C pur se possono resistere ad una temperatura massima di fermentazione di 38-40°C. Le specie più usate di LAB mesofili sono: *Lactococcus lactis* subsp *lactis*, *L. lactis* subsp *lactis* biovar *diacetylactis*, *L. lactis* subsp *cremoris* e *Leuconostoc lactis*.

Le colture mesofile possono essere classificate in base alla fermentazione del citrato come:

-starter citrato negativi (*L. lactis* subsp. *lactis* e *cremoris*)

-starter citrato positivi (*Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*, *L. lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*).

Le colture termofile invece, hanno una temperatura ottimale di crescita attorno a 42°C. Le specie più usate sono: *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus helveticus*. Possono essere usate colture mesofile e termofile in associazione per produrre alcuni tipi di prodotti (Parente & Cogan, 2004).

Tra i microrganismi non starter, un ruolo importante nella fase di maturazione è riconosciuto ad alcune specie di batteri lattici mesofili, indicati come “Non Starter Lactic Acid Bacteria” o “NSLAB”. Specie quali *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus* spp. sono considerate NSLAB. Queste specie possono essere naturalmente presenti nel latte e nell’ambiente di produzione e maturazione o essere aggiunte insieme alla coltura starter.

Diverse specie sono riconosciute appartenenti alla microflora secondaria e possono avere una distribuzione nel tempo variabile. Questo dipende dalla capacità di resistere alle temperature di lavorazione, capacità di resistere a pH molto bassi e in condizioni di salinità elevate.

Il ruolo dei NSLAB può risultare controverso perché in alcuni casi si possono considerare batteri indesiderati mentre spesso possono contribuire allo sviluppo delle caratteristiche sensoriali per la capacità di produrre metaboliti secondari, e batteriocine in grado di inibire di batteri patogeni (Giraffa *et al.*, 2003).

1.4.2 Batteri lattici e produzione di yogurt

I prodotti a base di latte fermentato oltre lo yogurt includono una numerosa varietà di prodotti commerciali diffusi in tutto il mondo e con caratteristiche molto differenti tra loro. Le peculiarità del prodotto finito dipendono da diversi aspetti produttivi tra cui principalmente la composizione del substrato impiegato per la fermentazione, gli aspetti tecnologici di conduzione della fermentazione e lo starter impiegato nella fermentazione (Fox, 2004).

La composizione del latte è essenziale nella definizione delle caratteristiche dello yogurt. Anche il trattamento termico a cui il latte viene sottoposto e l'aggiunta di sostanze al latte risultano determinanti nella definizione del prodotto finale.

Nel processo produttivo tradizionale dello yogurt è impiegato solo latte concentrato, ottenuto prevalentemente per evaporazione di almeno un terzo di acqua presente, tuttavia il latte può essere evaporato sotto pressione o addizionato di latte in polvere (Soukoulis *et al.*, 2007).

Il trattamento termico è considerato un fattore critico per la qualità dello yogurt, soprattutto per la determinazione della struttura. Il calore induce la denaturazione delle siero proteine con conseguente associazione alle micelle di caseine.

Le siero proteine si legano alle caseine mediante ponti disolfuro e interazioni idrofobiche. L'applicazione di diverse combinazioni tempo – temperatura varia da 80-85°C per 30 minuti a 90-95°C per 5 minuti interessa principalmente la produzione di yogurt di alta qualità. L'aumento della temperatura induce una denaturazione più intensa delle siero proteine soprattutto delle β -lattoglobuline, inducendo una gelificazione più rapida. La gelificazione comincia prima nei lattici trattati

termicamente e contribuisce a far diminuire il tempo di coagulazione del latte acidificato, al contrario lo yogurt ottenuto da latte non termizzato è caratterizzato da struttura povera e meno stabile e da maggiore suscettibilità alla sineresi.

L'aumento di solidi nel latte può essere altresì raggiunto mediante aggiunta di diverse sostanze derivate dal latte stesso, tra cui latte scremato in polvere (SMP), proteine del latte concentrate (MPC) siero proteine concentrate (WPC) e caseinati.

L'aumento del contenuto proteico nello yogurt determina maggiore fermezza del gel e maggiore resistenza alla sineresi. L'impiego di sieroproteine concentrate favorisce la stabilità e la viscosità dello yogurt, ma l'aggiunta di siero in polvere tal quale non sempre è sufficiente a questo scopo; inoltre l'aumento del rapporto tra sieroproteine e caseine determina un aumento del tempo di fermentazione.

L'utilizzo dei caseinati assicura un effetto migliorativo della struttura dello yogurt rispetto alle siero proteine.

Le principali tecnologie di produzione dello yogurt adottate in Italia sono due volte a produrre due tipi di yogurt: yogurt a coagulo intero (*set yogurt*) e yogurt a coagulo omogeneizzato (*stirred yogurt*).

La produzione di yogurt a coagulo intero è ottenuta da latte tradizionalmente concentrato per evaporazione ma attualmente arricchito con proteine del latte.

Dopo la standardizzazione e il trattamento termico il latte è portato alla temperatura di fermentazione in fermentatori, normalmente a 45°C, e si procede all'aggiunta dello starter microbico. La prima parte della fermentazione è condotta in fermentatore, in seguito il latte parzialmente fermentato è invasettato e la fermentazione protratta in

camere calde a 45-46°C fino al raggiungimento del pH desiderato normalmente di 4,6-4,7 in 2-3 ore. Infine lo yogurt è raffreddato a 4-6°C (**Figura 1.7**).

Mentre nella produzione di yogurt a coagulo rotto la fermentazione è condotta interamente prima del confezionamento. La produzione di questo tipo di yogurt è attuata a temperature di fermentazioni comprese tra 37 e 42 °C per tempi variabile da 6 a 12 ore di incubazione. Dopo la fermentazione lo yoghurt è omogeneizzato e raffreddato a 4-6 °C prima del confezionamento (**Figura 1.7**).

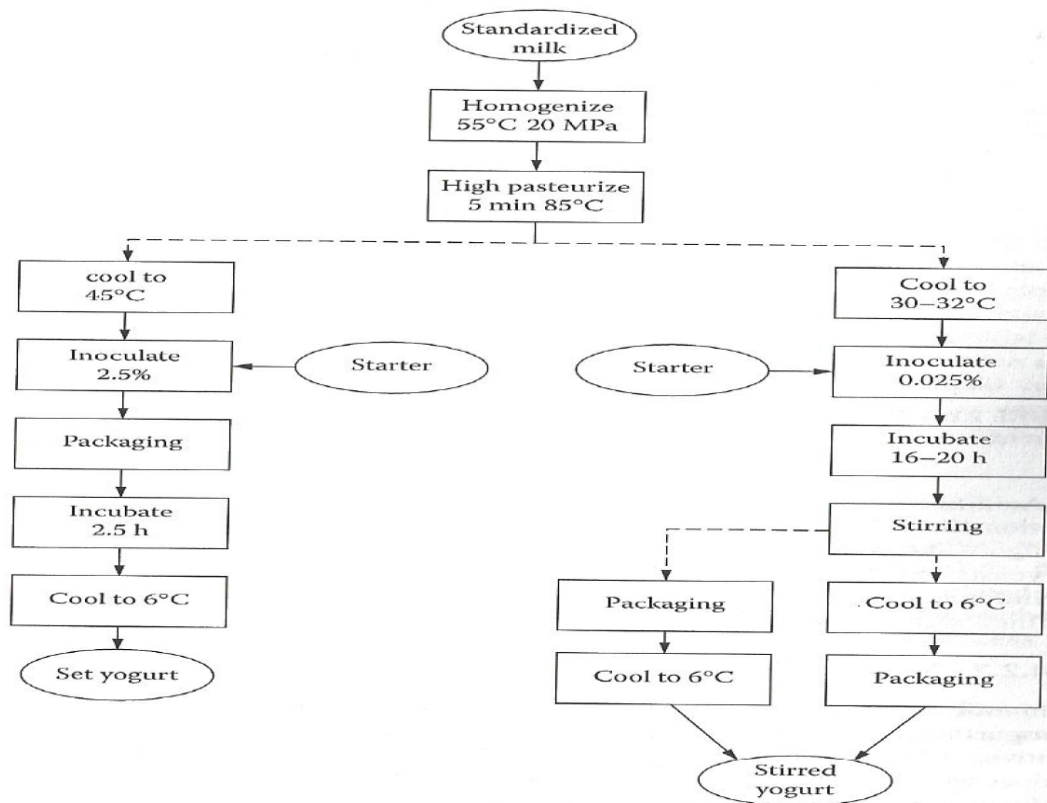


Figura 1.7. Flow-chart for production of *set yoghurt* and *stirred yoghurt* (Walstra et al., 2006).

Le specie batteriche ammesse in Italia per la produzione di yogurt sono *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

La crescita in associazione delle due specie costituenti la coltura starter da yogurt è denominata simbiosi. La prima evidenza di questa particolare relazione è l'incremento della velocità di acidificazione delle due specie in associazione rispetto alla velocità di acidificazione delle due specie allevate singolarmente.

La produzione di metaboliti peculiari da parte di ognuna delle due specie è utile ad incrementare lo sviluppo dell'altra specie. Ad esempio la produzione da parte di *L. bulgaricus* di amminoacidi essenziali quali istidina, valina, leucina cisteina spesso presenti in basse concentrazioni nel latte induce l'incremento della crescita in *S. thermophilus*. Mentre *S. thermophilus* produce acido formico e altri nutrienti essenziali per incrementare lo sviluppo di *L. bulgaricus* (Tamine *et al.*, 1985).

1.5 Fermentazione Industriale dei batteri lattici

Per l'utilizzo biotecnologico moderno dei microrganismi per la trasformazioni alimentari è necessario disporre di una produzione su scala industriale. Come durante l'attuazione degli stessi processi biotecnologici la fermentazione industriale comporta la trasformazione della materia prima con conseguente accrescimento della biomassa di microrganismi. I processi biotecnologici sono una successione di stadi in cui la materia subisce operazioni e processi unitari. Lo sviluppo in fermentatore industriale si realizza sempre attraverso una serie di operazioni ben definite (Frontali, 1992).

Nella fermentazione industriale dei microrganismi si distinguono tre stadi fondamentali:

- 1) fasi preparatorie del reattore, del substrato e dell'inoculo;
- 2) la fermentazione vera e propria;
- 3) separazione dei prodotti finali.

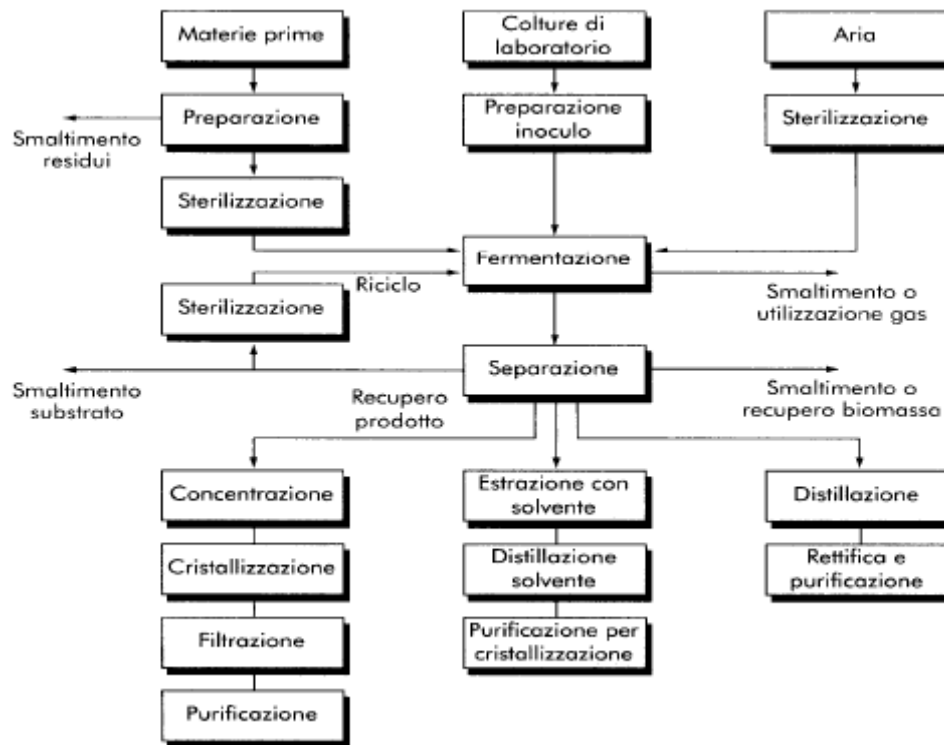


Figura 1.8. Schema generale di un processo biotecnologico.

1.5.1 Fasi preparatorie del reattore e del substrato

I fermentatori più impiegati per lo sviluppo di batteri lattici sono fermentatori di tipo discontinuo detti fermentatori batch (*stirrer reactor*); i fermentatori presentano una serie di sistemi e dispositivi per assicurarne il corretto funzionamento: sistema di miscelazione interno, sistema di smaltimento del calore e di controllo della temperatura, sistema di aggiunta di reagenti e nutrienti durante il processo, sistema di controllo del pH, sistema di controllo e rottura delle schiume, monitoraggio della concentrazione di reagenti, prodotti e microrganismi.

Prima dell'avvio del processo è necessario assicurare la pulizia e la sterilizzazione del fermentatore, inclusi tubazioni, raccordi e valvole; inoltre va verificato il corretto funzionamento dei sistemi di misura e di controllo, inclusa la calibrazione delle sonde.

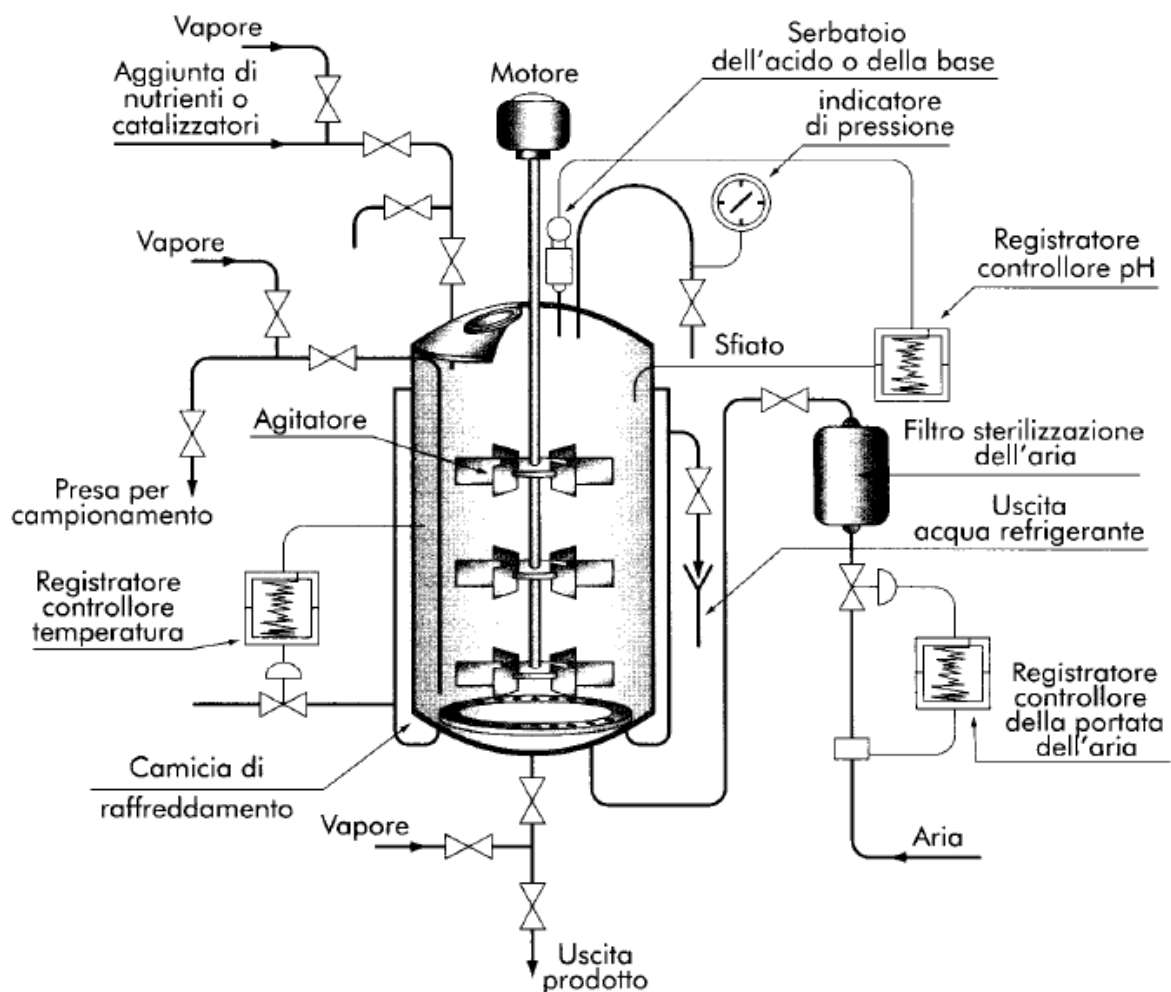


Figura 1.9. Schematizzazione di un fermentatore ad agitazione meccanica.

Una volta verificato il corretto funzionamento del fermentatore al suo interno viene caricato il substrato di fermentazione che deve essere sterilizzato per assicurare l'assenza di specie indesiderate. Il terreno di fermentazione è sterilizzato mediante scambio termico con vapore diretto oppure in scambiatori di calore.

La composizione del substrato di fermentazione varia in base alle esigenze nutrizionali dei microrganismi. In particolare i batteri lattici presentano esigenze nutrizionali relativamente complesse in termini di carboidrati, amminoacidi, vitamine, acidi nucleici e sali minerali. Nella fermentazione industriale tali esigenze vengono soddisfatte ricorrendo all'impiego di substrato complessi sia: cereali, frutta, tuberi e latte, sia sottoprodotti di altre lavorazioni quali siero di latte, lattosio, melassa, come riassunto in **Tabella 1.2** (Manzoni, 2005).

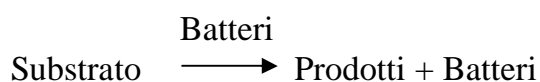
PRODOTTI VEGETALI	PRODOTTI ANIMALI	SOTTOPRODOTTI
Mais, Orzo, grano	Latte	Melasse
Uva, mela, prugne, ciliegie	Panna	Crusca
Patate, bietola	Siero	Acqua di vegetazione
Soia, arachidi		Acqua di macerazione
Foglie di piante		Liquori solfiti
		Lattosio

Tabella1.2. Materie prime utili per i processi biotecnologici.

Una volta predisposto il substrato di fermentazione questo è inoculato con la coltura inoculo per la fase di fermentazione vera e propria.

1.5.2 Fermentazione

Nelle reazioni biotecnologiche il catalizzatore della reazione, cioè le cellule stesse, non si consuma ma ne viene prodotto di nuovo, nuovi batteri:



Studiare la cinetica della reazione è funzionale a stabilire la massima velocità di crescita dei microrganismi per poter progettare adeguatamente il fermentatore e la fermentazione (Manzoni, 2005).

La velocità di reazione può essere espressa in termini di generazione di nuove cellule r che esprime la generazione di nuovo prodotto o la scomparsa di substrato in relazione al tempo:

$$r = \frac{dC}{dt}$$

La velocità di crescita in relazione al substrato è espressa dall'equazione di Monod:

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S}$$

In cui μ = velocità della reazione; μ_{\max} = velocità massima della reazione; C_S = concentrazione del substrato espressa in g/L; K_S = costante di affinità substrato microrganismi.

Per valori di C_S molto maggiore di K_S : nella fase iniziale di crescita in cui si ha elevata disponibilità di substrato la velocità tende ad 1 mentre tende a 0 per valori

La velocità specifica di sviluppo dipende dal tipo di microrganismo, dalla temperatura, dal pH e dalla composizione del terreno colturale. La variazione della carica microbica nel tempo (accrescimento batterico) segue l'andamento schematizzato in **Figura 1.10**.

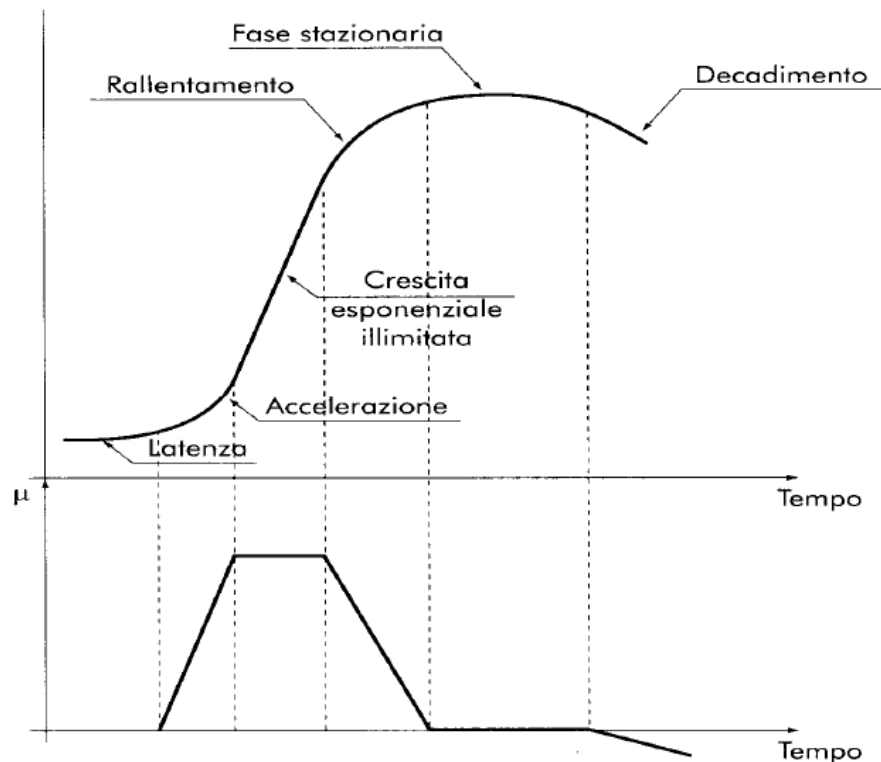


Figura1.10. Curva di accrescimento batterico in fermentatore batch (Manzoni, 2005)

Durante lo sviluppo della biomassa su scala industriale si prendono in considerazione diversi fattori di controllo e monitoraggio quali: temperatura, pH, tempo, agitazione, contenuto di O_2 .

1.5.3 Separazione dei prodotti finiti

Il recupero dei prodotti di fermentazione può interessare (Frontali & Schiesser, 1992):

- separazione delle cellule (centrifugazione e filtrazione);
- isolamento del prodotto dal substrato di fermentazione (estrazione, adsorbimento, precipitazione, ultrafiltrazione) e purificazione del prodotto (precipitazione frazionata, cromatografia);
- concentrazione finale del prodotto (cristallizzazione, essiccamento e liofilizzazione).

1.6 Obiettivo della tesi di dottorato

Nella conduzione di un processo biotecnologico volto alla produzione di alimenti fermentati la componente microbica impiegata nella fermentazione ha un ruolo fondamentale nella definizione delle caratteristiche finali dell'alimento. Da qui la necessità di disporre di un'ampia gamma di microrganismi atti alla conduzione del processo fermentativo in modo da imprimere caratteristiche peculiari all'alimento fermentato.

Questo aspetto è fondamentale nella conduzione delle fermentazioni in campo lattiero-caseario, in particolare nella produzione dello yogurt.

Le attività di ricerca del triennio di dottorato si inseriscono in tale contesto, prefiggendosi l'obiettivo di selezionare ceppi di batteri lattici, da matrici alimentari, da impiegare nella produzione di yogurt.

La fase preliminare dell'attività di ricerca ha riguardato l'isolamento dei batteri lattici da matrici alimentari. Poiché lo scopo della tesi era la selezione di ceppi da impiegare nella produzione di yogurt, i batteri sono stati isolati da matrici lattiero-casearie e in particolare da campioni di yogurt artigianale e latte fermentato.

Gli isolati sono stati identificati sia mediante l'impiego di tecniche tradizionali sia mediante l'impiego di tecniche biomolecolari (PCR-DGGE, RAPD-PCR, etc.) che ne hanno permesso la determinazione della specie e la tipizzazione.

La seconda fase del lavoro di dottorato è stata incentrata sullo studio delle caratteristiche tecnologiche dei differenti ceppi in funzione del loro potenziale impiego nella preparazione di yogurt. In particolare sono state studiate alcune caratteristiche di interesse tecnologico quali: capacità e velocità di acidificazione,

produzione di EPS, produzione di composti aromatici, attività proteolitica, resistenza fagica.

La terza fase del lavoro di tesi ha interessato le prove di industrializzazione su scala pilota dei ceppi che presentavano i caratteri tecnologici più interessanti. Le prove eseguite su scala pilota hanno permesso di valutare l'effettiva possibilità di produrre industrialmente la coltura da impiegare come starter selezionato nella preparazione dello yogurt.

2. MATERIALE E METODI

2.1 Substrati principali

M17 broth / agar (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK)

Composizione:

Tryptone	5 g/L
Peptone di Soia	5 g/L
Estratto di carne	5 g/L
Estratto di lievito	2,5 g/L
Acido Ascorbico	0,5 g/L
Magnesio solfato	0,25 g/L
Di-sodio-glicerofosfato	19 g/L
Agar (in caso di M17 agar)	11 gr/L

Sospendere 37.25g in 950 mL di acqua distillate e portare ad ebollizione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere lattosio soluzione sterile di lattosio 10% 50 mL.

GM17-sm-rr

Composizione:

Tryptone	5 g/L
Peptone di Soia	5 g/L
Estratto di carne	5 g/L
Estratto di lievito	2,5 g/L
Acido Ascorbico	0,5 g/L
Magnesio solfato	0,25 g/L
Di-sodio-glicerofosfato	19 g/L
Skimmed milk powder	50g/L

Sospendere 37.25 g in 950 mL di acqua distillate e portare ad ebollizione. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere soluzione sterile di glucosio 10% 50 mL (Carlo Erba) e soluzione sterile di rosso rutenio 80 mg/L(RR, Sigma, Italia).

Skimmed milk

Skimmed milk powder 100g/L

Sospendere 100g (France Lait) in 900 mL di acqua distillate. Pastorizzare ad alta temperatura 90°C per 20 minuti.

2.2 Colture oggetto di studio

Le matrici dalle quali sono stati isolati i ceppi di batteri lattici oggetto di studio erano colture naturali impiegate nella produzione di yogurt. Le colture sono state fornite dall'azienda produttrice di starter microbici Mediterranea Biotecnologie srl.

Sono state selezionate dodici diverse colture. L'analisi delle colture era volta individuare all'interno delle colture la presenza di ceppi diversi di cocchi termofili con caratteristiche tecnologiche interessanti per la produzione di yogurt.

I singoli campioni sono stati sospesi in acqua peptonata sterile (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, UK) e omogeneizzati in stomacker per 2 minuti. Di ogni campione sono state predisposte le diluizioni decimali in acqua peptonata sterile per poter isolare singole colonie di batteri lattici, in particolare i cocchi termofili. Le diluizioni sono state piastrate in M17 agar e poste in incubazione in condizioni ambientali atte a favorire la crescita delle sole forme cocciche termofile (37°C per 48 ore) come indicato dalla metodica ufficiale IDF 117:2003 / ISO 7889: 2003.

Dalle piastre in cui c'erano singole colonie si è proceduto all'isolamento delle colture in brodo, trasferendo le colonie in M17 *broth* e incubate a 37°C per 24 ore. Le colture liquide così ottenute sono nuovamente trasferite mediante striscio su M17 agar in modo da ottenere singole colonie (fase di purificazione). Una singola colonia è ulteriormente sviluppata in M17 *broth* a 37°C per 24 ore; da qui si procede alla fase di conservazione degli isolati: le brodocolture raccolte in crio-tubi da 1,5 mL in presenza di glicerolo 20% sono conservate a -20°C

In **Tabella 2.1** sono riportate le condizioni adottate per la selezione di forme cocciche termofile in ciascun campione e gli isolati ottenuti.

Coltura Campione	Diluizioni di riferimento	Substrato e condizioni	Isolati selezioni
Y1	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y2	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y3	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y4	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y5	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y10	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y20	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y30	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y40	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	20
Y50	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	30
Y60	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	30
Y70	1:10 ⁷ - 1:10 ⁸ - 1:10 ⁹	M17a 37°C per 48 h	30

Tabella 2.1. Colture per l'isolamento di ceppi microbici ed isolati individuati

2.3 Analisi per l'identificazione di colture lattiche

2.3.1 Identificazione fenotipica e biochimica

Gli isolati ottenuti riferibili ai batteri lattici termofili sono stati sottoposti alle valutazioni volte a confermarne i caratteri fenotipici e biochimici, quali: osservazione al microscopio, colorazione di Gram; saggio della catalasi; resistenza al cloruro di sodio; capacità di crescita a 10°C e 45°C, determinazione del profilo fermentativo degli zuccheri.

Gli isolati di forma coccica sono stati allevati in M17 *broth* a 37°C. Le brodocolture ottenute sono state impiegate per le diverse analisi. Le brodocolture sono state osservate al microscopio ottico bioculare con obiettivo 100x (Olympus). Dalla medesima brodocoltura è stata prelevata una aliquota, fissata su vetrino porta-oggetto per la colorazione di Gram.

Per valutare la reazione della catalasi, dalla medesima brodocoltura è stata prelevata una piccola aliquota, disposta su un vetrino porta-oggetto e miscelata con perossido di idrogeno 3%. La reazione è positiva in presenza di catalasi e si evince per liberazione di ossigeno sottoforma di gas. Nei batteri lattici la reazione è negativa poiché non è prodotta la catalasi e negativamente non vi è liberazione di ossigeno.

La capacità di crescita alle temperature limite di 10°C e 45°C è stata valutata piastrandole le singole brodo colture in M17 agar, le piastre sono state incubate a 10°C fino a sette giorni e a 45°C fino a due giorni.

Per la valutazione della resistenza a stress salino, da una brodocoltura sono state allestite le diluizioni decimali e piastrate su M17a+NaCl 2% e M17a+NaCl 4% incubando a 37°C per 4 giorni.

Per valutare il profilo fermentativo degli zuccheri (API TEST 50 CHL – Biomerieux, France) la brodocoltura di riferimento precedentemente ottenuta è centrifugata a 9000 rpm per 3 min per il recupero del pellet cellulare e la sospensione nell'opportuno *buffer* per l'analisi.

2.3.2 Identificazione biomolecolare degli isolati

L'identificazione ha previsto le seguenti fasi: estrazione del DNA, amplificazione della regione V1 del rDNA 16S, analisi PCR - DGGE, sequenziamento.

Gli isolati di forma coccica sono stati allevati in M17 *broth* a 37°C.

L'estrazione del DNA è stata realizzata a partire da brodo-culture overnight seguendo il protocollo descritto da (Querol *et al.*, 1992).

La quantità e la purezza del DNA sono state valutate mediante lettura allo spettrofotometro alle due lunghezze d'onda 260 nm e 280 nm per ricavarne il rapporto $A_{260/280}$, come descritto da Sambrook *et al.*, 1989.

Per l'analisi PCR sono stati impiegati *primers* per amplificare la regione del V1 del rDNA 16S: P1V1 (5'-gcg gcg tgc cta ata cat gc-3') (Cocolin *et al.*, 2001) and P2V1 (5'-ttc ccc acg cggtac tca cc-3') (Rantsiou *et al.*, 2005). Inoltre in posizione 5' del primer P1V1 è stato aggiunto un clamp GC (5'-cgc ccg ccg cgc ccc gcg ccc gtc ccg ccgccc ccg ccc g-3') funzionale all'analisi DGGE.

Il mix di reazione PCR per l'amplificazione della regione V1 era così costituito: 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 μM di ciascun primer (Sigma), 0.2 mM di ciascun dNTPs, 1.25 UI *Taq Polymerase* (Finnzymes, Finland), 200 ng DNA.

Il programma di amplificazione è stato il seguente:

- denaturazione iniziale a 95°C x 5 minuti,
- 35 cicli x [denaturazione 95°C x 1 minuto, *annealing* 45°C x 1 minuto, estensione 72°C x 1 minuto]
- estensione finale 72°C x 1 minuto.

La reazione PCR è stata attuata in Mastercycler Gradient (Eppendorf, Germany).

L'analisi DGGE dei prodotti PCR ottenuti è stata attuata mediante DcodeTM Universal Mutation Detection System (Biorad, CA, USA) in **Figura 1**. Il gel per la corsa elettroforetica è stato preparato ad una concentrazione dell'8% di poliacrilamide, con rapporto acrilamide: N,N'-metilen-bis-acrilamide 37:5:1.

Il gradiente di denaturante nel gel era compreso tra il 40 e il 60%, il denaturante era costituito da formamide e urea.

I catalizzatori impiegati nella della reazione di polimerizzazione sono stati il TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletilediammina, Sigma) e l'ammonio persolfato (0,1%, Sigma). Dopo un'ora di polimerizzazione, il gel è stato immerso in *buffer* di corsa TAE 1X e sono stati caricati i campioni (ciascun campione era costituito da 7 μl di prodotto di reazione PCR e 7 μl di *gel loading dye*). La corsa elettroforetica è stata effettuata a 120 V, per 5 ore a 60°C.

Dopo corsa elettroforetica il gel è stato immerso per 20 minuti in una soluzione di 1X TAE contenente 50 μg/ml di Etidio Bromuro, e quindi visualizzato al transilluminatore Molecular Imager Gel Doc XR (Biorad, CA USA).

La conferma della specie è stata ottenuta mediante *sequencing* della regione V1 e V3 rDNA 16S. Il frammento PCR è stato ottenuto impiegando i primers P1 e P4 come descritto da Klijn *et al.*, 1991.

Il mix di reazione era così composto: Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ (Fermentas), 0.2 μM primer P₁V₁ (5'- gcg gcg tgc cta ata cat gc – 3'), 0.2 μM primer

P₄V₃ (5' – atc tac gca ttt cac cgc tac – 3'), 0.2 mM dNTPs, 1.25 UI *Taq Polymerase*, 200 ng DNA.

Le condizioni di amplificazione impiegate sono state:

- denaturazione iniziale 95°C x 5 minuti,
- 35 cicli x [denaturazione 95°C x 1 minuti, *annealing* 42°C x 1 minuti, estensione 72°C x 2 minuti],
- estensione finale 72°C x 1 minuti.

La reazione PCR è stata attuata in Mastercycler Gradient.

Il prodotto PCR ottenuto è stato purificato mediante PCR Purification Kit (Quiagen, Italia) e inviato presso azienda esterna per il *sequencing* (MWG Biotech, Germania).

Le sequenze ottenute sono state allineate in GeneBank con il programma Blast Program (Altschul *et al.*, 1997) al fine di determinare l'esatta identificazione.

2.3.3 Bio-tipizzazione dei ceppi

La tipizzazione dei vari isolati è stata attuata mediante RAPD-PCR. I primers impiegati sono riportati in **Tabella 2.2**.

Nome Primer	Sequenza	Nucleotidi	Origine
MSP	5' - gta aaa cga cgg cca gt – 3'	17 bp	Botina, 2007
ERIC-1	5' - atg taa gcc ttc ggg gat tca c - 3'	22 bp	Botina, 2007
D11344	5' – agt gaa ttc gcg gtg aga tgc ca – 3'	23 bp	Andrighetto, 2002

Tabella 1.2. Primer individuati per la tipizzazione degli isolati oggetto di studio.

Il mix di reazione PCR impiegato era il seguente per tutti i primer utilizzati: Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0.2 µM primer, 1.25 UI *Taq Polymerase*. Le condizioni di amplificazione erano differenti per i vari primer.

Per il *primer* MSP le condizioni di amplificazione adottate erano:

- denaturazione iniziale 94°C x 120 sec;
- 40 cicli x [denaturazione 94°C x 30 sec, *annealing* 45°C x 30 sec, estensione 72°C x 80 sec];
- estensione finale 72°C x 1 minuti.

Per i primer D1134 ed ERIC-1 sono state utilizzate le seguenti condizioni di amplificazione:

- denaturazione iniziale 94°C x 120 sec;
- 35 cicli x [denaturazione 94°C x 60 sec, *annealing* 42°C x 60 sec, estensione 72°C x 90 sec];
- estensione finale 72°C x 10 minuti.

La reazione PCR è stata attuata in Mastercycler Gradient.

Tutti i prodotti PCR ottenuti sono stati separati mediante corsa elettroforetica. Per la corsa elettroforetica 7 µl di prodotti di reazione sono stati miscelati a 3 µl di *gel loading buffer*.

La corsa elettroforetica è stata effettuata in gel di agarosio (Sigma) ad una concentrazione 1.5 %, per 10 minuti a 40 V e per 3 ore a 120 volt (Electrophoresis Power Supply EPS 301 – Amersham Pharmacia Biotech).

Al termine della corsa elettroforetica il gel è stato trasferito in soluzione di Etidio Bromuro (50 µg/ml) per la colorazione, della durata di un'ora. Il gel è stato visualizzato al transilluminatore Molecular Imager Gel Doc XR. I profili RAPD-PCR ottenuti per i vari ceppi sono stati analizzati al software GEL-COMPARE, per la costruzione di un dendrogramma che fornisce indicazioni sul grado di similarità genetica tra gli isolati.

2.4 Valutazione tecnologica dei ceppi microbici

2.4.1 Capacità acidificante

Curve di acidificazione

La capacità acidificante è stata valutata a differenti temperature di incubazione rispettivamente 30°C, 37°C e 45°C. Le prove di acidificazione sono state condotte impiegando quale substrato di fermentazione akimmed milk pastorizzato ad alta temperatura.

Il substrato pastorizzato è successivamente termostato alle tre differenti temperature è stato inoculato con diverse concentrazioni iniziali di cellule (1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 ufc/ml) al fine di valutarne la capacità acidificante.

Durante la fermentazione sono stati monitorati costantemente i seguenti parametri: temperatura, variazione di pH, velocità di acidificazione. Tali parametri sono stati registrati automaticamente mediante un sistema di rilevazione in continuo multi-canale (AMSA16, StarEcotronics, Milano). Al termine del processo di fermentazione il software di gestione ha rielaborato automaticamente le curve di acidificazione ottenute.

Quantificazione di acido L- lattico prodotto dalle colture lattiche

I ceppi di *Streptococcus thermophilus* risultano produttori di solo acido L- lattico. La produzione di acido L-lattico è stata verificata mediante fermentazione in latte a differenti temperature (30°C, 37°C e 45°C). La prova è stata condotta impiegando quale substrato skimmed milk pastorizzato ad alta temperatura e successivamente termostato alle tre differenti temperature. Il latte è stato inoculato con diverse concentrazioni iniziali di cellule 5×10^6 ufc/ml. La fermentazione, alle diverse temperature, è stata protratta fino a raggiungimento della fase lineare della curva di acidificazione. Diversi campionamenti sono stati effettuati durante la fermentazione: 0, 2, 4, 6 ore di fermentazione.

Il campione di latte fermentato è stato diluito 1:10 in acqua distillata sterile ed è stata eseguita la quantificazione di acido L-lattico mediante kit enzimatico (Steroglass, Perugia, Italia).

La reazione enzimatica dovuta all'enzima lattato-deidrogenasi trasforma l'acido L-lattico in acido L-piruvico con liberazione di NADH, quantificato per via spettrofotometrica; misura dell'assorbanza a 340 nm. In tal modo è ricavata indirettamente la quantità di acido L-lattico presente.

2.4.2 Capacità addensante

Screening per la produzione di esopolisaccaridi

Gli streptococchi termofili identificati sono stati sottoposti a *screening* per la produzione di esopolisaccaridi (EPS) (Dabour *et al.*, 2005).

Il test qualitativo ha permesso di discriminare gli streptococchi produttori di EPS dai non produttori, a seconda della colorazione assunta dalle colonie cresciute in specifico substrato solido. Infatti le colonie di batteri produttori di EPS presentano una colorazione bianca, mentre le colonie dei batteri non produttori presentano una colorazione rossa. La colorazione rossa dei batteri è dovuta all'agente *Ruthenium Red* aggiunto al substrato di crescita, che riesce a legarsi alla parete quando non sono prodotti EPS dalle cellule (Dabour *et al.*, 2005).

I ceppi di streptococchi sono stati coltivati in M17 *broth* addizionato di lattosio 5g/l e incubati a 37°C per 18 ore. Le colture, opportunamente diluite, sono state piastrate per inclusione nel substrato M17g (RR+SM) agar,.

Le piastre sono state incubate a 37°C da 48 a 72 ore, osservando periodicamente l'aspetto delle colonie.

Quantificazione di EPS in vitro

I ceppi produttori di EPS sono sottoposti verifica della quantità di EPS prodotti in substrato sintetico, a diverse temperature. Gli isolati di streptococchi sono stati coltivati in M17 *broth* addizionato di lattosio 5g/L dopo incubazione a 37°C per 18 ore.

La carica microbica della brodo-coltura ottenuta è stata determinata mediante conteggio diretto in camera di Thoma al microscopio. La brodo-coltura è servita da inoculo per 3 *flasks* da 50 mL (inoculo iniziale 1×10^6 ufc/mL) ognuna delle quali è stata incubata rispettivamente a 30, 37, 45°C.

Da ogni coltura è stato effettuato un prelievo ai seguenti tempi di campionamento 24 - 48 -72- 144 ore di incubazione.

Ad ogni tempo di campionamento sono stati prelevati 2 mL da ogni coltura e centrifugate a 9000g per 10 minuti per allontanare le cellule. Al surnatante (circa 2 mL) sono stati aggiunti 3 volumi (6 mL) di Etanolo 96% freddo (-20°C) per favorire la precipitazione degli EPS. Il mix è stato centrifugato a 10000g per 10 minuti. Il pellet ottenuto è stato sospeso in 2 mL di acqua distillata, cui sono stati nuovamente aggiunti 3 volumi di Etanolo 96%, il mix è stato nuovamente centrifugato a 10000 g per 10 minuti. I campioni sono sospesi in 2 mL di acqua distillata (Ricciardi *et al.*, 1998).

Gli EPS purificati sono stati quantificati mediante analisi spettrofotometrica, come proposto da Dubois *et al.* (1956). Al campione di EPS, 1 mL, sono stati aggiunti 1 mL di fenolo 5% e 5 mL di acido solforico 96%. Dopo agitazione i tubi sono incubati per 1 ora a temperatura costante di 25 - 30° C. A seguito della reazione, il mix ha assunto persistente colorazione giallo-arancio. L'assorbanza dei campioni è stata rilevata a lunghezza d'onda di 490 nm (ideale per la determinazione degli zuccheri esosi). L'assorbanza ottenuta è stata comparata all'assorbanza di standard a concentrazione nota di glucosio.

Valutazione degli EPS *in situ*

La produzione di EPS *in situ* è stata verificata mediante fermentazione in latte a differenti temperature (30°C, 37°C e 45°C). La prova è stata condotta impiegando quale substrato di fermentazione skimmed milk pastorizzato ad alta temperatura e successivamente termostato alle tre differenti temperature.

Il latte è stato inoculato alla concentrazione iniziale di cellule di 1×10^6 ufc/mL. La fermentazione, alle diverse temperature è stata protratta fino a pH ritenuti utili 4.70 e 4.50 per la prova. Al termine della fermentazione il latte fermentato ottenuto è stato opportunamente omogeneizzato e conservato a 4°C per 24 ore.

Il latte alla temperatura di 8-10 °C è stato fatto scorrere in imbuto separatore fornito di rubinetto con diametro di 5 mm nel punto più stretto.

Il tempo necessario per lo scorrimento di un volume noto di latte fermentato (100 mL) è direttamente proporzionale al contenuto di EPS prodotti dalle cellule.

La proprietà reologica valutata mediante questo test è definita viscosità (Janhoj *et al.*, 2006).

2.4.3 Capacità proteolitica

I ceppi di streptococchi sono stati coltivati in M17 *broth* e incubati a 37°C per 18 ore. La coltura è stata diluita fino alla diluizione 10^{-7} e 10^{-8} . Le diluizioni sono state piastrate in Skim Milk Agar (SMA).

Le piastre sono state incubate a 37°C fino a due giorni per la comparsa delle colonie. Al seguito del periodo di incubazione si rilevano le dimensioni in millimetri degli eventuali aloni di chiarificazione intorno alle colonie, indice dell'attività di proteolisi dei microrganismi.

2.4.4 Capacità aromatizzante

Negli streptococchi è riconosciuta la capacità di produrre precursori, come l'acetoina, che portano alla formazione di diacetile con importante effetto aromatico. Tale molecole sono rilevate con una reazione colorimetrica con α -naftolo.

A seguito di fermentazione overnight a 37°C in skim milk si è prelevata un'aliquota di 50 mL di latte fermentato che è stato centrifugato a 6000 rpm per 4 minuti. A 5 mL di siero ottenuto sono stati aggiunti 600 μ L di soluzione di α -naftolo 6% e 200 μ L di NaOH 40%, dopo aver agitato delicatamente di attende la formazione di colore rosso sulla superficie del campione.

2.4.5 Sensibilità fagica

Per i ceppi di streptococchi termofili più interessanti sono state attuate prove di selezione e isolamento di batteriofagi specifici, mediante *Spot Test*.

Fonte dei batteriofagi sono stati sieri di lavorazione di aziende lattiero-casearie produttrici di pasta filata. I sieri opportunamente raccolti presso i caseifici sono stati filtrati mediante filtri 0,45 μ m e conservati a -20°C.

I ceppi testati sono stati allevati in M17 *broth* incubato a 37°C per 24 ore in aerobiosi. La brodo-coltura ottenuta è stata ulteriormente trasferita in M17 *broth* ad una concentrazione del 2% e incubata per 3 ore a 37°C. La coltura arricchita con 50 μ L di CaCl₂ 1M è stata inoculata in 5 mL di M17 soft-agar (5g/L agar) a 45°C.

Il mix preparato è stato versato su M17a precedentemente solidificato. Sulla superficie del substrato agarizzato sono stati depositati spot dei sieri prelevati e filtrati (50 μ L).

Le piastre sono state incubate a 37°C per 18-24 ore fino alla formazione delle placche di lisi. Ove rilevate le placche di lisi; queste sono prelevate e trasferite in 5 M17 *broth*

inoculati al 2% con il ceppo ospite e 50 μL di CaCl_2 1M. Le colture sono state incubate a 37°C per 6 ore fino a completa chiarificazione della coltura.

I lisati chiarificati sono stati filtrati su filtri 0,45 μm e ulteriormente purificati mediante metodo del doppio strato. E' stata predisposta una nuova brodo-coltura ulteriormente trasferita in M17 *broth* ad una concentrazione del 2% e incubata per 3 ore a 37°C. La coltura arricchita con 50 μL di CaCl_2 1M è stata posta a contatto con i lisati alle diverse diluizioni ed in seguito inoculata in 5 mL di M17 soft-agar a 45°C. Il mix preparato è stato versato su M17a precedentemente solidificato.

Le singole placche di lisi sono state trasferite in brodo M17 *broth*, precedentemente inoculato al 2% con il ceppo ospite e 50 μL di CaCl_2 1M ed incubate a 37°C fino a completa chiarificazione della brodo-coltura. I lisati chiarificati sono congelati a -20°C dopo aggiunta di 20% di glicerolo.

I batteriofagi specifici di per i ceppi selezionati sono impiegati in prove di confronto di host – range per la valutazione della sensibilità fagica sempre mediante spot test, precedentemente illustrato.

Durante la fase di purificazione dei batteriofagi al fine di valutare l'attacco fagi sulla superficie delle cellule batteriche è stata prelevata una regione al margine della placca per le osservazioni al microscopio ottico a scansione. Il campione è stato fissato in soluzione di aldeide glutarica 3% per 48 ore. Una volta fissato il campione è stato disidratato in gradiente di glicerolo e successivamente essiccato mediante *Critical Point Dryer* (CPD). Infine il *coating* è stato eseguito con particelle di oro e le osservazioni a SEM ad alta risoluzione.

2.5 Industrializzazione dei ceppi

Per valutare la possibile industrializzazione su scala pilota dei ceppi ritenuti di interesse sono state simulate su scala pilota tutte le fasi previste dal processo su scala industriale per valutare la possibile industrializzazione delle colture.

Tale lavoro è stato eseguito in collaborazione con l'azienda Mediterranea Biotecnologie srl, azienda produttrice di starter microbici.

La valutazione su scala pilota aveva come scopo principale quello di ottenere una coltura liofilizzata in grado di mantenere le performance tecnologiche verificate e di assicurare elevata carica microbica vitale nella fasi di fermentazione e di mantenerla inalterata nelle successive fasi di lavorazione.

Le principali fasi di processo attuate su scala pilota e i principali parametri di controllo sono stati di seguito riportati.

2.5.1 Fermentazioni su scala laboratorio

Le fermentazioni in laboratorio sono condotte considerando i seguenti parametri:

- volumi di fermentazione (da 100 a 1000 mL di coltura)
- substrato sterile di fermentazione: miscela a base di skim milk powder (substrato semi-definito),
- tempo e temperatura di fermentazione: da 37 a 42°C per 2-3 ore;
- variazione del pH e dell'acidità titolabile,
- carica microbica vitale: curva di crescita durante lo sviluppo.

2.5.2 Fermentazioni in fermentatore

Le fermentazioni in fermentatore pilota sono condotte monitorando i seguenti parametri di controllo:

- volumi di fermentazione (da 2L a 15L di coltura)
- substrato sterile di fermentazione: miscela a base di skim milk powder (substrato semi-definito),
- tempo e temperatura di fermentazione: da 37 a 42°C per 3-4 ore.
- variazione del pH e dell'acidità titolabile,
- carica microbica vitale: curva di crescita durante lo sviluppo.

2.5.3 Concentrazione cellulare

La coltura ottenuta è stata opportunamente concentrata per allontanare acqua e residui colturali al fine di aumentare la carica microbica vitale.

La concentrazione è stata ottenuta per centrifugazione a 10000rpm per 10 minuti in ultracentrifuga (Beckmann). A seguito della concentrazione la coltura è stata

opportunamente aggiunta di disaccaridi e monosaccaridi in rapporto 2:1 in ragione del 10% della coltura prima della liofilizzazione

2.5.4 Liofilizzazione

Le modalità di liofilizzazione sono state concordate con l'azienda Mediterranea Biotecnologie srl in liostato pilota.

La liofilizzazione è processo fisico che consente l'allentamento dell'acqua dalla coltura cellulare per sublimazione. Il

2.6 *Valutazione di colture liofilizzate per la produzione di yogurt*

2.6.1 Formulazione di colture miste per la fermentazione di yogurt

I ceppi di *Streptococcus thermophilus* che hanno mostrato caratteristiche interessanti sono stati impiegati nella formulazione di miscele sperimentali, impiegate come inoculo diretto nella produzione di yogurt.

La formulazione completa della miscele oggetto della valutazione è stata fornita dall'azienda Mediterranea Biotecnologie srl. Nelle miscele in parte riportate in Tabella 2.3 sono stati impiegati ceppi oggetto di questo studio.

Miscela	Composizione	Rapporto ST:LB
Miscela A	<i>Streptococcus thermophilus</i> (tra cui il ceppo Y3-3) <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1:10
Miscela B	<i>Streptococcus thermophilus</i> (tra cui il ceppo Y4-8) <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1:10
Miscela C	<i>Streptococcus thermophilus</i> (tra cui il ceppo Y20-15) <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1:10
Miscela D	<i>Streptococcus thermophilus</i> (tra cui il ceppo Y40-1) <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	1:10

Tabella 2.3. Miscela di starter microbico per produzione di yogurt oggetto di valutazione.

2.6.2 Valutazione delle caratteristiche tecnologiche delle miscele

Capacità acidificante delle miscele

La capacità acidificante è stata valutata a differenti temperature di incubazione rispettivamente 30°C, 37°C e 45°C. Le prove di acidificazione sono state condotte

impiegando quale substrato di fermentazione polvere di latte scremata ad alta solubilità ad uso alimentare reidratata con acqua distillata al 10%.

Le miscele sono state inoculate in latte per valutare la capacità di acidificazione.

Durante le diverse fermentazioni sono stati monitorati costantemente i seguenti parametri: temperatura, variazione di pH, velocità di acidificazione. Tali parametri sono stati registrati automaticamente mediante un sistema di rilevazione in continuo multi-canale (AMSA16, StarEcotronics, Milano). Al termine del processo di fermentazione il software di gestione ha rielaborato automaticamente le curve di acidificazione ottenute.

Capacità addensante delle miscele

Il proprietà reologica valutata mediante Posthumus funnel test è definita viscosità (Janhoj *et al.*, 2006). La prova è stata condotta impiegando un substrato costituito da polvere di latte scremata reidratata con acqua distillata al 10%; il substrato è stato pastorizzato a 90°C per 20 minuti e successivamente termostato alle tre differenti temperature. Il latte è stato inoculato con le diverse miscele starter. La fermentazione, alle diverse temperature è stata protratta fino a pH 4.50. Al termine della fermentazione il latte fermentato ottenuto è stato opportunamente omogeneizzato e conservato a 4°C per 24 ore. Il latte alla temperatura di 8-10 °C è stato fatto scorrere in imbuto separatore (Steroglass, Perugia, Italia) fornito di rubinetto con diametro di 5 mm nel punto più stretto. Il tempo necessario per lo scorrimento di un volume noto di latte fermentato (100 ml) è direttamente proporzionale al contenuto di EPS prodotti dalle cellule.

Capacità aromatizzante delle miscele

La capacità aromatizzante delle miscele è stata valutata misurando la quantità di acetaldeide prodotta dalla coltura starter durante la fermentazione. La quantità di acetaldeide prodotta è stata determinata mediante Kit enzimatico per la determinazione quantitativa di acetaldeide (Steroglass, Perugia, Italia).

Principio dell'analisi è la ossidazione enzimatica di acetaldeide in acido acetico mediante acetaldeide deidrogenasi, con riduzione di NAD^+ in NADH . Al termine della reazione viene misurata la quantità di NADH prodotto mediante lettura spettrofotometrica a 340 nm, la quantità di NADH prodotto è rapporto stechiometrico alla quantità di acetaldeide presente inizialmente nel campione.

3. RISULTATI

3. RISULTATI

3.1 Identificazione di colture lattiche

3.1.1 Identificazione fenotipica e biochimica

Le matrici dalle quali sono stati effettuati gli isolamenti presentavano mediamente un'elevata carica microbica di cocchi termofili, come si evince in Tabella 3.1 le colture analizzate presentava una carica media superiore a 1×10^9 UFC/mL. In tutte le piastre sono state riscontrate colonie lenticolari a margine regolare di colore chiaro, tipiche delle forme cocciche termofile.

Le presenza di numerose colonie ben isolate visibile nelle piastre ha permesso di selezionare differenti isolati. Il numero degli isolati per ogni matrice e il numero complessivo degli isolati è riportato in **Tabella 3.1**.

Coltura Campione	Carica microbica della coltura (in M17a a 37°C per 48h)	Numero isolati
Y1	$8,75 \times 10^9 \pm 0,49$	20
Y2	$5,2 \times 10^9 \pm 0,31$	20
Y3	$4,8 \times 10^9 \pm 0,31$	20
Y4	$4,5 \times 10^9 \pm 0,41$	20
Y5	$1,4 \times 10^9 \pm 0,34$	20
Y10	$5,2 \times 10^9 \pm 0,23$	20
Y20	$9,8 \times 10^9 \pm 0,28$	20
Y30	$8,5 \times 10^9 \pm 0,33$	20
Y40	$5,4 \times 10^9 \pm 0,22$	20
Y50	$8,2 \times 10^9 \pm 0,25$	30
Y60	$6,4 \times 10^9 \pm 0,44$	30
Y70	$7,3 \times 10^9 \pm 0,21$	30
TOTALE		270

Tabella 2.1. Conta microbica delle colture ottenuta per i diversi campioni di yogurt analizzati e numero di isolati prelevati per ogni campione.

L'identificazione fenotipica e biochimica ha previsto un lavoro lungo e complesso, per questa ragione per ogni coltura sono stati scelti 10 isolati e per questi si è proceduto alle valutazioni di seguito riportate: colorazione di Gram, saggio della catalasi, resistenza al cloruro di sodio, capacità di crescita a 10°C e 45°C, determinazione del profilo fermentativo degli zuccheri. L'esito delle valutazioni è riassunto nelle **Tabelle 3.2 e 3.3**.

Proprietà	Isolati Y1	Isolati Y2	Isolati Y3	Isolati Y4	Isolati Y5	Isolati Y10
Gram	+	+	+	+	+	+
Catalasi	-	-	-	-	-	-
NaCl 2%	+	+	+	+	+	+
NaCl 4%	-	-	-	-	-	-
10°C	-	-	-	-	-	-
45°C	+	+	+	+	+	+
Glucosio	+	+	+	+	+	+
Lattosio	+	+	+	+	+	+
Saccarosio	+	+	+	+	+	+

Tabella 3.2. Identificazione biochimica e fenotipica delle colture Y1, Y2, Y3, Y4, Y5, Y10.

Proprietà	Isolati Y20	Isolati Y30	Isolati Y40	Isolati Y50	Isolati Y60	Isolati Y70
Gram	+	+	+	+	+	+
Catalasi	-	-	-	-	-	-
NaCl 2%	+	+	+	+	+	+
NaCl 4%	-	-	-	-	-	-
10°C	-	-	-	-	-	-
45°C	+	+	+	+	+	+
Glucosio	+	+	+	+	+	+
Lattosio	+	+	+	+	+	+
Saccarosio	+	+	+	+	+	+

Tabella 3.3. Identificazione biochimica e fenotipica delle colture Y20, Y30, Y40, Y50, Y60, Y70.

Tutti gli isolati saggiati hanno mostrato di possedere le caratteristiche tipiche dei cocchi lattici termofili.

3.1.2 Identificazione biomolecolare degli isolati

Al fine di ottimizzare e velocizzare il riconoscimento tassonomico dei numerosi isolati selezionati è parso opportuno ricorrere alla tecnica molecolare PCR - DGGE.

La tecnica prescelta è un'analisi di tipo comparativo, che consente di confrontare il profilo elettroforetico di un microrganismo di specie nota con quello di microrganismi da identificare. Per l'identificazione degli isolati è stato impiegato come ceppo di riferimento un ceppo interno (Y1-1) di cui è stata sequenziata una regione ampia del gene del rDNA 16S. La comparazione in Banche Dati (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) della sequenza disponibile del rDNA 16S del ceppo Y1-1 ha permesso di identificare il ceppo come *Streptococcus thermophilus*.

Il profilo elettroforetico di ogni isolato è caratterizzato da un'unica banda come per il ceppo di riferimento *Streptococcus thermophilus* Y1-1 presente ai margini del gel. La corrispondenza delle bande ha permesso di identificare tutti gli isolati come riconducibili alla specie *Streptococcus thermophilus*.

L'analisi DGGE ha permesso di ottenere profili elettroforetici tutti uguali tra loro, quindi per ogni coltura di isolamento è stato riportato il profilo elettroforetico solo di un gruppo rappresentativo di isolati; i profili DGGE sono riportati in **Figura 5.1 (Capitoli 5. Immagini)**.

Ad ulteriore conferma dell'identificazione attuata mediante analisi DGGE è stato effettuato il *sequencing* della regione V1 del 16S di un isolato per ogni coltura di isolamento analizzata, scelto in maniera *random*. La sequenza nucleotidica del frammento di rDNA 16S di ogni isolato è stata comparata, mediante allineamento nucleotidico, a quelle presenti in banca dati online

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.gci>). I dati ottenuti dal sequenziamento sono riportati in **Tabella 3.2**.

Ceppo	Dimensioni sequenza (bp)	Omologia	% Identità	Risorsa GenBank
Y1-1	722 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> NM130-5	99%	HM28518.1
Y2-6	623 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> culture- collection IMAU:80513	99%	HM058723.1
Y3-3	621 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> culture- collection IMAU:80513	99%	HM058723.1
Y4-9	233 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> NM130-5	98%	HM28518.1
Y5-10	253 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> NM130-5	98%	HM28518.1
Y10-12	302 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> culture- collection IMAU:80846	99%	HM059006.1
Y20-15	284 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> NM130-5	98%	HM28518.1
Y30-1	312 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> culture- collection IMAU:80846	99%	HM059006.1
Y40-1	602 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> culture- collection IMAU:80513	99%	HM058723.1
Y50-20	615 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain ASR-1	100%	JX275810.1
Y60-24	605 bp	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain SP3	99%	HE793101.1
Y70-9	583	<i>Streptococcus thermophilus</i> strain ASR-1	100%	JX275810.1

Tabella 3.4. Identificazione mediante allineamento nucleotidico Blast .

3.1.3 Bio-tipizzazione dei ceppi

I 270 ceppi identificati come *S. thermophilus* mediante DGGE e sequenziamento sono stati in seguito biotipizzati mediante RAPD-PCR.

L'impiego dei primer D11344 e MSP ha consentito di ottenere profili RAPD rappresentativi di ogni isolato e in grado di fornire una buona discriminazione dei ceppi.

Tali profili elettroforetici sono stati quindi rielaborati al software GEL COMPARE al fine di individuare le percentuali di similarità tra i differenti ceppi.

Gli isolati di ogni coltura hanno mostrato un elevato grado di omologia tra di loro facendo ipotizzare che si tratta di ceppi geneticamente molto simili tra loro.

Nei dendrogrammi delle colture Y1, Y2, Y3, Y4 ed Y5 sono stati individuati 2 principali *cluster* di ceppi con differente grado di omologia, come si evince in figura 5.2 (**Capitolo 5. Immagini**).

Nei dendrogrammi delle colture Y10, Y20, Y30 ed Y40 è stato possibile identificare 2 principali *cluster* con differente grado di omologia come si evince in figura 5.2 (**Capitolo 5. Immagini**).

Anche per le colture che presentavano un numero di isolati maggiori Y50, Y60 ed Y70 sono stati identificati in ogni dendrogramma 2 *cluster* principali come si evince in figura 5.2 (**Capitolo 5. Immagini**).

3.2 Valutazione tecnologica di colture lattiche

3.2.1 Capacità acidificante

Curve di acidificazione

Tra i ceppi oggetto di studio sono stati selezionati quelli che mostravano rapida coagulazione in skimmed milk, entro 3-4 ore di fermentazione a 37°C. In tal modo sono stati scelti 12 ceppi per i quali sono state determinate le curve di acidificazione a diverse temperature.

I ceppi individuati sono stati incubati a diverse temperature (30, 37 e 45°C) in skimmed milk al fine di stabilire le capacità di acidificazione in differenti condizioni ambientali.

Le temperature di riferimento hanno inteso evidenziare le potenzialità del ceppo a seconda del processo tecnologico di applicazione. La temperatura di 45°C è considerata la temperatura di riferimento per la fermentazione dello yogurt, la temperatura di 37°C è

impiegata sia nella fermentazioni dello yogurt sia in caseificazione, la temperatura di 30°C è considerata la temperatura minima limite di sviluppo di streptococchi termofili durante le fermentazioni (Salvadori del Prato, 1998).

Per ogni coltura di isolamento sono stati scelti alcuni ceppi per i quali sono state prodotte curve di acidificazione impiegando diverse concentrazioni cellulari di inoculo, sono state presentate le curve maggiormente rappresentative con concentrazione cellulare iniziale intermedia (5×10^6 ufc/mL).

Nelle figure 3.1- 3.12 sono riportati i grafici relativi alle curve di acidificazione di un ceppo per ogni coltura di isolamento, rispettivamente: Y1-1, Y2-6, Y3-3, Y4-8, Y5-10, Y10-12, Y20-15, Y30-1, Y40-1, Y50-20, Y60-24, Y70-9.

Per ogni ceppo è stata creato un gruppo caratteristico di curve di acidificazione che è stato riprodotto in tre repliche. Dei ceppi individuati nella coltura Y1, Y1-1 è il ceppo tipico che ha mostrato rapida acidificazione a 37 e 45°C ma forte rallentamento a 30°C (**Figura 3.1**). Tra ceppi individuati nella coltura Y2, il ceppo Y2-6 ha mostrato rapida acidificazione sia a 30 sia a 37 sia a 45°C (**Figura 3.2**). Tra i ceppi delle colture Y3 e Y4, sia il ceppo Y3-3 sia il ceppo Y4-8 hanno mostrato una rapida acidificazione alle diverse temperature (**Figura 3.3** e **Figura 3.4**). I ceppi isolati dai campioni Y5 ed Y10, Y5-10 ed Y10-12, hanno presentato un comportamento differente dagli altri ceppi, infatti, le curve di acidificazione hanno mostrato una minore capacità acidificante; con acidificazione bassa e intermedia alle diverse temperature di fermentazione (**Figura 3.5** e **Figura 3.6**). I ceppi isolati dalle colture Y20 ed Y30, Y20-15 ed Y30-1 hanno presentato elevata capacità di acidificazione a 45°C, intermedia a 37°C e un rallentamento a 30°C (**Figura 3.7** e **Figura 3.8**). Anche i ceppi isolati dalle colture Y40

ed Y50, Y40-1 ed Y50-20 hanno presentato elevata capacità di acidificazione a 45°C, intermedia a 37°C e rallentamento a 30°C (**Figura 3.9 e Figura 3.10**).

Dei ceppi individuati nelle colture Y60 ed Y70, Y60-24 ed Y70-9 hanno mostrato elevata capacità di acidificazione a 45°C ma un forte rallentamento a 37°C e 30°C (**Figura 3.11 e Figura 3.12**).

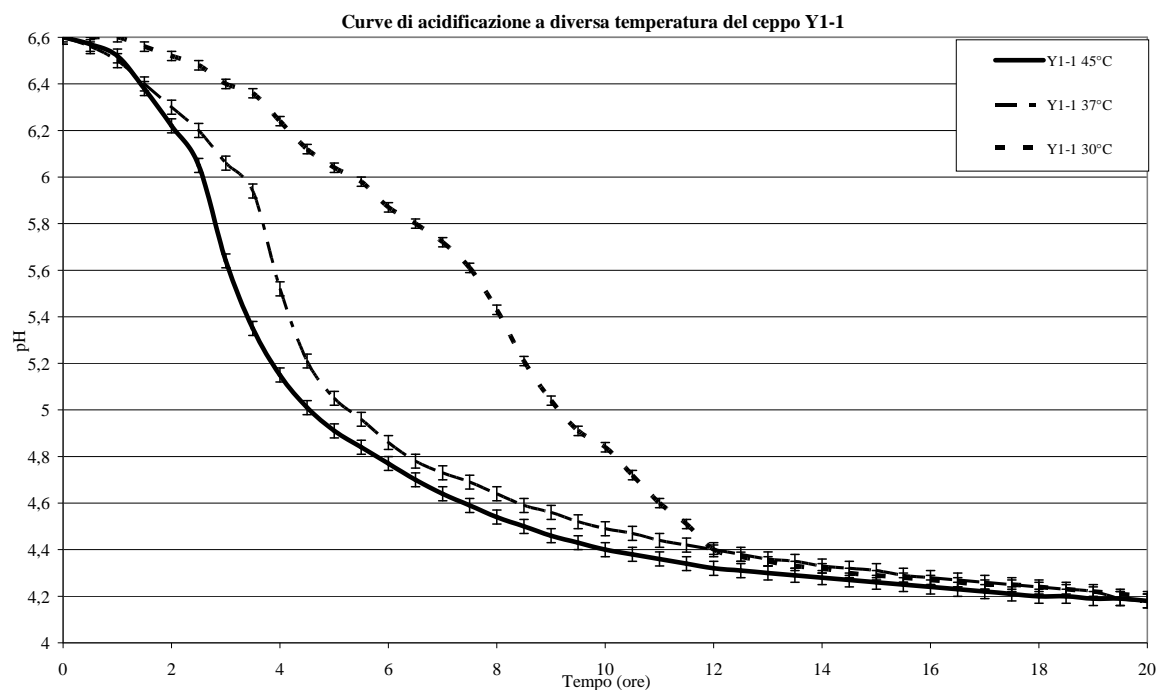


Figura 6.1. Curve di acidificazione a diversa temperatura del ceppo Y1-1.

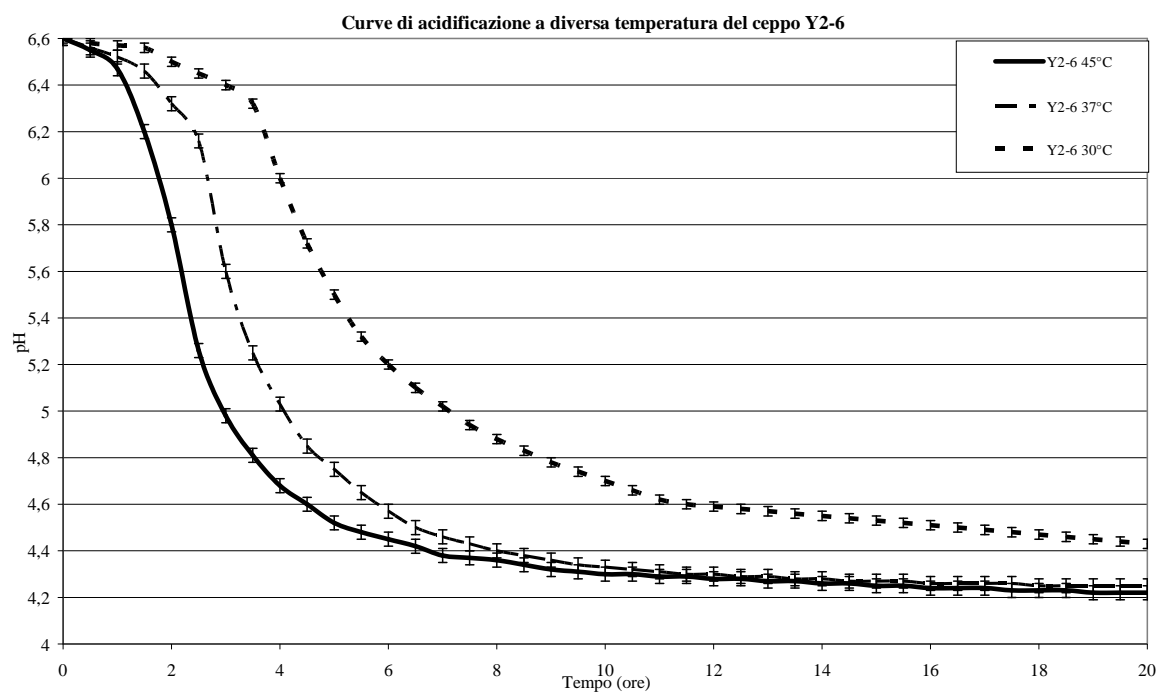


Figura 7.2. Curve di acidificazione a diversa temperatura del ceppo Y2-6.

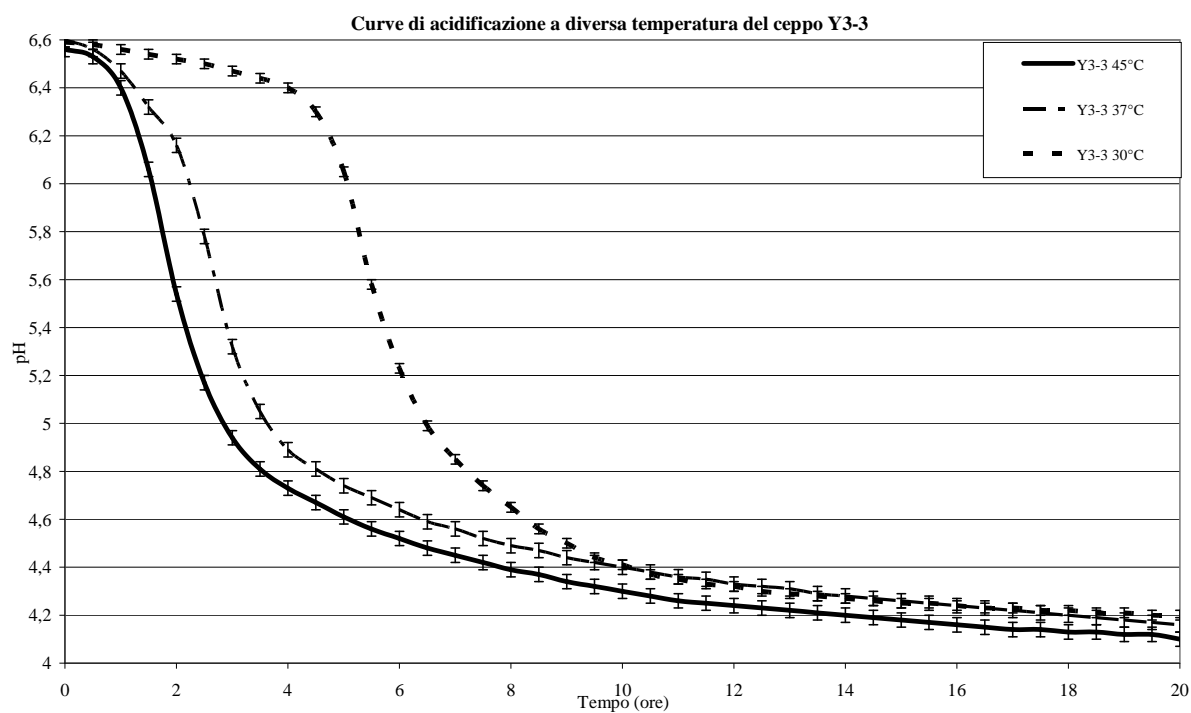


Figura 3.3. Curve di acidificazione a diversa temperatura del ceppo Y3-3.

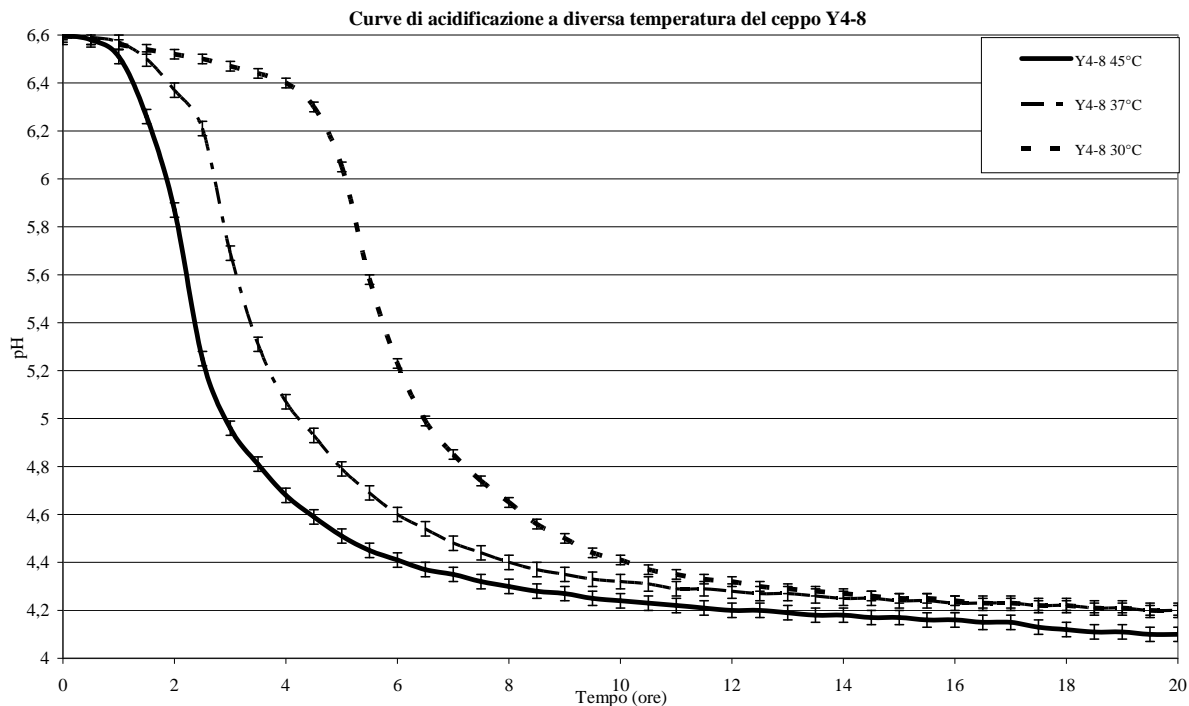


Figura 3.4. Curve di acidificazione del ceppo Y4-9 isolato della matrice Y4.

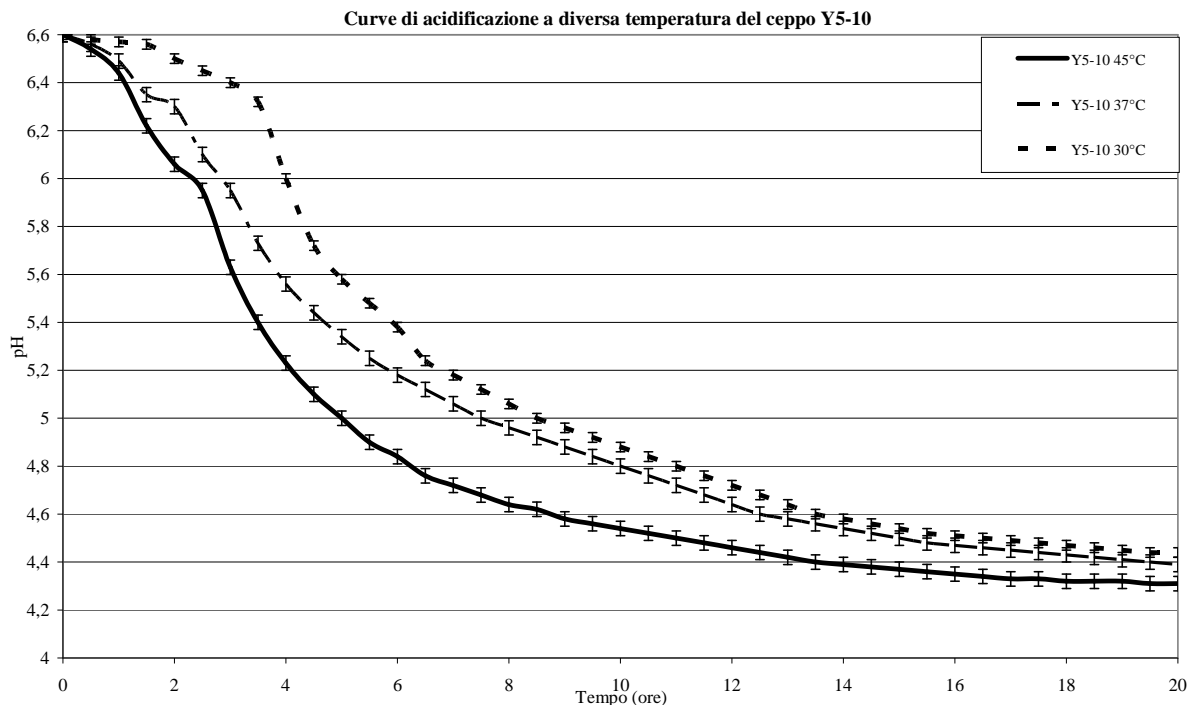


Figura 3.5. Curve di acidificazione del ceppo Y5-10 isolato della matrice Y5.

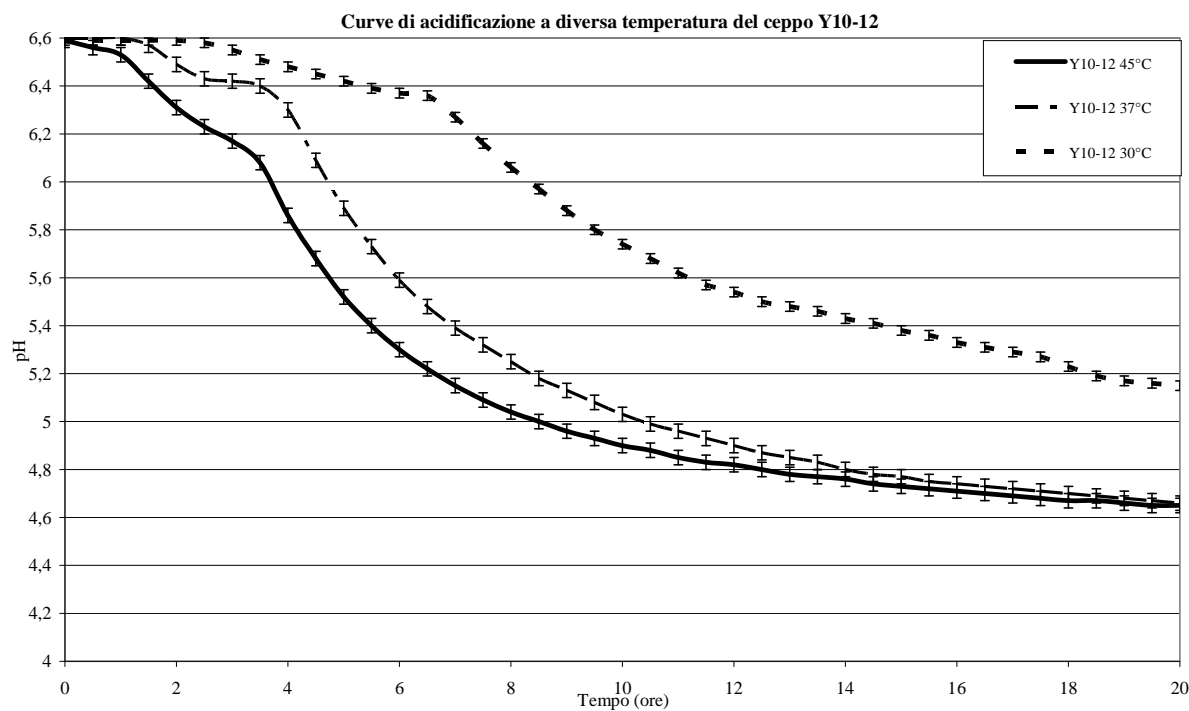


Figura 3.6. Curve di acidificazione del ceppo Y10-12 isolato della matrice Y10.

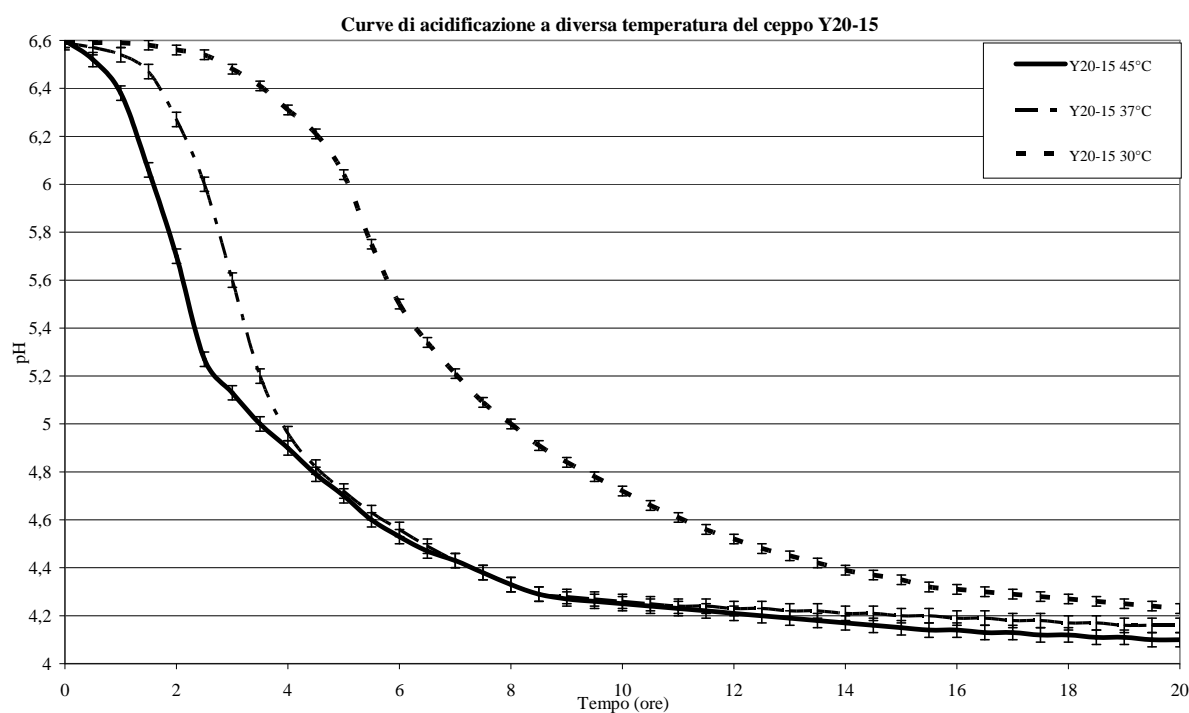


Figura 3.7. Curve di acidificazione del ceppo Y20-15 isolato della matrice Y20.

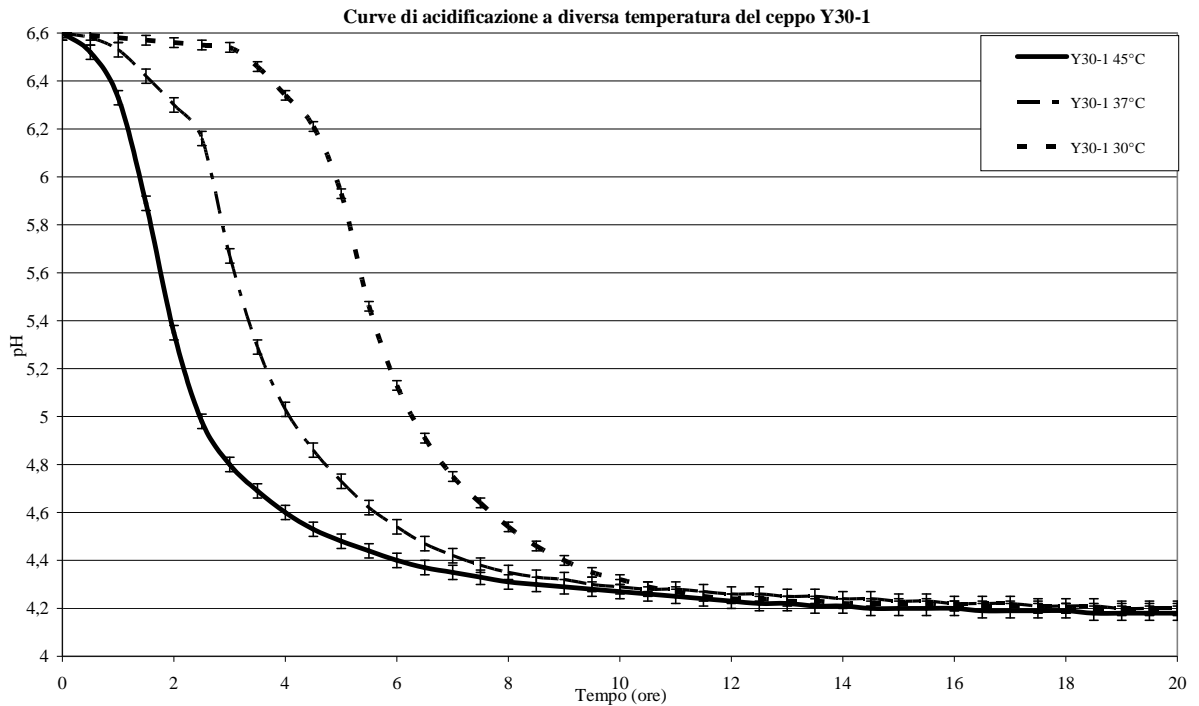


Figura 3.8. Curve di acidificazione del ceppo Y30-1 isolato della matrice Y30.

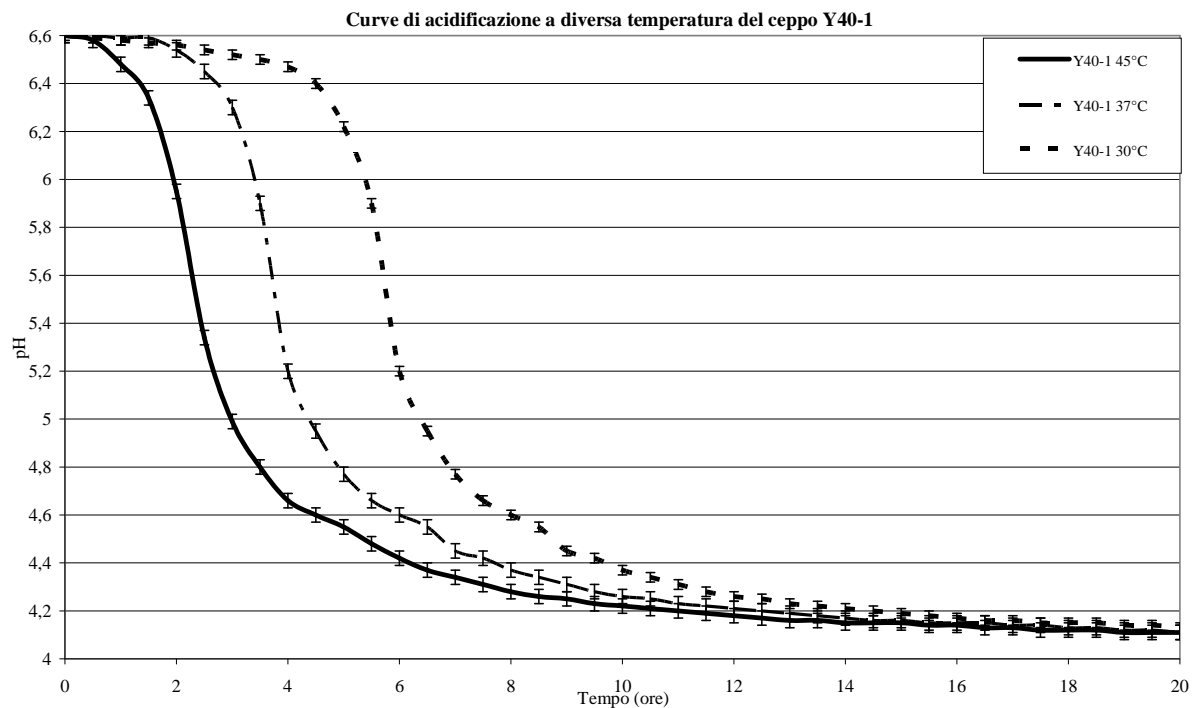


Figura 3.9. Curve di acidificazione del ceppo Y40-1 isolato della matrice Y40.

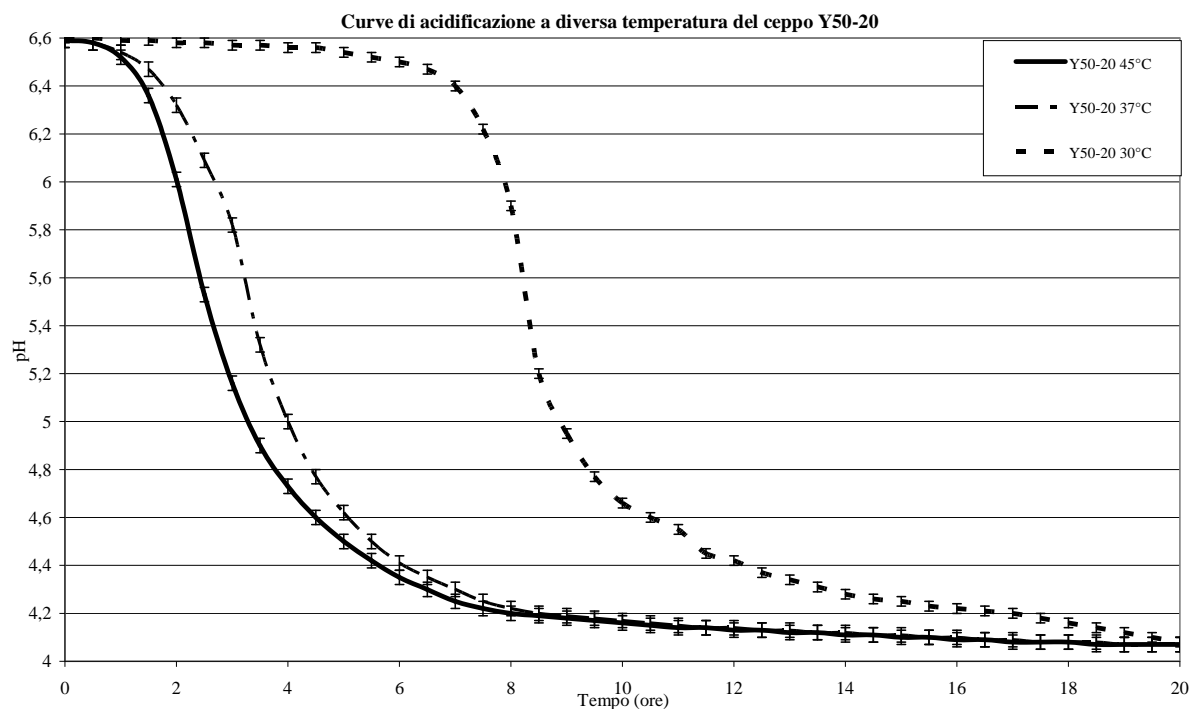


Figura 3.10. Curve di acidificazione del ceppo Y50-15 isolato della matrice Y50.

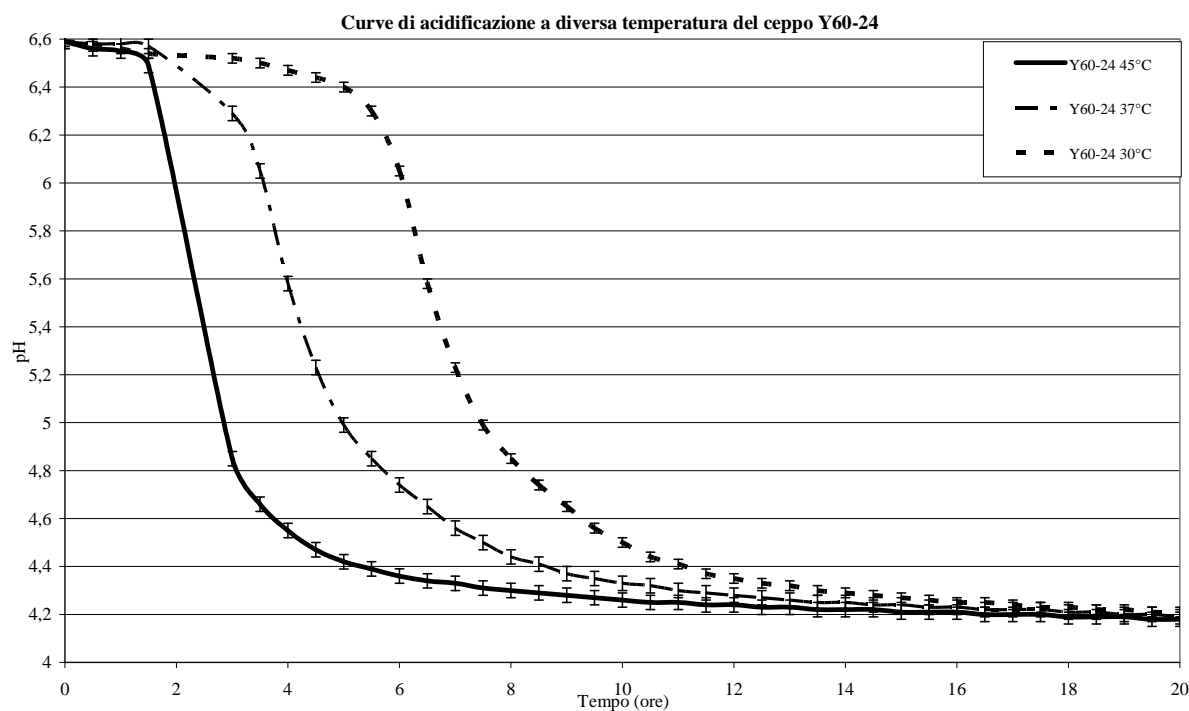


Figura 3.11. Curve di acidificazione del ceppo Y60-24 isolato della matrice Y60.

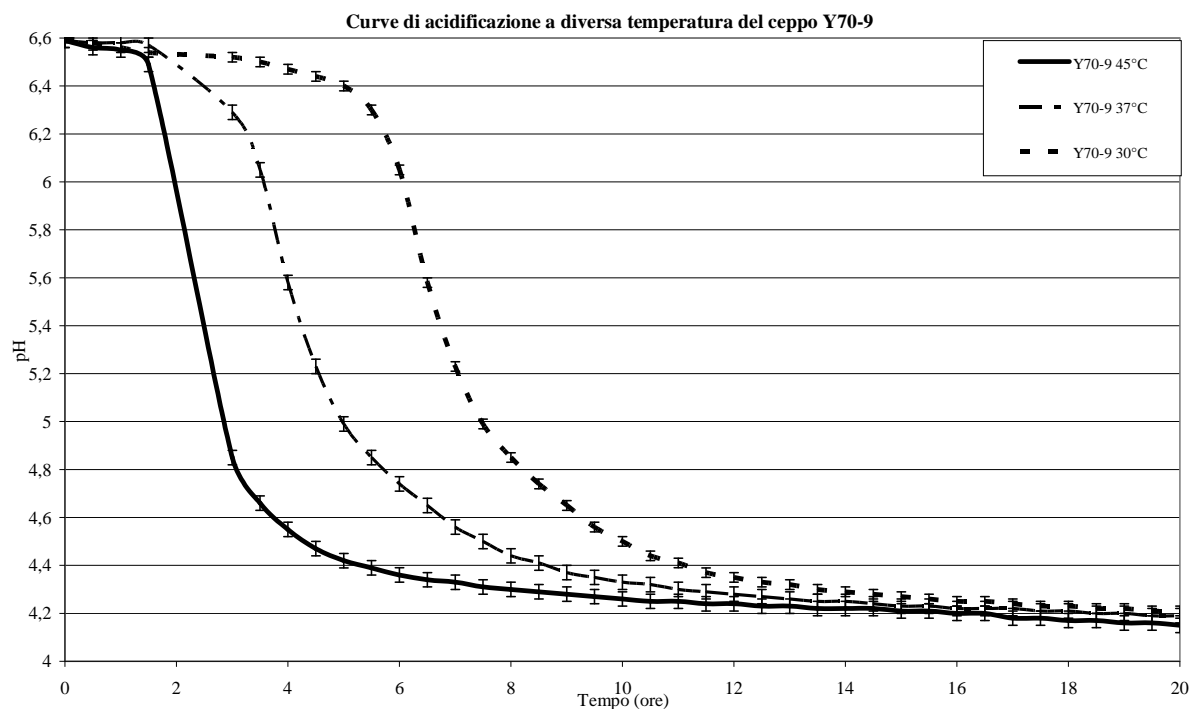


Figura 3.12. Curve di acidificazione del ceppo Y70-9 isolato della matrice Y70.

Quantificazione dell'acido L- lattico

I ceppi afferenti alla specie *S. thermophilus* sono in grado di produrre solo acido L- lattico.

Per ogni coltura di riferimento è stato scelto il ceppo che mostrava la più elevata capacità acidificante durante la fermentazione in skimmed milk, e per ognuno è stato quantificato l'acido L-lattico prodotto durante l'acidificazione, campionando aliquote di latte fermentato a diversi tempi (0, 2, 4, 6 ore di fermentazione) sia a 37 sia a 45°C.

L'incremento di acido L- lattico prodotto dai ceppi è risultato maggiore durante le prime ore della fermentazione particolarmente a 45°C rispetto alla fermentazione a 37°C.

La quantità di acido L- lattico tendeva a stabilizzarsi nella tarda fase di fermentazione, alle 6 ore allineandosi su valori simili alle diverse temperature di fermentazione, come si evince dalla tabelle di seguito riportate.

La quantità di acido L-lattico prodotto nei diversi ceppi è risultata coerente con l'andamento delle curve di acidificazione prodotte a 37 e 45°C: a curve di acidificazione rapide corrispondono elevate quantità di acido lattico prodotto, a curve di acidificazione più lente corrispondevano quantità di acido L-lattico minore.

tempo (h)	Y1-1 (g/L ac. L-lattico)				Y2-6 (g/L ac. L-lattico)				Y3-3 (g/L ac. L-lattico)			
	37°C		45°C		37°C		45°C		37°C		45°C	
	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS
0	0,09	0,2	0,11	0,1	0,12	0,3	0,13	0,2	0,1	0,2	0,12	0,1
2	1,12	0,3	2,34	0,6	2,87	0,2	4,15	0,2	4,3	0,3	5,33	0,3
4	5,58	0,4	5,89	0,8	7,34	0,4	7,56	0,5	8,87	0,1	10,42	0,5
6	7,31	0,5	7,78	0,6	6,65	0,5	8,6	0,6	10,76	0,2	11,56	0,3

Tabella 3.5. Quantità di acido L-lattico prodotto durante la fermentazione a 37 e 45°C.

tempo (h)	Y4-8 (g/L ac. L-lattico)				Y5-10 (g/L ac. L-lattico)				Y10-12 (g/L ac. L-lattico)			
	37°C		45°C		37°C		45°C		37°C		45°C	
	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS
0	0,09	0,1	0,09	0,3	0,09	0,01	0,13	0,02	0,1	0,02	0,12	0,01
2	3,12	0,4	4,12	0,6	1,12	0,03	1,15	0,02	1,3	0,03	1,33	0,03
4	5,58	0,4	5,98	0,4	5,58	0,03	4,56	0,03	6,87	0,01	6,42	0,05
6	8,31	0,6	8,31	0,6	6,31	0,02	6,6	0,03	6,76	0,02	6,56	0,03

Tabella 3.6. Quantità di acido L-lattico prodotto durante la fermentazione a 37 e 45°C

tempo (h)	Y20-15 (g/L ac. L-lattico)				Y30-1 (g/L ac. L-lattico)				Y40-1 (g/L ac. L-lattico)			
	37°C		45°C		37°C		45°C		37°C		45°C	
	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS
0	0,12	0,4	0,12	0,7	0,12	0,2	0,12	0,2	0,1	0,2	0,12	0,01
2	2,47	0,2	2,97	0,2	2,27	0,2	2,87	0,2	2,8	0,3	2,93	0,03
4	6,89	0,5	7,34	0,7	6,3	0,4	7,34	0,3	8,87	0,4	10,42	0,05
6	8,65	0,4	9,65	0,7	9,65	0,6	9,65	0,3	10,76	0,02	11,56	0,03

Tabella 3.7. Quantità di acido L-lattico prodotto durante la fermentazione a 37 e 45°C

tempo (h)	Y50-20 (g/L ac. L-lattico)				Y60-24 (g/L ac. L-lattico)				Y70-9 (g/L ac. L-lattico)			
	37°C		45°C		37°C		45°C		37°C		45°C	
	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS	media	DS
0	0,12	0,02	0,12	0,02	0,12	0,02	0,12	0,02	0,1	0,02	0,12	0,01
2	1,87	0,02	1,87	0,02	1,87	0,02	1,87	0,02	1,3	0,03	1,33	0,03
4	7,34	0,03	7,34	0,03	7,34	0,03	7,34	0,03	8,87	0,01	10,42	0,05
6	9,65	0,03	9,65	0,03	9,65	0,03	9,65	0,03	10,76	0,02	11,56	0,03

Tabella 3.8. Quantità di acido L-lattico prodotto durante la fermentazione a 37 e 45°C

3.2.2 Capacità addensante

Screening per la produzione di EPS

Per tutti gli isolati di streptococchi è stata verificata la capacità di produrre esopolisaccaridi. Il substrato complesso M17g (RR+SM) agar si è rivelato un substrato ottimale per valutare la capacità di produrre EPS.

In base ai risultati ottenuti è stato possibile individuare oltre 200 isolati potenziali produttori di EPS; le colonie sviluppate sul terreno M17g (RR+SM) dopo un periodo di incubazione di circa 48 ore presentavano colorazione bianca, indice di produzione di EPS (**Figura 5.3. Capitolo 5. Immagini**). Solo alcuni isolati sono risultati non produttori di EPS in quanto le colonie presentavano colorazione rosa-rosso sia dopo 48 sia dopo 96 ore di incubazione, indice di assenza di EPS (**Figura 5.3. Capitolo 5. Immagini**). I risultati sono riportati in **Tabella 3.9**.

Campione	Isolati analizzati	N° Isolati EPS+	N° Isolati EPS-
Y1	20	18	2
Y2	20	16	4
Y3	20	19	1
Y4	20	1	2
Y5	30	26	4
Y10	20	19	1
Y20	20	20	0
Y30	20	19	1
Y40	20	28	2
Y50	30	26	4
Y60	30	30	0
Y70	30	30	0

Tabella 3.9. Screening per la produzione di EPS.

La gran parte dei ceppi prodotti è risultata positiva allo screening per la produzione di EPS

Quantificazione di EPS in vitro

Per alcuni ceppi produttori di EPS è stata studiata la quantità di EPS prodotti in substrato sintetico M17 broth, a diverse temperature di incubazione (30, 37, 45°C) eseguendo campionamenti delle brodocolture a diversi tempi (24 - 48 -72- 144 ore di incubazione).

Per ogni matrice di isolamento sono stati scelti alcuni ceppi e sottoposti al test di produzione degli EPS. Nelle tabelle 3.10-3.15 sono riportati i risultati ottenuti da un ceppo per ogni coltura di isolamento. In generale la quantità di EPS prodotta è risultata maggiore alla temperatura intermedia di 37°C, diminuendo a 45°C e con drastica riduzione a 30°C. I ceppi isolati dalle matrici Y1 ed Y2 hanno mostrato scarsa produzione di EPS (**Tabella 3.10**) alle diverse temperature. I ceppi isolati dalle matrici Y3 ed Y4 hanno mostrato elevata produzione di EPS a 37 e 45°C (**Tabella 3.11**). I ceppi isolati dalle matrici Y5 ed Y10 hanno prodotto basse quantità di EPS alle diverse temperature di incubazione (**Tabella 3.12**).

Ceppo	Y1-1 (EPS = gluc. eq. mg/L)						Y2-6 (EPS = gluc. eq. mg/L)					
	30°C		37°C		45°C		30°C		37°C		45°C	
Tempo (h)	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
24	10,8	1,3	20,2	1,6	30,7	0,9	10,3	1,3	20,9	1,5	21,6	1,0
48	20,5	1,4	30,7	1,5	32,7	1	20,4	1,1	25,6	1,6	23,0	0,9
72	22,9	1,3	32,9	1,2	38,4	0,9	23,2	1,9	28,5	1,9	22,8	0,8
144	22,8	1,2	36,9	1,3	40,8	1,3	24,8	1,2	30,1	1,6	26,8	1,05

Tabella 3.10. EPS prodotti in vitro per i ceppi Y1-1 ed Y2-6

Ceppo	Y3-3 (EPS = gluc. eq. mg/L)						Y4-8 (EPS = gluc. eq. mg/L)					
	30°C		37°C		45°C		30°C		37°C		45°C	
Tempo (h)	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
24	19,8	0,7	40,21	1,03	30,7	1,2	30,3	1,3	31,9	1,5	30,6	0,5
48	20,5	1,4	50,7	1,4	40,8	1,4	32,5	1,3	68,6	1,6	40,9	1,3
72	21,7	1,03	50,9	1,1	52,4	1,2	38,2	1,6	70,5	0,4	60,8	1,4
144	35,4	0,02	40,9	1,03	61,7	0,9	38,6	1,2	88,1	1,6	70,8	1,5

Tabella 3.11. EPS prodotti in vitro per i ceppi Y3-3 ed Y4-8

Ceppo	Y5-10 (EPS = gluc. eq. mg/mL)						Y10-12 (EPS = gluc. eq. mg/L)					
	30°C		37°C		45°C		30°C		37°C		45°C	
Tempo (h)	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
24	10,8	1,2	18,1	1,3	19,7	1,2	18,3	1,4	22,9	1,4	16,5	1,4
48	20,5	1,4	22,7	1,4	20,8	1,4	26,4	1,3	26,6	1,3	18,9	1,3
72	19,7	1,2	23,9	1,3	23,5	1,2	28,2	1,1	25,5	1,1	16,7	1,1
144	28,4	1,2	22,9	1,1	22,8	1,2	29,8	1,4	27,1	1,4	17,8	1,4

Tabella 3.12. EPS prodotti in vitro per i ceppi Y5-10 ed Y10-12.

I ceppi isolati dalle matrici Y20 ed Y30 hanno prodotto elevate quantità di EPS soprattutto a 37 e 45°C (Tabella 3.13). Anche i ceppi isolati dalle matrici Y40 ed Y50 (Tabella 3.14) e i ceppi isolati dalle matrici Y60 ed Y70 hanno prodotto buona quantità di EPS a 37 e 45°C (Tabella 3.15).

Ceppo	Y20-15 (EPS = gluc. eq. mg/L)						Y30-1 (EPS = gluc. eq. mg/L)					
	30°C		37°C		45°C		30°C		37°C		45°C	
Tempo (h)	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
24	18,8	1,3	40,1	1,1	38,8	1,2	30,2	1,3	41,9	1,5	30,6	0,5
48	22,5	1,1	51,4	1,9	49,7	1,4	33,4	2,0	54,6	1,6	49,9	0,9
72	28,9	1,9	56,9	1,3	54,4	1,2	32,2	2,6	55,5	1,4	61,8	1,4
144	32,8	1,2	62,9	2,3	48,8	0,9	31,8	2,2	67,1	1,6	68,8	1,5

Tabella 3.13. EPS prodotti in vitro per i ceppi Y5-10 ed Y10-12.

Ceppo	Y40-1 (EPS = gluc. Eq. mg/L)						Y50-2 0(EPS = gluc. Eq. mg/L)					
	30°C		37°C		45°C		30°C		37°C		45°C	
Tempo (h)	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
24	10,32	1,3	30,3	1,1	31,3	1,5	22,2	1,3	31,6	0,9	28,8	1,3
48	20,54	1,1	58,6	1,9	60,6	1,6	28,6	1,4	42,8	0,8	34,8	1,3
72	30,22	1,9	65,5	1,3	63,0	1,4	31,7	1,3	45,7	1,0	36,3	0,9
144	30,68	1,2	72,1	1,4	71,0	1,1	32,5	1,0	48,6	1,3	46,5	1,0

Tabella 3.14. EPS prodotti in vitro per i ceppi Y40-1 ed Y50-20.

Ceppo	Y60-24 (EPS = gluc. Eq. mg/L)						Y70-9 (EPS = gluc. Eq. mg/L)					
	30°C		37°C		45°C		30°C		37°C		45°C	
Tempo (h)	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS	Media	DS
24	10,1	1,2	25,3	1,2	28,4	1,2	22,1	1,2	36,6	1,3	41,7	1,2
48	21,5	1,6	31,9	1,3	36,7	1,1	26,6	1,1	48,7	1,2	50,7	1,4
72	22,8	1,4	45,1	1,2	38,9	1,4	28,7	1,2	56,9	1,4	60,3	1,3
144	23,6	0,9	67,5	1,2	45,8	1,4	31,5	1,4	58,4	1,3	63,5	1,2

Tabella 3.15. EPS prodotti in vitro per i ceppi Y40-1 ed Y50-20.

Valutazione degli EPS *in situ*

La produzione di EPS prodotti *in situ* è stata valutata per mezzo del Funnel Test condotto su latte fermentato a diverse temperature (30, 37, 45°C). Il test ha stimato il tempo di scorrimento (flow-time) di 100 mL di campione all'interno di un imbuto separatore. Il campione era costituito da latte fermentato con i singoli ceppi fino al raggiungimento sia di pH 4,70 sia di pH 4,50.

L'aumento di viscosità del latte fermentato, in relazione alla quantità di EPS prodotti dai ceppi di streptococchi, ha determinato l'aumento del tempo di scorrimento attraverso l'imbuto.

Il test ha messo in evidenza come alle temperature di 37 e 45°C i campioni in generale presentino maggiore viscosità, mentre l'abbassamento di temperatura ha determinato una riduzione del valore di viscosità, a conferma dell'esito delle prove condotte *in vitro*.

Il test, condotto a due diversi valori di pH del latte fermentato, ha evidenziato come l'abbassamento del pH, in relazione al maggior tempo di fermentazione, ha determinato un aumento del valore di viscosità nei campioni analizzati.

I campioni di latte fermentato che hanno presentato i valori migliori di viscosità sono stati ottenuti con i ceppi Y3-3, Y4-8, Y20-15 ed Y40-1 (**Tabella 3.16**).

pH finale	pH4,7 (Viscosità= flow-time (sec) x 100 ml campione)			pH4,5 (Viscosità= flow-time (sec) x 100 ml campione)		
	30°C	37°C	45°C	30°C	37°C	45°C
Temper./Ceppo						
Y1-1	200-250	250-300	260-300	260-300	300-200	300-350
Y2-6	300-320	340-490	480-520	360-400	400-440	450-490
Y3-3	600-650	700- 750	740 - 780	600-650	700- 750	740 - 780
Y4-8	800-900	1000-1100	1000-1100	800-900	1000-1100	1000-1100
Y5-10	220-250	350-400	400 - 450	250-290	350-400	400 - 450
Y10-12	200-250	250-300	260-300	260-300	300-200	300-350
Y20-15	600-650	700- 750	750 - 800	600-650	750- 800	800 - 850
Y30-1	340-350	470-490	480-500	360-370	440-450	450-460
Y40-1	800-900	1000-1100	1000-1100	800-900	1000-1100	1000-1100
Y50-20	200-250	250-300	260-300	260-300	300-200	300-350
Y60-24	300-350	400-450	450-500	350-400	400-450	450-460
Y70-9	340-350	470-490	480-500	360-370	440-450	450-460

Tabella 3.16. Valori di viscosità rilevati in campioni di latte fermentato ottenuto con diversi ceppi produttori di EPS. La viscosità è stata determinata mediante Funnel test consideranti due diversi valori di pH 4.70 e 4.50 e diverse temperature di fermentazione 30, 37, 45°C.

3.2.3 Capacità proteolitica

La capacità proteolitica è stata valutata mediante test in piastre in SMA. Gran parte dei ceppi analizzati hanno mostrato alone di chiarificazione evidente in SMA (**Figura 5.4 – Capitolo 5. Immagini**) ed è stato possibile dedurre che si tratta di ceppi proteolitici.

I risultati per ogni matrice di isolamento sono riportati in **Tabella 3.17**. Gran parte degli isolati ottenuti sono risultati proteolitici.

Campione	Isolati analizzati	Prot+	Pro-
Y1	20	16	4
Y2	20	15	5
Y3	20	15	5
Y4	20	18	2
Y5	30	26	4
Y10	20	14	6
Y20	20	16	3
Y30	20	13	7
Y40	20	18	2
Y50	30	26	4
Y60	30	24	6
Y70	30	24	6

Tabella 3.17. Screening per la capacità proteolitica delle coltura analizzate. (Prot+) i ceppi che hanno mostrato alone di chiarificazione in piastre (Prot-) i ceppi che non hanno mostrato alone di chiarificazione in piastra.

3.2.4 Capacità aromatizzante

Tra i ceppi oggetto di studio sono stati selezionati quelli con performance protecnologiche più interessanti per la valutazione della produzione di sostanze aromatizzanti.

In **Tabella 3.18** è stato riportato l'esito del test di valutazione per la produzione di composti aromatici in grado di reagire con α -naftolo.

Gran parte dei ceppi analizzati hanno mostrato esito positivo con formazione di colore rosa-rosso (**Figura 5.5 – Capitolo 5. Immagini**).

Temperatura di fermentazione Ceppo	30°C	37°C	45°C
Y1-1	-	-	-
Y2-6	-	-	-
Y3-3	+	+	+
Y4-8	+	+	+
Y5-10	-	-	-
Y10-12	+	+	+
Y20-15	+	+	+
Y30-1	+	+	+
Y40-1	+	+	+
Y50-20	-	-	-
Y60-24	+	+	+
Y70-9	+	+	+

Tabella 3.18. Screening per la capacità aromatizzante. (+) i ceppi che hanno reagito con α -naftolo dando colorazione rosa-rosso (-) i ceppi che non hanno reagito con α -naftolo.

3.2.5 Selezione di batteriofagi specifici e valutazione di *host-range*

Il processo di selezione di batteriofagi ha portato alla selezione solo di pochi batteriofagi specifici per ogni coltura. Normalmente i ceppi produttori di EPS sono meno sensibili all'attacco di batteriofagi per la presenza all'esterno degli EPS.

I batteriofagi selezionati per i ceppi di maggiore interesse sono riportati in **Tabella 3.19**.

Ceppo	Batteriofagi isolati
Y3-3	2
Y4-8	2
Y20-15	2
Y30-1	2
Y40-1	1
Y50-20	1
Y60-24	1

Tabella 3.19. Batteriofagi selezionati per i singoli ceppi specifici.

I batteriofagi selezionati sono stati impiegate in prove di *host-range* tra i diversi ceppi.

L'esito delle prove è riportato in **Tabella 3.20**. Le prove hanno indicato una elevata specificità di reazione tra i batteriofagi isolati per un singolo ceppo e il ceppo stesso, infatti non sono state riscontrate reazioni incrociate tra altri batteriofagi e il ceppi stessi.

FAGO Ceppo	F Y3-3	F Y4-8	F Y20-15	F Y30-1	F Y40-1	F Y50-20
Y3-3	+	-	-	-	+	-
Y4-8	-	+	-	+	-	-
Y20-15	-	-	+	-	+	-
Y30-1	-	-	+	+	-	-
Y40-1	-	-	+	-	+	-
Y50-20	-	-	-	-	-	+

Tabella 3.20. Esito delle prove di *host-range* tra ceppi selezionati

A conferma dell'avvenuto attacco fagico tra batteriofago specifico e singolo ceppo e conseguente lisi cellulare sono state effettuate fotografie al microscopio (**Figura 5.5-Capitolo 5 – Immagini**).

3.3 Produzione industriale di batteri lattici

Alcuni ceppi di streptococchi che hanno mostrato interessanti parametri tecnologici, quali buona o elevata capacità acidificante, buona o elevata capacità di produrre EPS, capacità proteolitica ed aromatizzante, sono stati impiegati in prove di simulazione del processo industriale per verificarne la possibile industrializzazione su larga scala.

Le modalità di conduzione dei processi, composizione dei substrati e i parametri di controlli presi in considerazione sono stati forniti dall'azienda Mediterranea Biotecnologie srl.

3.3.1 Fermentazioni di laboratorio

Le fermentazioni attuate su scala laboratorio sono state condotte in substrato a base di skimmed milk arricchito con fattori di crescita (substrato semi-definito). Per la fermentazione è stato impiegato un inoculo all'1% di una coltura precedentemente riattivata. Il tempo di fermentazione è stato mediamente di 2-2,5 ore.

Le crescita ottimale delle colture è stata ottenuta a temperatura > di 40°C e la massima carica microbica ottenuta per ogni coltura è stata riportata in **Tabella 3.21** e **Tabella 3.22**. Per tutte le colture sono state raggiunte cariche microbiche >1x10⁸ ufc/ml.

Ceppo	Y1-1	Y2-6	Y3-3	Y4-8	Y5-10	Y10-12
Tempo (h)	2,5	2	2	2	3	2
Massima carica (ufc/ml)	11x10 ⁸ ±0,2	10x10 ⁸ ±0,2	8x10 ⁸ ±0,1	9x10 ⁸ ±0,1	4,6x10 ⁸ ±0,1	4,6x10 ⁸ ±0,2

Tabella 3.21.Massima carica microbica raggiunta in laboratorio per Y1-1, Y2-6, Y3-3, Y4-8, Y5-10, Y10-12.

Ceppo	Y20-15	Y30-1	Y40-1	Y50-20	Y60-24	Y70-9
Tempo (h)	2	2	2	2	2	2
Massima carica (ufc/ml)	9,5x10 ⁸ ±0,1	6,6x10 ⁸ ±0,1	8,5x10 ⁸ ±0,1	11x10 ⁸ ±0,1	5,6x10 ⁸ ±0,1	7,3x10 ⁸ ±0,1

Tabella 3.22.Massima carica microbica raggiunta in laboratorio per Y20-15, Y30-1, Y40-1, Y50-20, Y60-24, Y70-9.

3.3.2 Fermentazioni industriali

Le fermentazioni sono state attuate su fermentatore pilota da 15L (Chemap) riportato in **Figura 5.6 – Capitolo 5. Immagini**; le fermentazioni sono state condotte impiegando substrato industriale semi-definito adatto allo sviluppo di streptococchi fornito dall'azienda .

Per la fermentazione è stato impiegato un inoculo al 10% di una coltura precedente; la fermentazione è stata condotta a temperatura > di 40°C.

Le crescita massima in fermentatore è stata raggiunta mediamente dopo 3 ore di fermentazione e la massima carica raggiunta per ogni ceppo è stata riportata nelle **tabelle 3.23 e 3.24**.

Ceppo	Y1-1	Y2-6	Y3-3	Y4-8	Y5-10	Y10-12
Massima carica (ufc/ml)	$9 \times 10^9 \pm 0,3$	$8 \times 10^9 \pm 0,2$	$10 \times 10^9 \pm 0,3$	$11 \times 10^9 \pm 0,2$	$6 \times 10^9 \pm 0,1$	$7 \times 10^9 \pm 0,2$

Tabella 3.23.Massima carica microbica raggiunta in fermentatore industriale per Y1-1, Y2-6, Y3-3, Y4-8, Y5-10, Y10-12.

Ceppo	Y20-15	Y30-1	Y40-1	Y50-20	Y60-24	Y70-9
Massima carica (ufc/ml)	$8 \times 10^9 \pm 0,1$	$9 \times 10^9 \pm 0,1$	$7 \times 10^9 \pm 0,2$	$10 \times 10^9 \pm 0,1$	$9 \times 10^9 \pm 0,1$	$7 \times 10^9 \pm 0,2$

Tabella 3.24.Massima carica microbica raggiunta in fermentatore industriale per Y20-15, Y30-1, Y40-1, Y50-20, Y60-24, Y70-9.

3.3.3 Concentrazione e liofilizzazione

Per completare il processo industriale le colture sono state centrifugate con ultracentrifuga, per l'allontanamento dei residui colturali; il pellet cellulare è stato risospeso in opportuno crio-protettore fornito dall'azienda e liofilizzato in liostato pilota fino a completo allontanamento dell'acqua dal campione (umidità residua del 2-3%).

Le cariche microbiche raggiunte con la concentrazione e dopo la liofilizzazione sono riportate in **Tabella 3.25** e **Tabella 3.26**.

Ceppo	Y1-1	Y2-6	Y3-3	Y4-8	Y5-10	Y10-12
Carica microbica dopo concentrazione (ufc/ml)	$32 \times 10^9 \pm 1,2$	$28 \times 10^9 \pm 2$	$36 \times 10^9 \pm 0,3$	$24 \times 10^9 \pm 1,8$	$27 \times 10^9 \pm 2,1$	$31 \times 10^9 \pm 2,2$
Carica microbica dopo liofilizzazione (ufc/gr)	$160 \times 10^9 \pm 5$	$180 \times 10^9 \pm 7$	$190 \times 10^9 \pm 4$	$220 \times 10^9 \pm 8$	$120 \times 10^9 \pm 10$	$27 \times 10^9 \pm 7$

Tabella 3.25. Massima carica microbica raggiunta in fermentatore industriale per Y1-1, Y2-6, Y3-3, Y4-8, Y5-10, Y10-12.

Ceppo	Y20-15	Y30-1	Y40-1	Y50-20	Y60-24	Y70-9
Carica microbica dopo concentrazione (ufc/ml)	$32 \times 10^9 \pm 1,2$	$28 \times 10^9 \pm 2$	$36 \times 10^9 \pm 0,3$	$24 \times 10^9 \pm 1,8$	$27 \times 10^9 \pm 2,1$	$31 \times 10^9 \pm 2,2$
Carica microbica dopo liofilizzazione (ufc/gr)	$160 \times 10^9 \pm 5$	$180 \times 10^9 \pm 7$	$220 \times 10^9 \pm 4$	$240 \times 10^9 \pm 8$	$190 \times 10^9 \pm 12$	$31 \times 10^9 \pm 7$

Tabella 3.26. Massima carica microbica raggiunta in fermentatore industriale per Y20-15, Y30-1, Y40-1, Y50-20, Y60-24, Y70-9.

Alcuni liofilizzati ottenuti su scala pilota sono stati impiegati in formulazioni di starter per la produzione di yogurt ad ulteriore verifica del mantenimento delle caratteristiche tecnologiche verificate per i ceppi prima dell'industrializzazione.

3.4 Valutazione di colture liofilizzate per la produzione di yogurt

Tra i ceppi individuati in questo nello studio quelli che hanno presentato caratteristiche tecnologiche interessanti ed una buona industrializzabilità sono stati impiegati come componenti di colture starter per la produzione industriale di yogurt.

I ceppi Y3-3, Y4-8, Y20-15 ed Y40-1 sono stati impiegati nella formulazione delle miscele A, B, C e D. Le formulazioni finali delle colture starter sono state definite dall'azienda Mediterranea Biotecnologie e di queste sono state effettuate verifiche delle caratteristiche tecnologiche principali.

3.4.1 Capacità acidificante

Per le miscele A, B, C e D sono state definite le curve di acidificazione alle temperature di 30, 37 e 45°C per verificarne le caratteristiche di acidificazione,.

Le curve di acidificazione delle quattro miscele studiate hanno mostrato un rapido decremento a 37 e 45°C ma un forte rallentamento a 30°C.

Il comportamento di acidificazione delle miscele è stato coerente rispetto alle caratteristiche riscontrate nei ceppi che costituiscono le miscele.

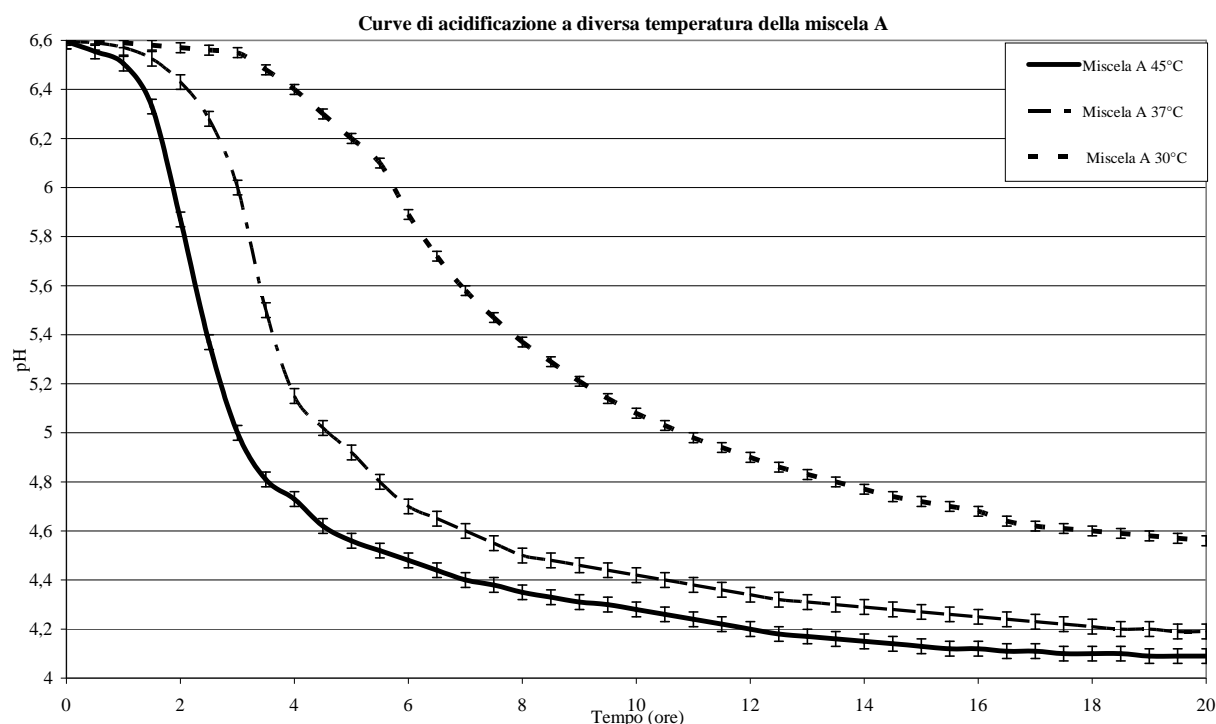


Figura 3.13. Curve di acidificazione della miscela A contenente il ceppo Y3-3 isolato della matrice Y3.

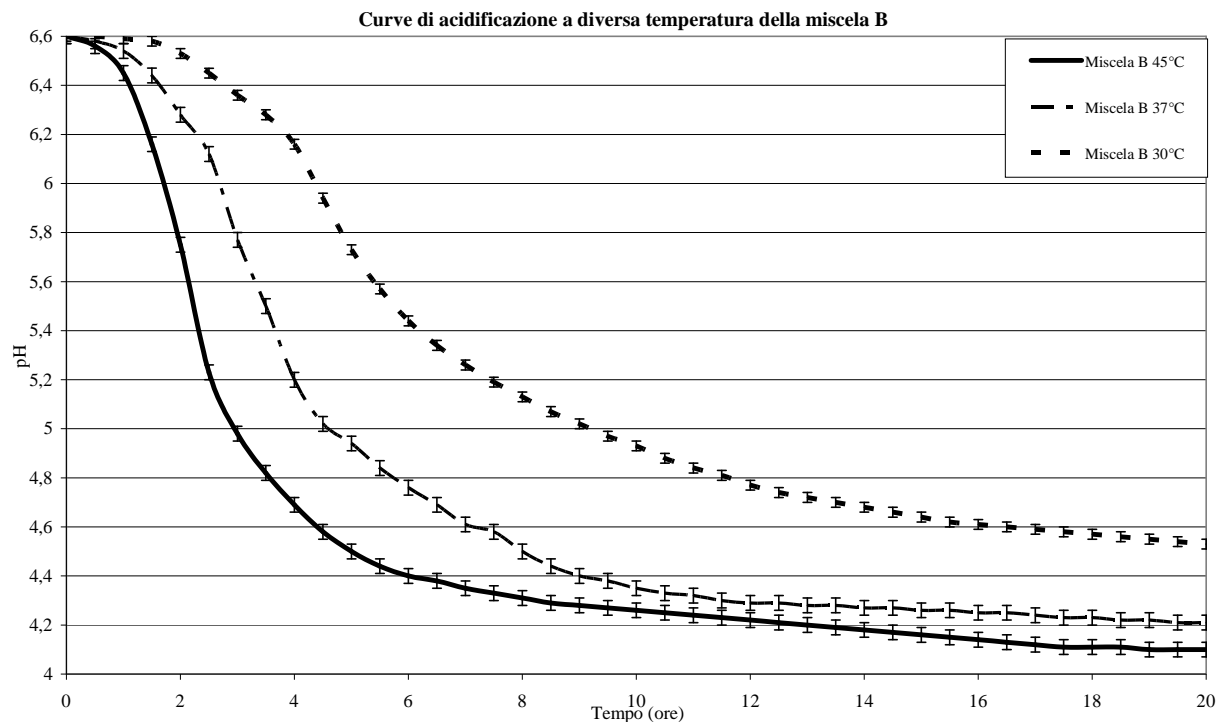


Figura 3.14. Curve di acidificazione della miscela B contenente il ceppo Y4-8 isolato della matrice Y4.

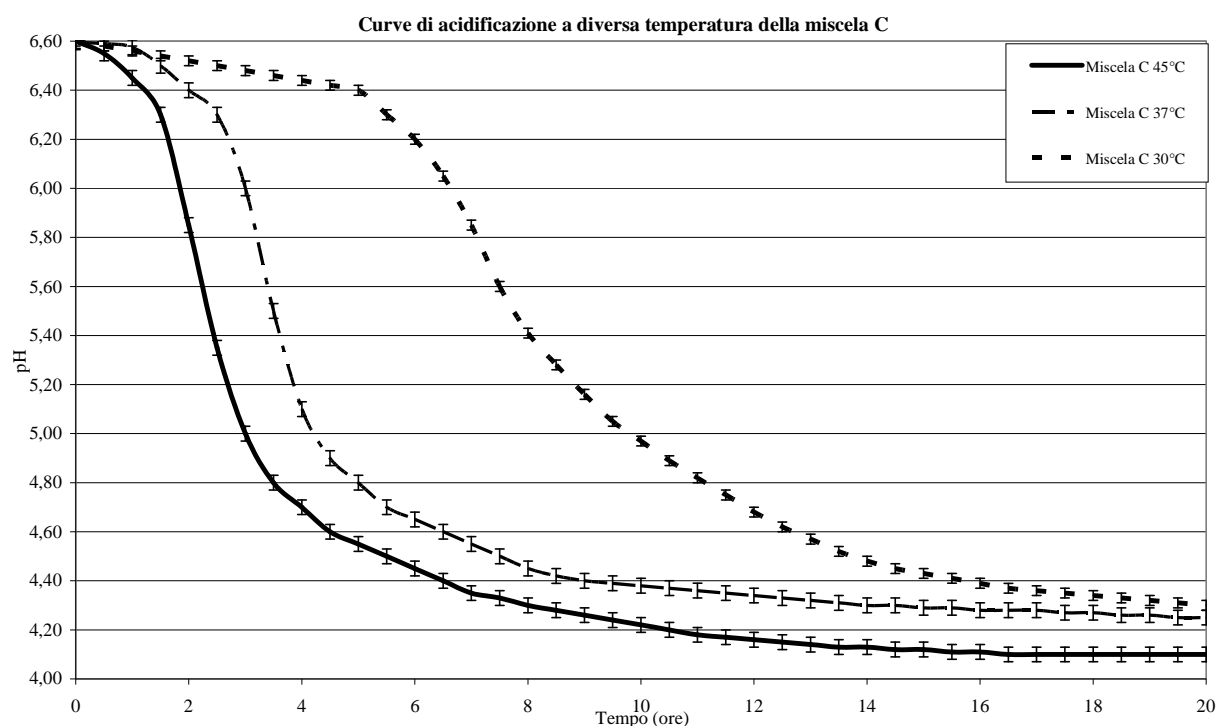


Figura 3.15. Curve di acidificazione della miscela C contenente il ceppo Y20-15 isolato della matrice Y20.

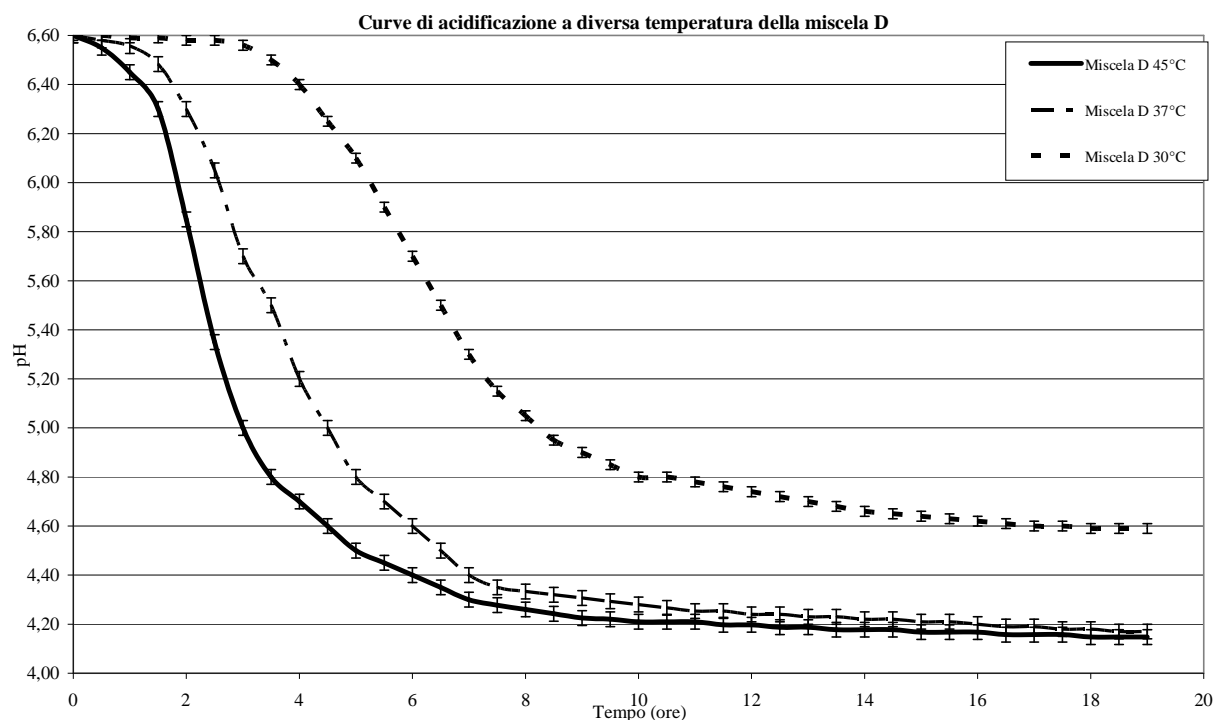


Figura 3.16. Curve di acidificazione della miscela D contenente il ceppo Y40-1 isolato della matrice Y40.

3.4.2 Capacità addensante

Il test ha evidenziato come alle temperature di 37 e 45°C le colture starter presentavano elevati valori di viscosità, mentre l'abbassamento della temperatura di fermentazione ha avuto influenza negativamente sulla viscosità dei campioni.

Il test, condotto a due diversi valori di pH del latte fermentato, ha inoltre evidenziato come l'abbassamento del pH abbia influenzato positivamente l'aumento del valore di viscosità nel latte fermentato.

I valori riportati per le singole miscele studiate sono stati riferiti in **Tabella 3.27**.

pH finale	pH4,7 (Viscosità= flow-time (sec) x 100 ml campione)			pH4,5 (Viscosità= flow-time (sec) x 100 ml campione)		
	30°C	37°C	45°C	30°C	37°C	45°C
Temper./ Miscela						
A	400-500	700- 800	600- 700	500-600	700- 800	700 - 780
B	800-900	900-1000	1000-1100	800-900	1000-1100	1000-1100
C	400-500	700- 800	600- 700	500-600	700- 800	700 - 780
D	800-900	1000-1100	1000-1100	800-900	1000-1100	1000-1100

Tabella 3.27. Valori di viscosità riscontrati nei campioni di latte fermentato ottenuto con le diverse miscele.

3.4.3 Capacità aromatizzante

La capacità aromatizzante delle miscele è stata valutata misurando la quantità di acetaldeide prodotta dalla coltura starter dopo 6 ore di fermentazione. La quantità di acetaldeide prodotta è stata determinata mediante Kit enzimatico per la determinazione quantitativa di acetaldeide (Steroglass, Perugia, Italia).

La quantità di aldeide acetica prodotta in latte fermentato è risultata maggiore alla temperatura di fermentazione di 45°C mentre sono stati riscontrati valori inferiori alla temperatura di fermentazione di 37°C.

Temperatura Miscela	37°C	45°C
A	12,2 ±0,7	18,1 ±1
B	9,8 ±0,5	15,5 ±0,8
C	10,2 ±0,8	17,4 ±0,9
D	9,5 ±0,5	16,2 ±0,7

Tabella 3.28. Acetaldeide prodotta in latte fermentato ottenuto con le diverse miscele.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente progetto di dottorato ha inteso selezionare e valutare sotto diversi aspetti tecnologici ceppi di batteri lattici, afferenti alla specie *Streptococcus thermophilus*, da impiegare per la produzione di yogurt, anche procedendo alla verifica del loro contributo nella formulazione di starter microbici selezionati per la produzione di yogurt.

Lo studio delle caratteristiche tecnologiche dei ceppi e la verifica della loro espressione in condizioni il più possibile vicine a quelle tecnologiche-applicative sono alla base del processo di selezione dei ceppi candidati a diventare componenti di uno starter microbico.

Tale processo può essere rappresentato da un flusso di attività ad “imbuto” , in cui partendo dalla ricerca di biodiversità all’interno di matrici alimentari, notoriamente ricche di variabilità di specie e di ceppi, si selezionano le specie ed i ceppi che presentano caratteristiche metaboliche più utili alla conduzione della fermentazione per la produzione dell’alimento in condizioni controllate (**Figura 4.1**).

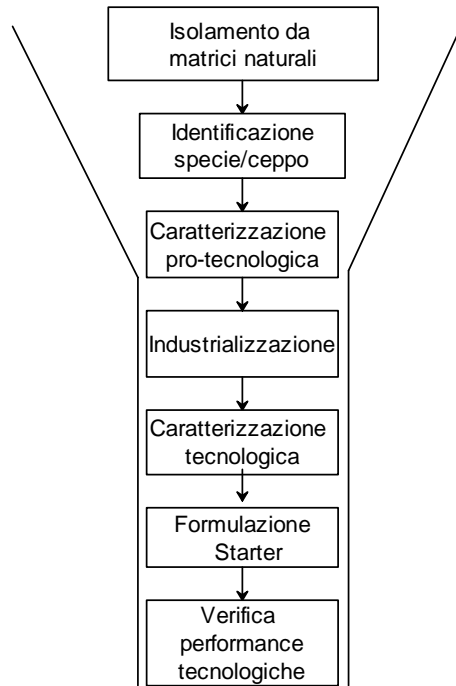


Figura 4.1. Flusso del processo di selezione e ottenimento di uno starter microbico.

Nella fase preliminare dello studio numerose matrici sono state impiegate per la selezione di ceppi appartenenti a *Streptococcus thermophilus*, in particolare 12 differenti colture naturali per la produzione di lattici fermentati sono state analizzate alla ricerca di differenti ceppi, che possedessero caratteristiche genotipiche e tecnologiche diverse.

Per agevolare il lavoro iniziale di identificazione è stata utilizzata la tecnica molecolare di PCR-DGGE che si è dimostrata molto utile in quanto ha permesso di gestire l'analisi dei numerosi isolati in tempi relativamente brevi. Mentre per la discriminazione biomolecolare dei ceppi la tecnica utilizzata la RAPD-PCR ha permesso la biotipizzazione dei diversi ceppi.

Tra i numerosi isolati 20 ceppi hanno mostrato proprietà protecnologiche interessanti, tra questi ne sono stati scelti 12 sui quali si è incentrato il lavoro di caratterizzazione tecnologica e di industrializzazione per verificarne le effettive potenzialità nell'impiego quali starter microbici.

La principale caratteristica che un ceppo di *S. thermophilus*, da impiegare nella produzione di yogurt, deve possedere consiste nella capacità di produrre quantità importanti di acido lattico.

Come constatato studiando l'acidificazione dei 12 ceppi selezionati alle temperature più elevate di fermentazione (37 – 45°C) le curve sigmoidee di acidificazione presentavano pendenze molto elevate dalla seconda alla quarta ora di fermentazione, ad eccezione dei ceppi Y5-10 ed Y10-12 che sono risultati più lenti.

Tale comportamento è stata rilevato in maniera analoga quantificando l'acido L-lattico prodotto dalle colture e valutando l'incremento dalla seconda alla quarta ora di fermentazione. A 37°C è stato osservato un incremento da 2 a 8 g/L di acido lattico, una produzione inferiore è stata rilevata solo per i ceppi Y5-10 ed Y10-12. A 45°C la quantità di acido lattico prodotta è aumentata da 3 a 10 g/L per i diversi ceppi mentre sempre inferiore è stata la produzione dei ceppi Y5-10 ed Y10-12.

Altra caratteristica fondamentale che devono possedere i ceppi di *S. thermophilus* impiegati nella produzione di yogurt è la capacità di produrre esopolisaccaridi (EPS), in quanto la produzione di questi composti influenza direttamente le proprietà reologiche del latte fermentato prodotto (Ruas-Mediedo & de los Reyes-Gavilán, 2005). Caratteristiche quali la densità, la viscosità e l'elasticità dello yogurt sono infatti conferite sia dalla quantità di EPS prodotti sia dalla tipologia di EPS prodotti, in termini di composizione di monomeri, lunghezza e ramificazione dei polimeri ((Ruas-Mediedo & de los Reyes-Gavilán, 2005).

In questo studio è stata presa in considerazione preliminarmente la quantità di EPS prodotta *in vitro* in un terreno liquido per poter meglio isolare e purificare gli EPS prodotti.

In generale tutti ceppi hanno prodotto buone quantità di EPS a 37 e 45°C passando da 20 a 90 mg/L di EPS prodotti a tempi diversi; scarsa produzione di EPS è stata riscontrata a 30°C, temperatura a cui sono stati determinati da 20 a 40 mg/L di EPS.

Le temperatura intermedia di 37°C ha favorito in diversi ceppi la produzione di EPS.

Per poter valutare le caratteristiche reologiche indotte dai singoli ceppi allo yogurt è stato impiegato come substrato di riferimento lo skimmed milk. La particolare metodica analitica utilizzata ha permesso di valutare l'effetto addensante in latte, dopo fermentazione, mettendo in luce le potenzialità di ogni ceppo nell'imprimere caratteristiche reologiche particolari al latte.

A valori di viscosità di 200-500 secondi anche se il latte fermentato risultava fluido presentava già una struttura densa e compatta (ceppi Y1-1, Y2-6, Y5-10, Y10-12, Y60-24, Y70-9); a valori di viscosità intermedi di 500-700 secondi il latte fermentato risultava meno fluido e presentava una struttura più densa e compatta (ceppi Y3-3, Y20-15); a valori più alti di viscosità di 800 – 1000 secondi il latte fermentato è molto meno fluido e la struttura è fortemente compatta e densa (Y4-8 ed Y40-1).

Per approfondire la caratterizzazione dei ceppi sono stati condotti test che hanno permesso di individuare i ceppi con caratteristiche proteolitiche e con un buon potenziale aromatizzante.

Ulteriore discriminante per i dodici ceppi è stata la differente risposta fagica verificata *in vitro*, a conferma dal fatto che si tratta di ceppi con caratteristiche e proprietà differenti tra loro.

Per i dodici ceppi di *S. thermophilus* selezionati è stato quindi comprovato sulla base delle caratteristiche pro-tecnologiche individuate che si trattava di ottimi candidati all'impiego nella produzione di yogurt.

Per il completamento del processo di valutazione i dodici ceppi sono stati sottoposti a prove di industrializzazione su scala pilota.

In tutte le fasi del processo industriale sperimentato, fino all'ottenimento di un prodotto liofilizzato, i ceppi hanno dimostrato di mantenere cariche vitali molto elevate.

Per ogni ceppo dopo la liofilizzazione sono state confermate tutte le *performances* tecnologiche valutate prima del processo di industrializzazione. Questo a conferma della stabilità delle *performances* e delle caratteristiche tecnologiche espresse dai ceppi.

Per confermare ulteriormente le potenzialità dei ceppi in vista di un loro impiego quali starter microbici alcuni di questi sono stati impiegati come componenti nella formulazione di starter microbici per la produzione di yogurt. Ogni ceppi è stato standardizzato secondo le esigenze dell'azienda Mediterranea Biotecnologie srl per la formulazione delle miscele definite.

Come evidenziato dalle prove tecnologiche condotte sulle miscele formulate i ceppi di *S. thermophilus* presenti tra gli altri componenti delle miscele sono stati in grado di

imprimere caratteristiche tecnologiche simili a quelle verificate per ogni singolo ceppo.

Il lavoro attuato per il progetto di dottorato può essere ritenuto soddisfacente considerando che il processo di selezione dalle matrici iniziali e la valutazione dei ceppi isolati ha portato all'individuazione di ceppi interessanti per la composizione di uno starter microbico per la fermentazione di yogurt.

Alcuni dei ceppi studiati stanno già seguendo o seguiranno il loro percorso di starter nella conduzione di fermentazione per la produzione di yogurt proprio come era cominciato il loro cammino.

Il presente lavoro è umilmente espressione della continua ricerca, valorizzazione e mantenimento della biodiversità, risorsa essenziale di ogni sistema.

5. IMMAGINI

Figura 5.1 Profili elettroforetici DGGE delle colture analizzate

Figura 5.1a. DGGE Coltura Y1.

- 1) DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
- 2-13) DGGE isolati campione Y1
- 14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1

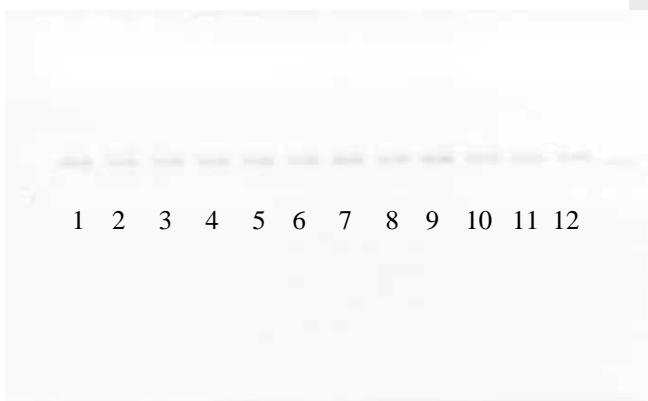
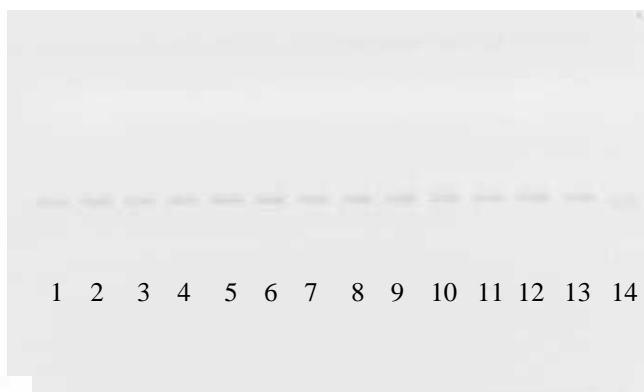


Figura 5.1b. DGGE Coltura Y2.

- 1) DGGE *S. thermophilus* Y1-1
- 2-11) DGGE isolati campione Y2
- 12) DGGE *S. thermophilus* Y1-1

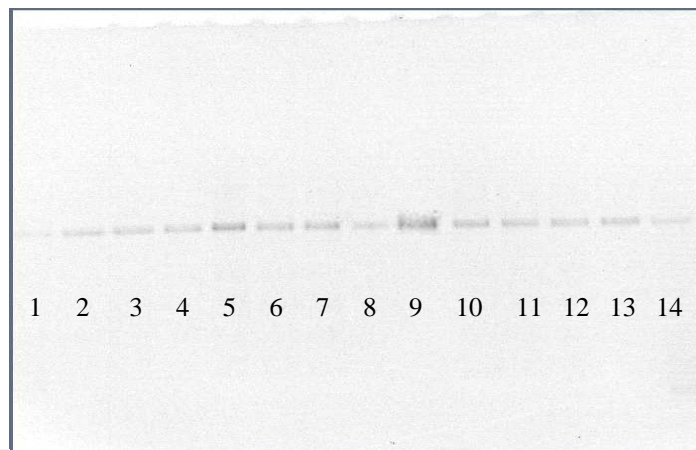


Figura 5.1c. DGGE Coltura Y3.

- 1) DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
- 2-13) DGGE isolati campione Y3
- 14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1

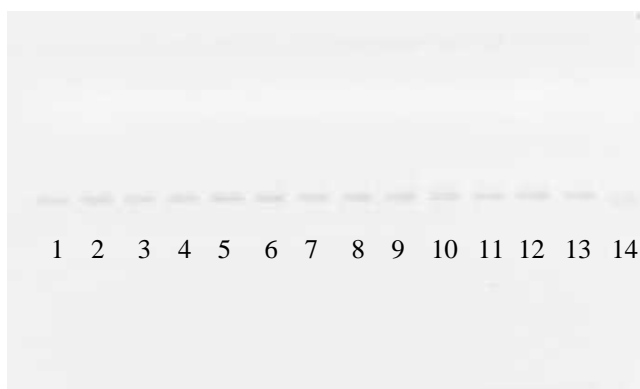
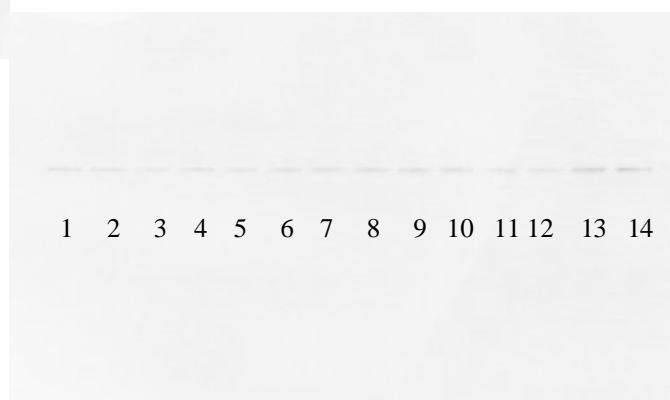


Figura 5.1d. DGGE Coltura Y4.

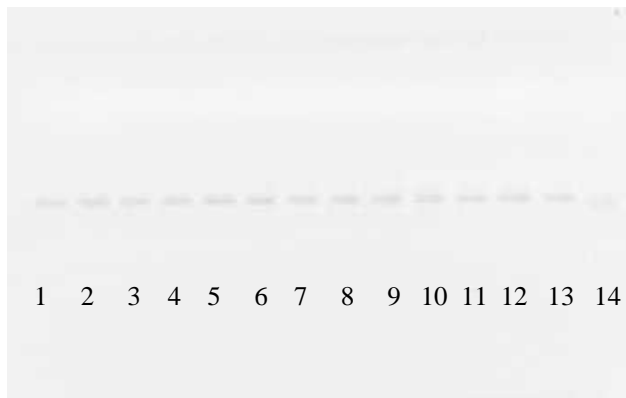
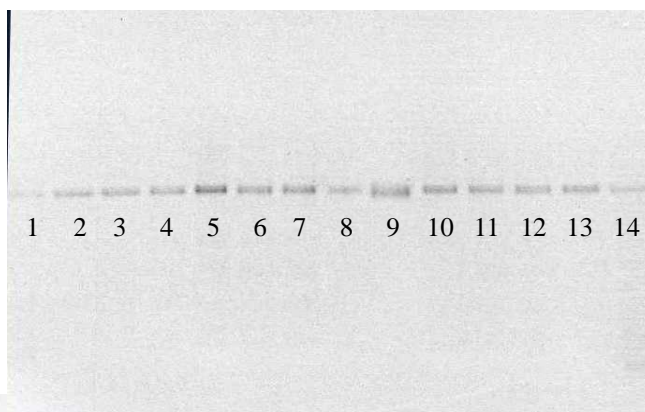
- 1) DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
- 2-13) DGGE isolati campione Y4;
- 14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.

Figura 5.1e. DGGE Coltura Y5.

- 1) DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
- 2-13) DGGE isolati campione Y5;
- 14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.

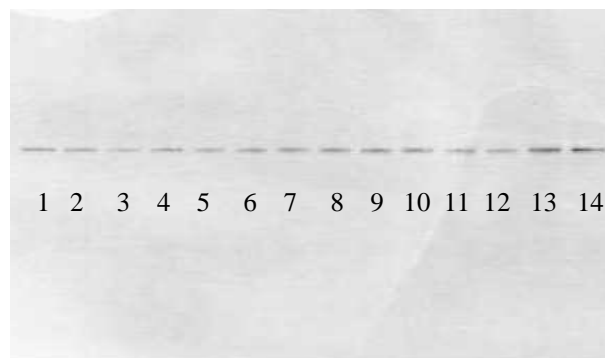
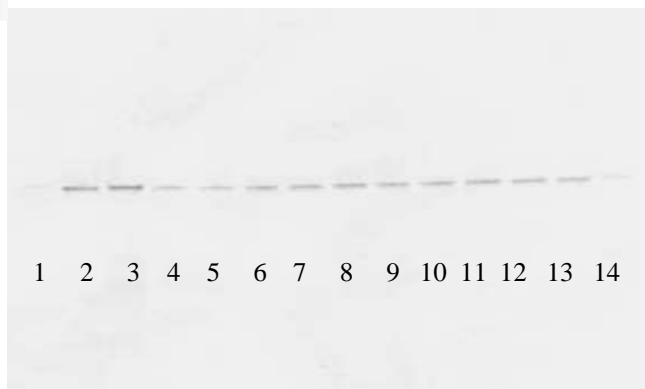


**Figura 5.1f. 1) DGGE Coltura Y10.
DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
2-13) DGGE isolati campione Y10;
14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.**



**Figura 5.1g. DGGE Coltura Y20.
DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
2-13) DGGE isolati campione Y20;
14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.**

**Figura 5.1h. DGGE Coltura Y30.
DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
2-13) DGGE isolati campione Y30;
14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.**



**Figura 5.1i. DGGE Coltura Y40.
DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
2-13) DGGE isolati campione Y40;
14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.**

**Figura 5.1l. DGGE Coltura Y50.
DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
2-13) DGGE isolati campione Y50;
14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.**

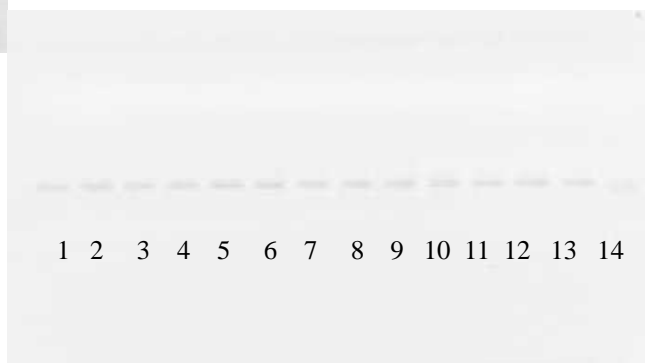


Figura 5.1m. DGGE Coltura Y60.
DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
2-13) DGGE isolati campione Y60;
14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.

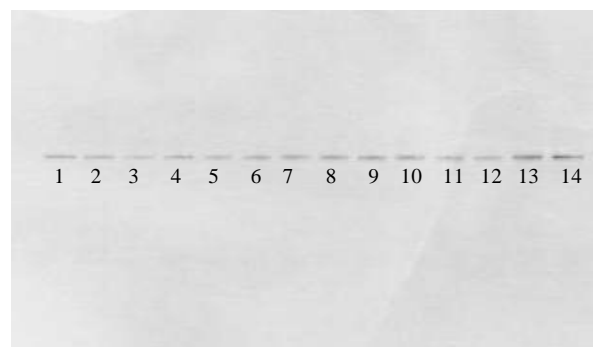


Figura 5.1n. DGGE Coltura Y70.
DGGE *S. thermophilus* Y1-1;
2-13) DGGE isolati campione Y70;
14) DGGE *S. thermophilus* Y1-1.

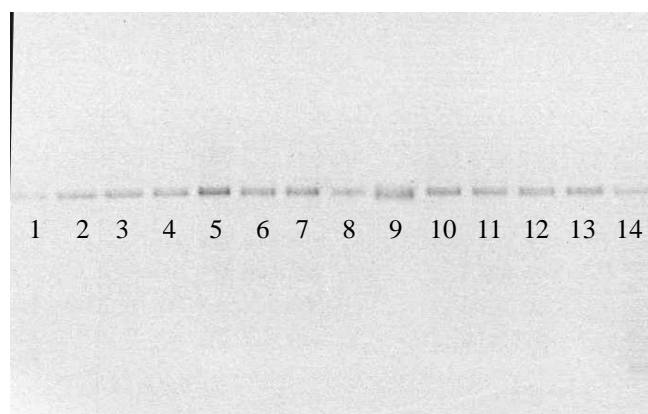


Figura 5.2 Profili elettroforetici RAPD-PCR delle colture analizzate

Figura 5.2a Coltura Y1. Profilo RAPD ottenuto con i primer D11344 E MSP.

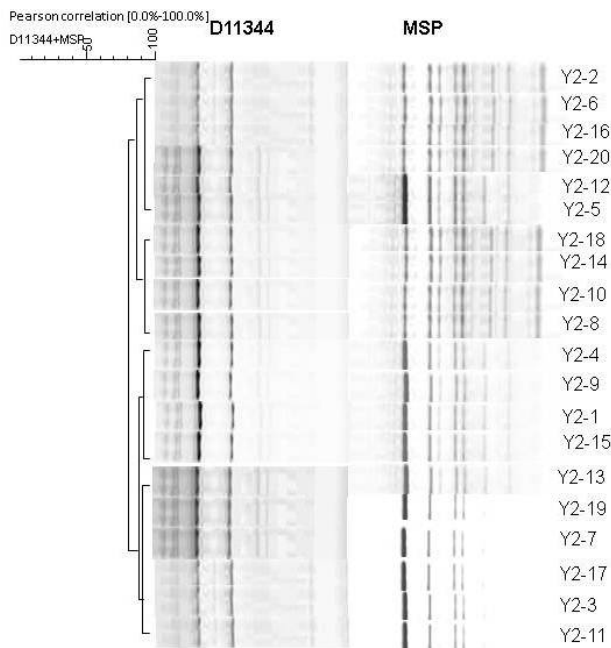
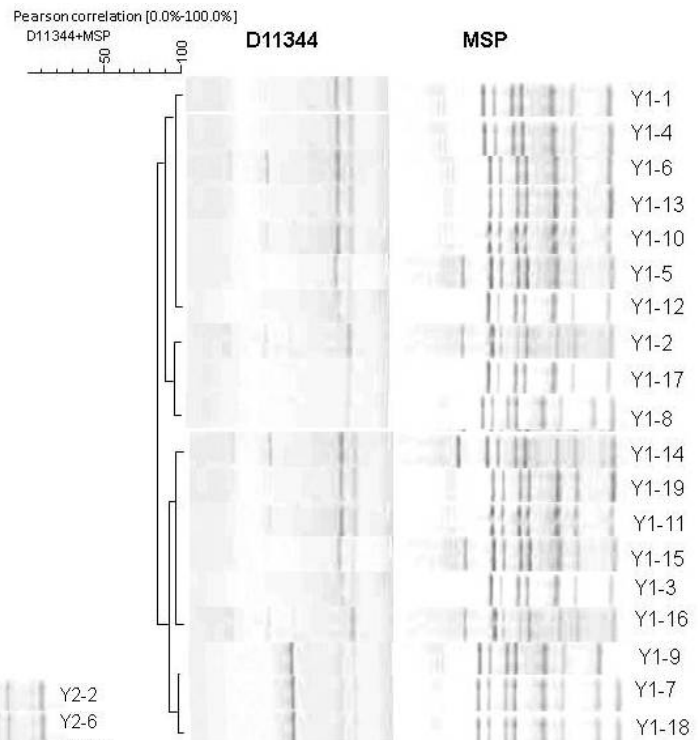


Figura 5.2b Coltura Y2. Profilo RAPD DI20 isolati ottenuto con i primer D11344 E MSP.

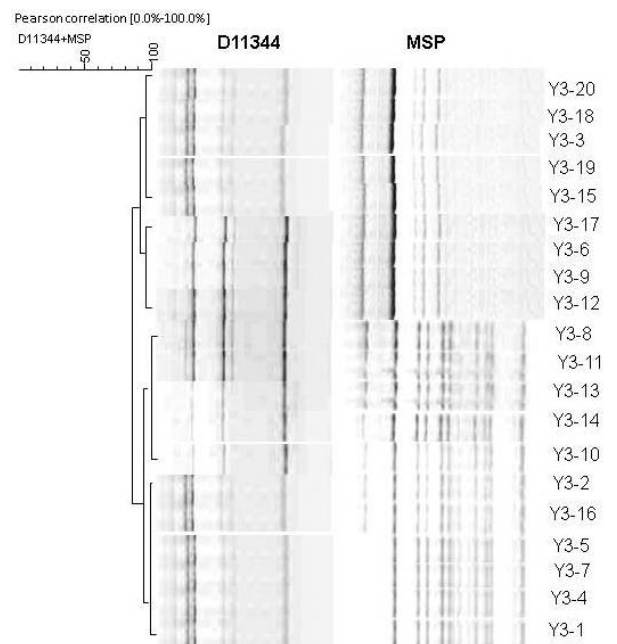


Figura 5.2c Coltura Y3. Profilo RAPD di 20 isolati ottenuto con i primer D11344 E MSP.

Figura 5.2d Coltura Y4. Profilo RAPD di 20 isolati ottenuto con i primer D11344 e MSP.

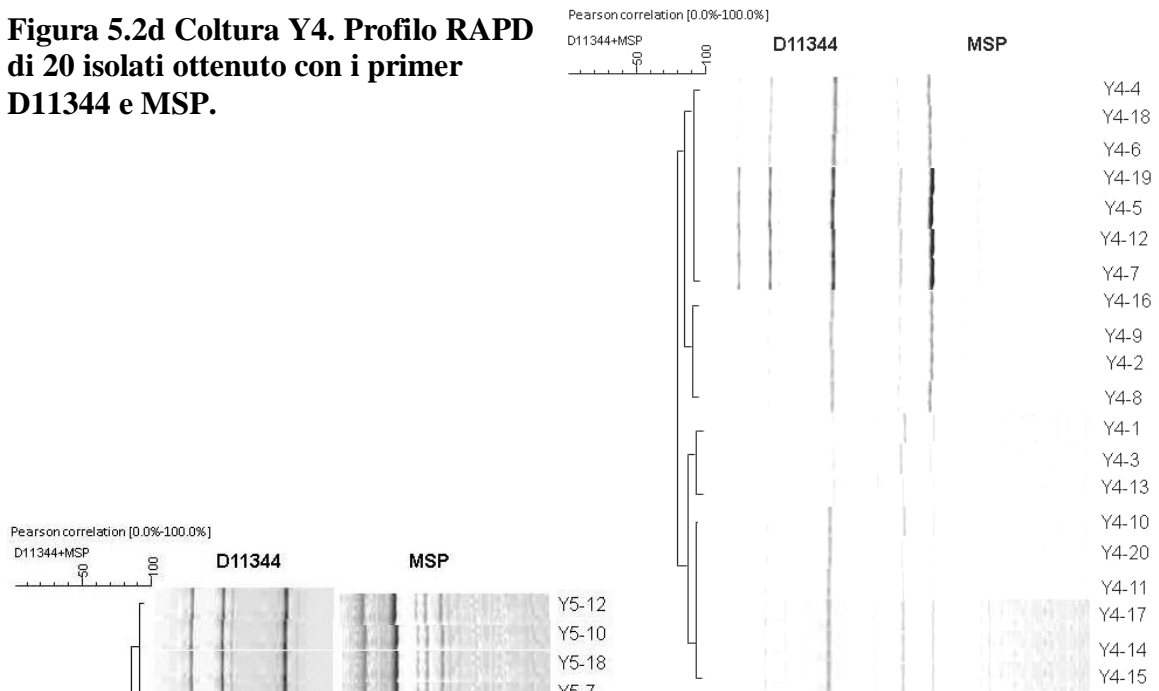


Figura 5.2e Coltura Y5. Profilo RAPD di 20 isolati ottenuto con i primer D11344 e MSP.

Figura 5.2f Coltura Y10. Profilo RAPD di 20 isolati ottenuto con i primer D11344 E MSP.

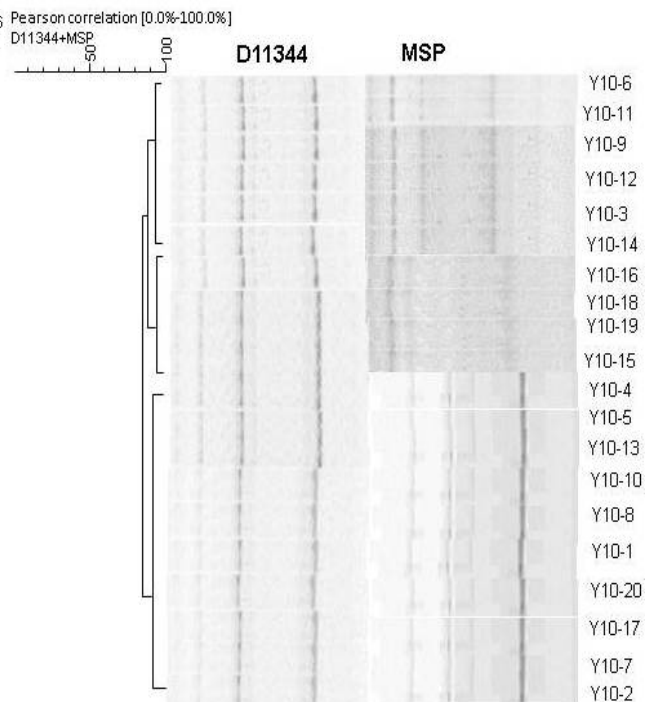


Figura 5.2g Coltura Y20.
Profilo RAPD di 20 isolati ottenuto con i primers D11344 E MSP.

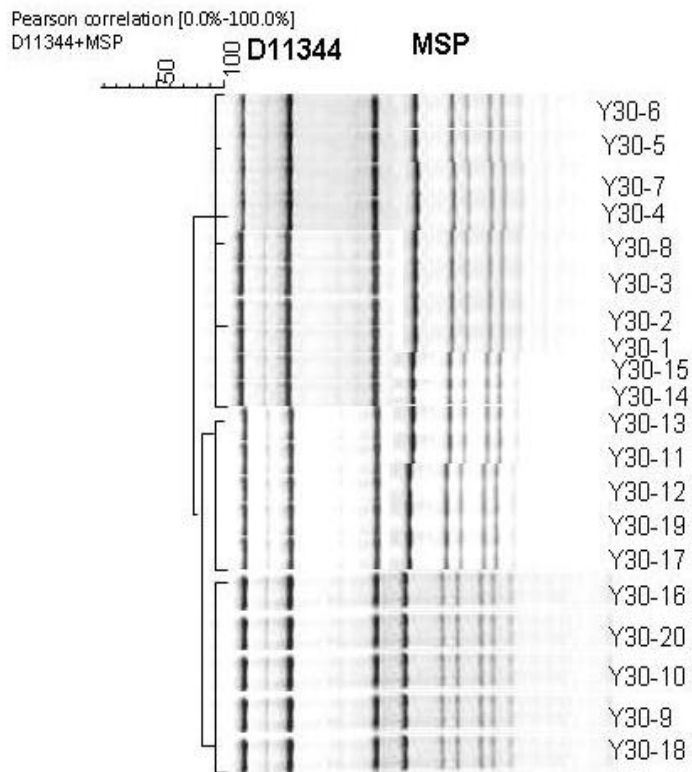
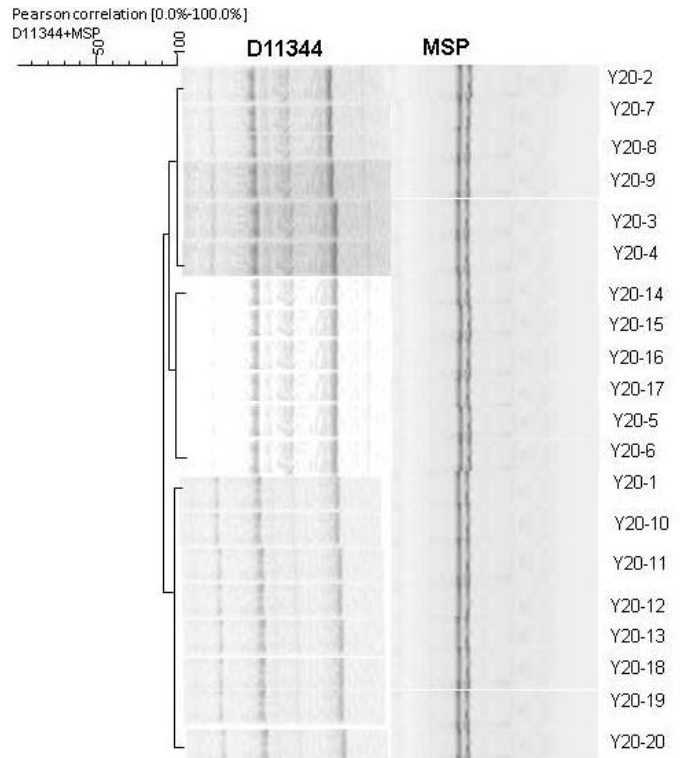


Figura 5.2h Coltura Y30.
Profilo RAPD di 20 isolati ottenuto con i primers D11344 E MSP

Figura 5.2i Coltura Y40.
Profilo RAPD di 20 isolati ottenuto
con i primer D11344 E MSP.

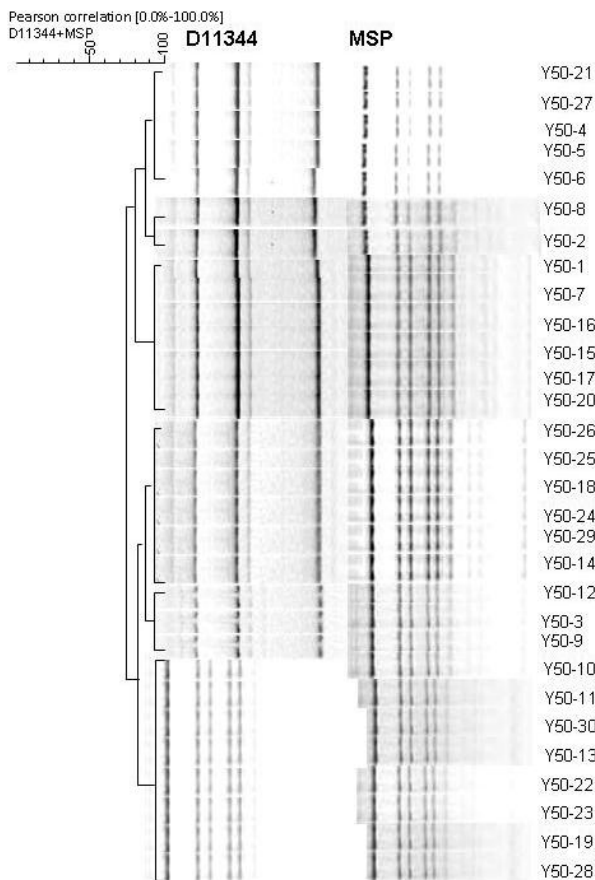
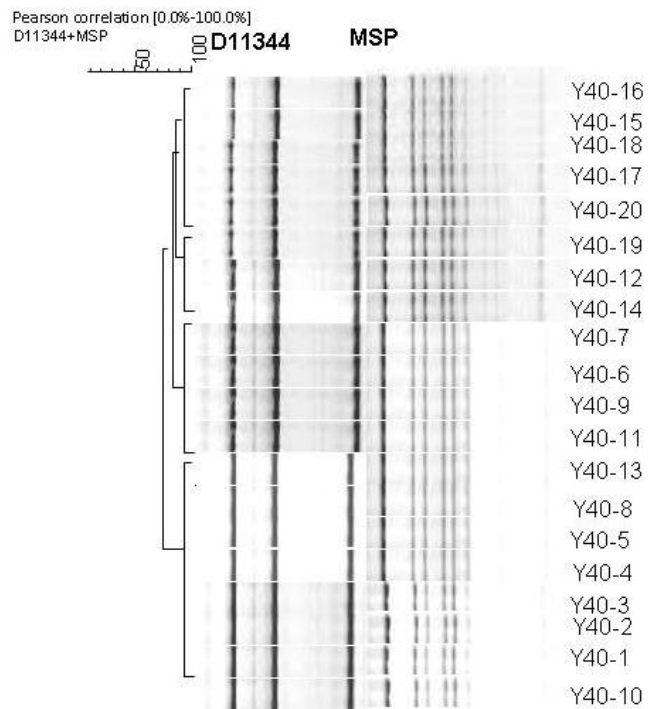


Figura 5.2l Coltura Y50.
Profilo RAPD di 30 isolati ottenuto
con i primer D11344 E MSP

Figura 5.2m Coltura Y60.
Profilo RAPD di 30 isolati ottenuto con i
primer D11344 E MSP

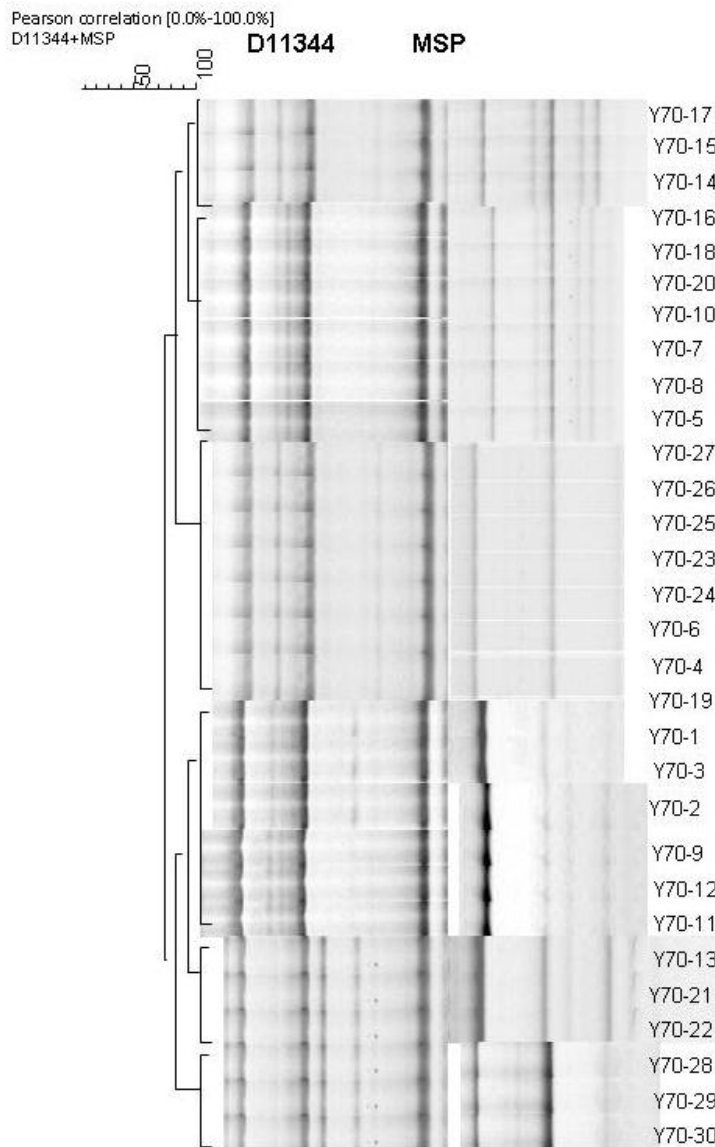
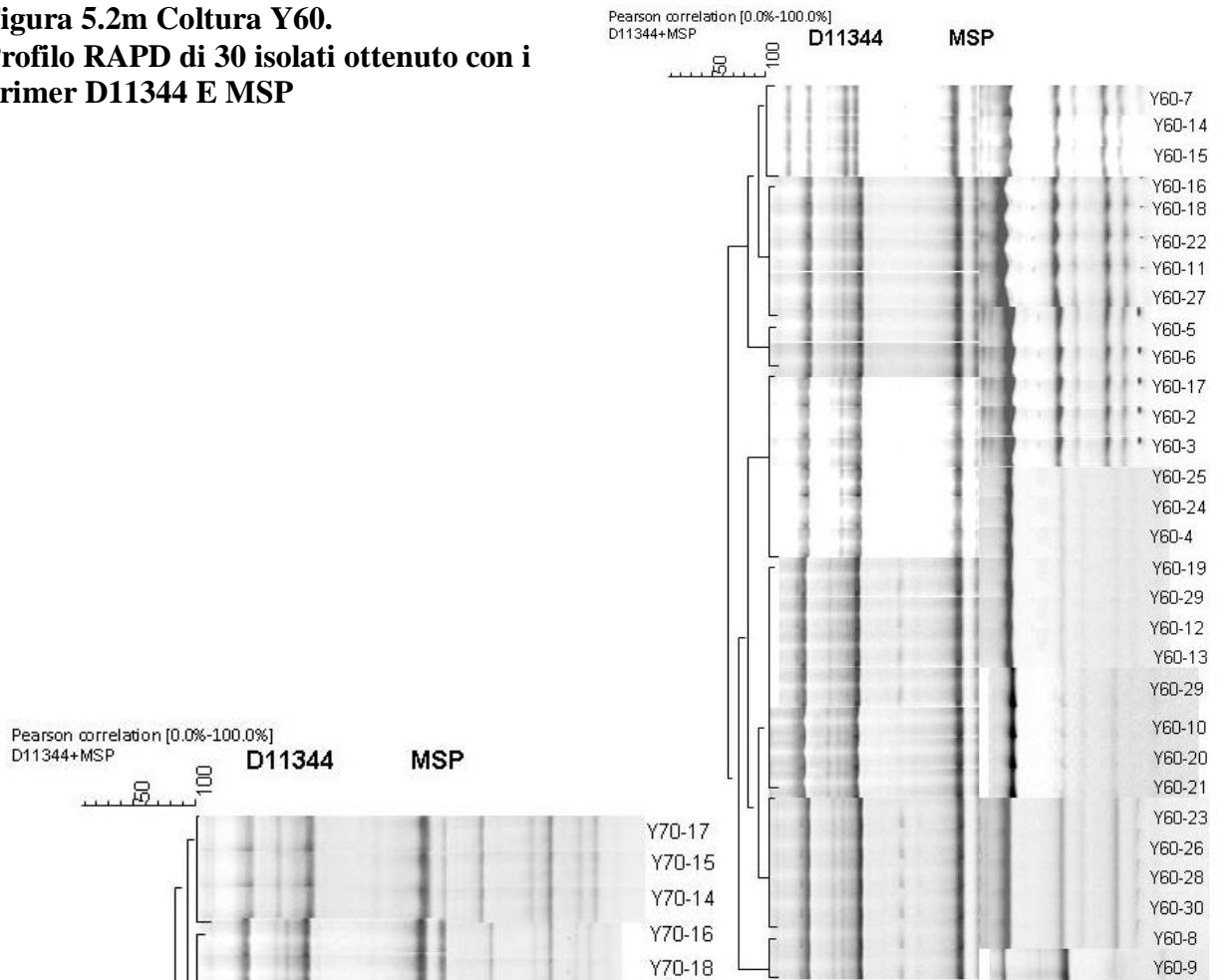


Figura 5.2n Coltura Y70.
Profilo RAPD di 30 isolati
ottenuto con i primer D11344 E
MSP

Figura 5.3 Screening per la produzione di EPS

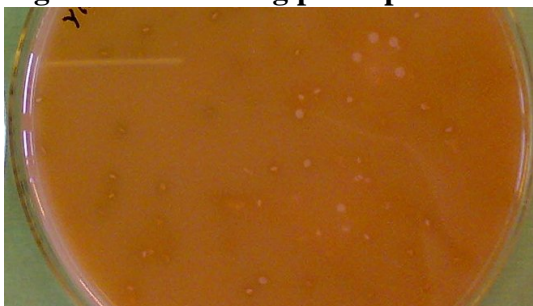


Figura 5.3a. Screening EPS. Colonie in substrato gM17-sm-rr di ceppo di streptococco positivo al test (EPS+) le colonie presentano colorazione bianca.



Figura 5.3b. Screening EPS. Colonie in substrato gM17-sm-rr di ceppo di streptococco negativo al test (EPS-) le colonie presentano colorazione rosa-rosso.

Figura 5.4 Screening per la capacità proteolitica

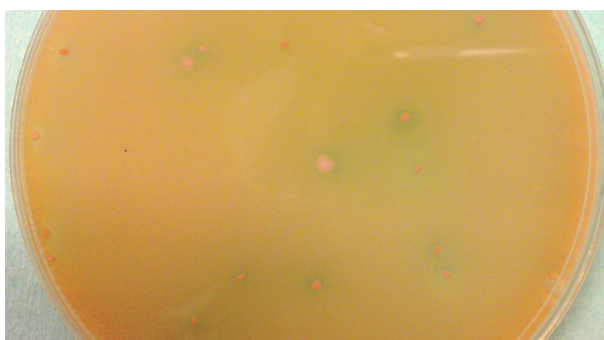


Figura 5.4a. Screening per la capacità proteolitica. Colonie in sma-rr di ceppo di streptococco positivo al test (Prot+) le colonie presentano alone di chiarificazione intorno.

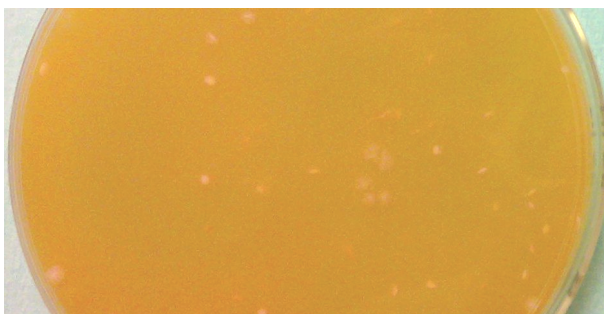


Figura 5.4b. Screening per la capacità proteolitica. Colonie in sma-rr di ceppo di streptococco negativo al test (Prot-) le colonie non presentano alone di chiarificazione intorno

Figura 5.5 Screening per la capacità aromatizzante

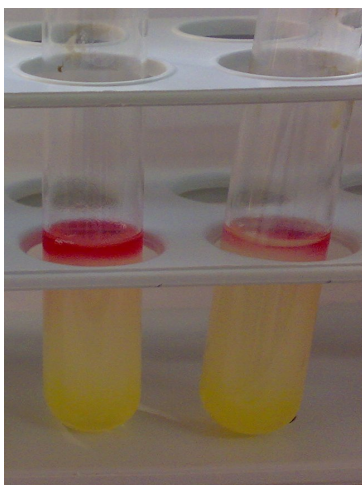


Figura 5.5 a. Screening per la capacità aromatizzante. Esito positivo al test di valutazione della proprietà aromatizzante: c'è formazione di colore sulla superficie della provetta contenente siero.

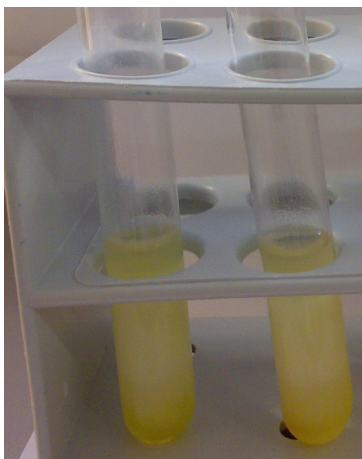


Figura 5.5 b. Screening per la capacità aromatizzante. Esito negativo al test di valutazione della proprietà aromatizzante: non c'è formazione di colore sulla superficie della provetta contenente siero.

Figura 5.6 Fasi di infezione fagica al microscopio elettronico a scansione

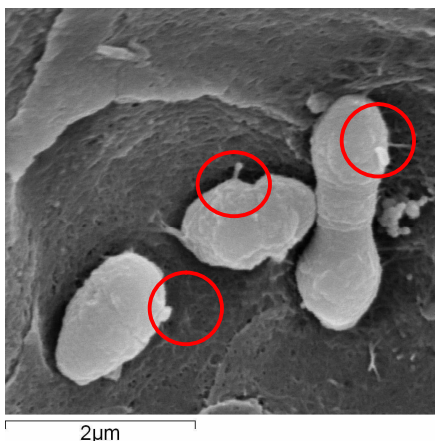


Figura 5.5 a. Immagine al microscopio elettronico a scansione di streptococchi in fase di attacco fagico: sulla superficie cellulare dei batteri sono visibili i capsidi dei batteriofagi adesi alla parete cellulare.

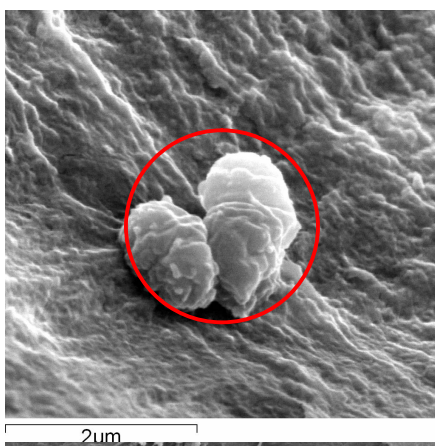


Figura 5.5 b. Immagine al microscopio elettronico a scansione di streptococchi in seguito ad attacco fagico: la parete cellulare dei batteri è in fase di collasso dopo infezione del batteriofago.

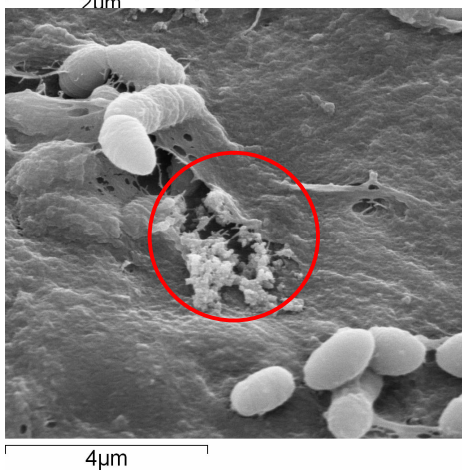


Figura 5.5 c. Immagine al microscopio elettronico a scansione di streptococchi in seguito di attacco fagico: al centro dell'immagine è visibile una cellula dopo lisi che sta liberando batteriofagi.

Figura 5.7 Fermentatore Chemap impiegato per le prove di industrializzazione.



A sinistra apparato di controllo del fermentatore a destra fermentatore delle capacità di 15 litri.

6. BIBLIOGRAFIA

Andrighetto C, Borney F, Barmaz A, Stefanon B, Lombardi A (2002) Genetic diversity of *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian traditional cheeses. *Int. Dairy J.* 12: 141-144.

Amor KB, Vaughan EE, de Vos WM (2007) Advanced Molecular Tools for the Identification of Lactic Acid Bacteria. *J. Nutr.* 137: 7415-7475.

Beshkova D, Simova E, Frengova G, Simov Z (1998) Production of flavour compounds by yogurt starter cultures. *J. Ind. Microbiol. Biot.* 20: 180-186.

Botina SG, Piksasova OV, Tsygankov YD, Sukhodolets VV (2007) Genetic diversity of the natural strains of *Streptococcus thermophilus*. *Russ. J. Genet+* 43: 485-491.

Chaves ACS, Fernandez M, Lerayer ALS, Mierau I, Kleerebezem M, Hugenholtz J (2002). Metabolic Engineering of Acetaldehyde Production by *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol* 68: 51-56

Chen YS, Christensen JE, Strickland M, Steele JL (2003) Identification and characterization of *Lactobacillus helveticus* PepO2, an endopeptidase with post-proline specificity. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:1276–1282.

Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, Comi G (2001) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the 16S rRNA gene V1 region to monitor dynamic changes in the bacterial population during fermentation of Italian sausages. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5113-5121.

Dabour N, Kheard EE, Fliss I, La Pointe G (2005) Impact of rropy and capsular exopolysaccharide-producing strains of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* on

reduced-fat Cheddar cheese production and whey composition. *Int. Dairy J.* 15: 459-471.

de Souza EL, da Silva CA, de Sousa CP (2005) Bacteriocins: Molecules of Fundamental Impact on the Microbial Ecology and Potential Food Biopreservatives. *Brazilian Arch Biol. Tech.* 48:559-566.

De Vuyst L & Degeest B (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23: 153-177.

De Vuyst L (2000). Application of Functional Starter Cultures. *Food Technol. Biotechnol.* 38: 10-112.

Dellaglio F, Felis GE, Castioni A (2005) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *indicus* subsp. *nov.*, Isolated from Indian Dairy Products. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:401–404.

Desiere F, Lucchini S, Canchaya C, Ventura M, Brüssow H (2002) Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82: 73–91

Duboc P & Mollet B (2001) Applications of exopolysaccharides in the dairy industry. *Int. Dairy J.* 11: 759-768.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28: 350-356.

El-Ghaish S, Dalgarrondo M, Choiset Y, Sitohy M, Ivanova I, Haertlé T, Chobert JM (2010) Screening of strains of lactococci isolated from Egyptian dairy products for their proteolytic activity. *Food Chem.* 120: 758-764.

Ercolini D (2004) Review article. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *J. Microbiol. Meth.* 56: 297-314.

Fox PF, McSweeney PHL, Cogan TM, Guinee TP (2004) CHEESE – Chemistry, Physics and Microbiology – Therd Edition Volume 1 General Aspects. Elsevier Accademic Press

Fox PF, McSweeney PHL, Cogan TM, Guinee TP (2004) CHEESE – Chemistry, Physics and Microbiology – Therd Edition Volume 2 Mejour Cheese Groups. Elsevier Accademic Press.

Frontali L (1992) Chimica delle fermentazioni e microbiologia industriale Frontali Alma Schiesser Roma.

Giraffa G (2004) Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microb. Rev* 28: 251-260.

IDF 117:2003 / ISO 7889: 2003. Yogurt - Enumeration of characteristic microorganisms - Colony-count technique at 37 degrees C.

Janhoj T, Petersen CB, Frost MB, Ipsen R (2006) Sensory and rheological characterization of low-fat stirred yogurt. *J Texture Stud* 37: 267-299.

Klaenhammer, TR, Barrangou R, Buck BL, Azcarate-Peril MA, Altermann E. (2005). Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol Rev.* 29:393-409.

Manzoni M (2005) Microbiologia Industriale. CEA Editore. Bologna p. 432.

Parente, E & Cogan TM (2004) Starter cultures: general aspects. Chap. 6 In: Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., Cogan, T.M., Guinee, T.P. (eds.) Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. Volume First. *Elsevier*. London. P.123-148.

Pepe O, Villani F, Oliviero D, Greco T, Coppola S (2003) Effect of proteolytic starter cultures as leavening agents of pizza dough. *Int. J. Food Microbiol.* 84: 319-326.

Pridmore RD, Crouzillat D, Walker C, Foley S, Zink R, Zwahlen MC, Brussow H, Petiard V, Mollet B (2000) Genomics, molecular genetics and the food industry. *J. Biotechnol.* 78:251-258.

Querol A, Barrio E, Ramon D (1992) A comparative study of different methods of yeast strains characterization. *Syst. Appl. Microbiol.* 15: 439-446.

Randazzo CL, Caggia C, Neviani E (2009) Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses. *J. Microbiol. Meth.* 78: 1-9.

Rantsiou K, Urso R, Iacumin L, Cantoni P, Cattaneo G, Comi G, Cocolin L (2005) Culture dependent and-independent methods to investigate the microbial ecology of Italian fermented sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1977-1986.

Ricciardi A, Parente E, Aquino M, Clementi F (1998) Use of desalting gel for the rapid separation of simple sugars from exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Biotechnol. Tech.* 12: 649-652.

Ruas-Madiedo P & de los Reyes-Gavilán CG (2005) Invited Review: methods for the screening, isolation, and characterization of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* 88: 843-856.

Ruas-Madiedo P, Hugenholtz J, Zoon P (2002) An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12: 163-171.

Salminen S, Von Wright A, Auwehand A (2004) Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional aspects. Third Edition. *Marcel Dekker*. New York p. 656.

Salvadori Del Prado O (1998) Trattato di tecnologia casearia. *Edagricole*. Bologna p. 615.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Second Ed. *Cold Spring Harbor Laboratory*. New York p. 865.

Savijoki K, Ingmer H, Varmanen P (2006). Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 394-406.

Smit G, Smit BA, Engels WJM (2005) Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microb. Rev* 29: 591-610.

Soukoulis C, Panagiotidis P, Koureli R, Industrial Tzia C (2007) Manufacture: Monitoring of Fermentation Process and Improvement of Final Product Quality. *J. Dairy Sci.* 6: 2641–2654.

Tamine A.Y., Robinson R.K. (1985) Yoghurt: Science and Tecnology. Pergamon. p.432.

Temmerman R, Huys G, Swings J (2004) Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture independent methods. *Trends Food Sci. Tech.* 15: 348-359.

Vadeboncoeur C, Moineau S (2004) The relevance of genetic analysis to dairy bacteria: building upon our heritage. *Microb. Cell Fact.* 3: 15-18.

Ventura M, Meylan V, Zink R (2003) Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4296–4301.

Vos P, Garrity G, Jones, D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, Schleifer KH, Whitman WB (2009) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume 3: The Firmicutes. *Williams & Wilkins*. p. 693.

Walstra P, Wouters JTM, Guters TJ (2006) *Dairy Science and Technology – Second Edition* Taylor & Francis.

Weinbauer MG (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microb. Rev.* 28: 127–181.

Zambonelli C, Tini V, Giudici P, Grazia L (2001) *Microbiologia degli alimenti fermentati*. *Edagricole*. Bologna p.225.