Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

CONTROLLO E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

Valutazione del potenziale antimicrobico di metaboliti prodotti da batteri lattici in sistemi di active packaging

Prova finale di:

Nicolò Barozzi

Matricola: 194235

Relatore:

Prof. Andrea Pulvirenti

Correlatore:

Dott. Enrico Maurizzi

Anno accademico 2024/2025

Indice

Riassunto **4**

1.Introduzione **5**

1.1 Caratteristiche generali dei batteri lattici 5

1.2 Metabolismo dei batteri lattici 6

1.2.1 Metabolismo omofermentante 6

1.2.2 Metabolismo eterofermentante 7

1.2.3 *Lactobacillus* 9

1.2.4 *Leuconostoc* 9

1.2.5 Acidi organici 10

1.2.5.1 Acido lattico 11

1.2.5.2 Acido succinico 12

1.2.5.3 Acido acetico 12

1.2.5.4 Acido propionico 13

1.3 Produzione di batteriocine 13

1.3.1 Ruolo delle batteriocine nella sicurezza alimentare: efficacia e regolamentazione 15

1.3.2 Applicazioni alla conservazione degli alimenti 17

2.Scopo 19

3.Materiali e metodi 20

3.1 Materiali 20

3.1.1 Terreno BHIB 20

3.1.2 Terreno BHIA 21

3.1.3 Terreno MRS broth 21

3.1.4 Ceppi batterici analizzati per la produzione di metaboliti con attività antimicrobica 22

3.2 Metodi 23

3.2.1 Verifica dell'attività antimicrobica 23

3.2.1.1 Agar spot test 23

3.2.1.2 Broth microdilution method 23
3.2.2 Caratterizzazione dei CFS 24
3.2.2.1 Neutralizzazione 24
3.2.2.2 Effetto dei trattamenti termici 25
3.2.2.3 Trattamento enzimatico 25
3.2.2.4 Pepsina 25
3.2.2.5 Tripsina 26
3.2.3 Analisi statistica 27
3.2.3.1 ANOVA 27
3.2.3.2 Tukey HSD (Honestly Significant Difference) 27
4. Risultati e discussioni 28
4.1 Agar spot test 28
4.1.1 Risultati inibizione *Escherichia coli* 28
4.1.2 Risultati inibizione *Staphylococcus aureus* 29
4.2 Broth microdilution method 30
4.2.1 Filtrati (CFS) 31
4.3 Caratterizzazione dei CFS 33
4.3.1 Neutralizzati 33
4.3.2 Trattamenti termici 35
4.3.2.1 Trattamento a 60°C 35
4.3.2.2 Trattamento a 90°C 36
4.3.2.3 Trattamento a 121°C 37
4.3.3 Trattamenti enzimatici 38
5. Conclusioni 40
6. Bibliografia 42

Riassunto

L'attività antimicrobica dei batteri lattici è conosciuta ed applicata dall'uomo per l'ottenimento di diversi prodotti alimentari. Le proprietà antagonistiche dei batteri lattici connesse con la storica salubrità d'impiego nei processi fermentativi, ne rende interessante l'utilizzo per la bioconservazione di prodotti alimentari. La crescente attenzione dei consumatori per alimenti sani e naturali, spinge l'industria alimentare e la ricerca scientifica a studiare l'applicazione di composti naturali per la lavorazione dei prodotti alimentari, al fine di eliminare o ridurre gli additivi chimici utilizzati come agenti antimicrobici. Pertanto, negli ultimi decenni, diverse linee di ricerca hanno cercato di trovare una soluzione il più naturale possibile a questo problema. Tra questi, la selezione di molecole microbiche e/o ceppi batterici in grado di produrre tali composti, da utilizzare come antimicrobici e conservanti, ha dimostrato che alcuni batteri lattici (LAB) potrebbero essere candidati idonei perché riconosciuti come GRAS (generally recognized as safe). A tal proposito, questa tesi sperimentale si pone di valutare il potenziale antimicrobico di metaboliti prodotti da ceppi selezionati di batteri lattici in sistemi di active packaging. In primis, l'attività antimicrobica è stata valutata su due colture di ceppi patogeni (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) tramite due test: l'agar spot test e il broth microdiluition method. Per determinare la natura dei metaboliti prodotti sono stati effettuati vari trattamenti sul brodo di coltura cellulare, come la neutralizzazione, trattamenti termici ed enzimatici. Lo studio ha dimostrato che solo alcuni ceppi di batteri lattici riescono a produrre metaboliti che possano essere sufficientemente efficaci sui patogeni selezionati e che, presumibilmente, sono di natura proteica. Per averne l'effettiva conferma, bisognerà eseguire ulteriori studi per poter determinare con certezza la natura di queste molecole e la loro possibile applicazione su materiali d'imballaggio alimentare.

1.Introduzione

I batteri lattici sono da lungo tempo impiegati come colture starter nella produzione di alimenti fermentati. Queste colture sono generalmente designate per conferire sicurezza per il consumo, shelf-life, efficacia tecnologica ed economica, degli alimenti. Secondo uno studio recente, i ceppi batterici per le colture starter selezionati sono in grado di eliminare i rischi relativi alla produzione di sostanze considerate nocive per l'uomo, come amine biogene tra le quali istamina (Kim HS et al. 2019). Inoltre, sono oggetto di studio le nuove "colture starter funzionali", in grado di proteggere i prodotti alimentari da batteri dannosi, grazie alla rapida acidificazione o alla produzione di sostanze antimicrobiche (e.g. batteriocine) (Šušković et al., 2010). Le colture selezionate possono apportare anche benefici diretti alla salute dell'uomo, come nel caso dei microrganismi probiotici, o della produzione di sostanze di origine microbica ad azione nutraceutica negli alimenti in cui tali batteri sono contenuti. La crescente attenzione dei consumatori per alimenti sani e naturali, spinge l'industria alimentare e la ricerca scientifica a studiare l'applicazione di composti naturali per la lavorazione dei prodotti alimentari, al fine di eliminare o ridurre gli additivi chimici utilizzati come agenti antimicrobici. Pertanto, negli ultimi decenni, diverse linee di ricerca hanno cercato di trovare una soluzione il più naturale possibile a questo problema (Arena et al., 2016). Tra questi, la selezione di molecole microbiche e/o ceppi batterici in grado di produrre tali composti, da utilizzare come antimicrobici e conservanti, ha dimostrato che i batteri dell'acido lattico (LAB) potrebbero essere candidati idonei per tale scopo (Šušković et al., 2010; da Silva Sabo et al., 2014).

1.1 Caratteristiche generali dei batteri lattici

I batteri lattici sono quei microrganismi che per fermentazione degli zuccheri producono prevalentemente acido lattico. Sono Gram positivi, anaerobi, anaerobi aerotolleranti o microaerofili, asporigeni, catalasi negativi, con eccezione di alcune specie del genere *Pediococcus* (la catalasi è l'enzima che libera ossigeno molecolare da acqua ossigenata). Hanno esigenze nutritive complesse e le loro cellule possono avere forma coccica o bastoncellare. Fra i batteri lattici si trovano sia specie termofile che mesofile, con ottimi compresi tra i 25ºC e i 45º. I batteri lattici sono ubiquitari e sono normalmente presenti nei prodotti alimentari, come ad esempio i latticini, cibi fermentati e vegetali; essi intervengono in numerosi processi fermentativi naturali e trovano largo uso nelle industrie alimentari e in altre attività. In alcuni casi, i batteri lattici e, in particolare, alcune specie del genere *Enterococcus* e tutte quelle del genere *Streptococcus*, ad eccezione di *S. thermophilus,* possono provocare danni o patologie nell'uomo. Nel presente lavoro, sono stati oggetto di studio ceppi

appartenenti al genere *Lactobacillus* e *Leuconostoc*. Il genere *Lactobacillus* consta di circa 140 specie, di cui la maggior parte è di importanza industriale (Singh et al., 2008). Essi fanno parte della flora naturale di una gamma di prodotti alimentari, come latte crudo, latticini fermentati, frutta, vegetali, prodotti carnei e sono anche utilizzati come starter per la produzione di cibi fermentati, oltre che per migliorare la qualità o aggiungere benefici alla salute del consumatore. Queste specie presentano spesso caratteristiche fenotipiche e fisiologiche simili, probabilmente dovute alla loro evoluzione nelle stesse nicchie ecologiche (Singh et al., 2008), e per questo motivo, sono difficili da differenziare. Ciò richiede, pertanto, metodi avanzati per la loro appropriata identificazione e caratterizzazione.

1.2 Metabolismo dei batteri lattici

I batteri lattici hanno esigenze nutrizionali elevate e complesse (fonti di carbonio, amminoacidi, vitamine, acidi nucleici e sali minerali) e un metabolismo energetico abbastanza semplice. La principale attività metabolica attraverso la quale i batteri lattici si procurano l'energia necessaria per garantire i processi vitali è la fermentazione dei carboidrati (monosaccaridi e disaccaridi). Questa attitudine varia a seconda del patrimonio enzimatico delle diverse specie e delle condizioni ambientali. Generalmente i batteri lattici possono utilizzare differenti fonti di carbonio, selezionando a seconda delle condizioni esterne la via metabolica di maggior profitto energetico per la crescita e di minor costo cellulare. I batteri lattici possono essere così suddivisi in omofermentanti ed eterofermentanti.

1.2.1 Metabolismo omofermentante

I batteri omofermentanti degradano il glucosio attraverso la via glicolitica con formazione del piruvato che viene poi ridotto ad acido lattico per opera della lattato deidrogenasi, con la contemporanea ri-ossidazione del coenzima NADH. Con questa via metabolica per ogni mole di glucosio si producono 2 moli di acido lattico e si ottiene una resa energetica di 2 moli di ATP (Vincenzini et al., 2005).

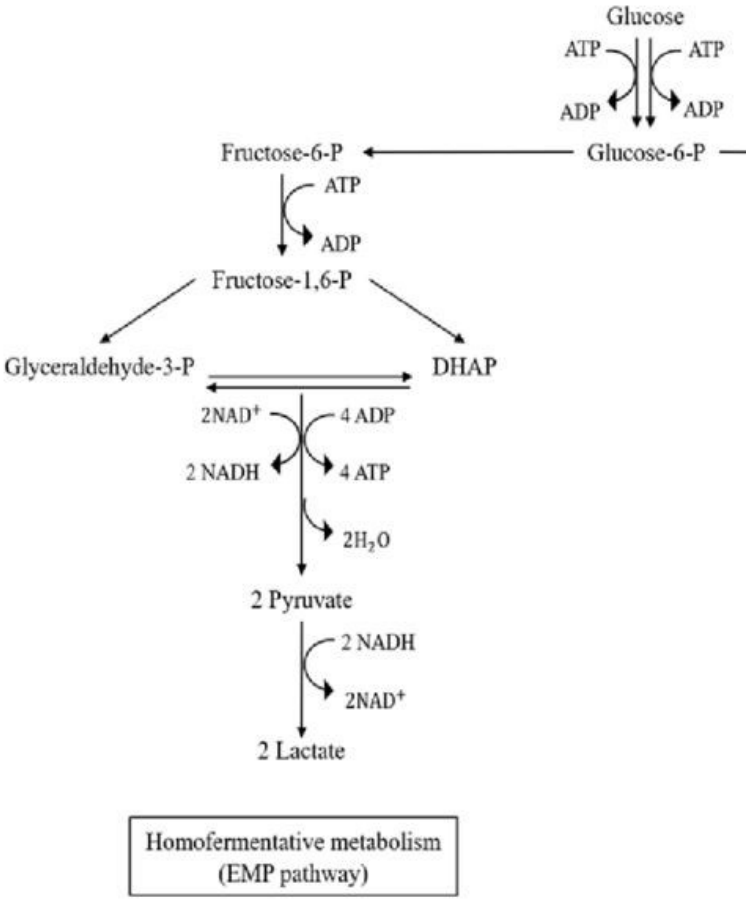


Figura 1. Metabolismo omofermentante in batteri lattici (Cheah et al., 2022)

1.2.2 Metabolismo eterofermentante

Nei batteri eterofermentanti la via fermentativa degli esosi non segue la glicolisi ma la via dei pentosi fosfati poiché mancano dell'enzima aldolasi (enzima della glicolisi che catalizza la scissione del fruttosio difosfato nei due trioso fosfati). Nella via dei pentosi fosfati, la reazione chiave è la scissione dello xilulosio in gliceraldeide 3-fosfato e acetil fosfato, catalizzata dall'enzima fosfochetolasi. La gliceraldeide 3-fosfato viene poi metabolizzata a acido lattico seguendo la via omofermentativa; l'acetil-fosfato invece viene normalmente ridotto ad etanolo con contemporanea ri-ossidazione del coenzima NADH (vedi figura 2). In condizioni aerobiche invece può essere convertito ad acetato mentre il coenzima NADH viene riossidato tramite la riduzione del fruttosio a mannitolo. I batteri etero fermentanti da una mole di glucosio formano una miscela equimolare di acido lattico, anidride carbonica e etanolo con una resa energetica in ATP di una sola mole (Vincenzini et al., 2005).

Nel caso dei disaccaridi (e.g. lattosio), il trasporto a livello di membrana cellulare può prevedere o meno la fosforilazione dello zucchero. Molte specie di batteri lattici, non solo eterofermentanti, sono in grado di utilizzare i pentosi (eterofermentanti facoltativi).

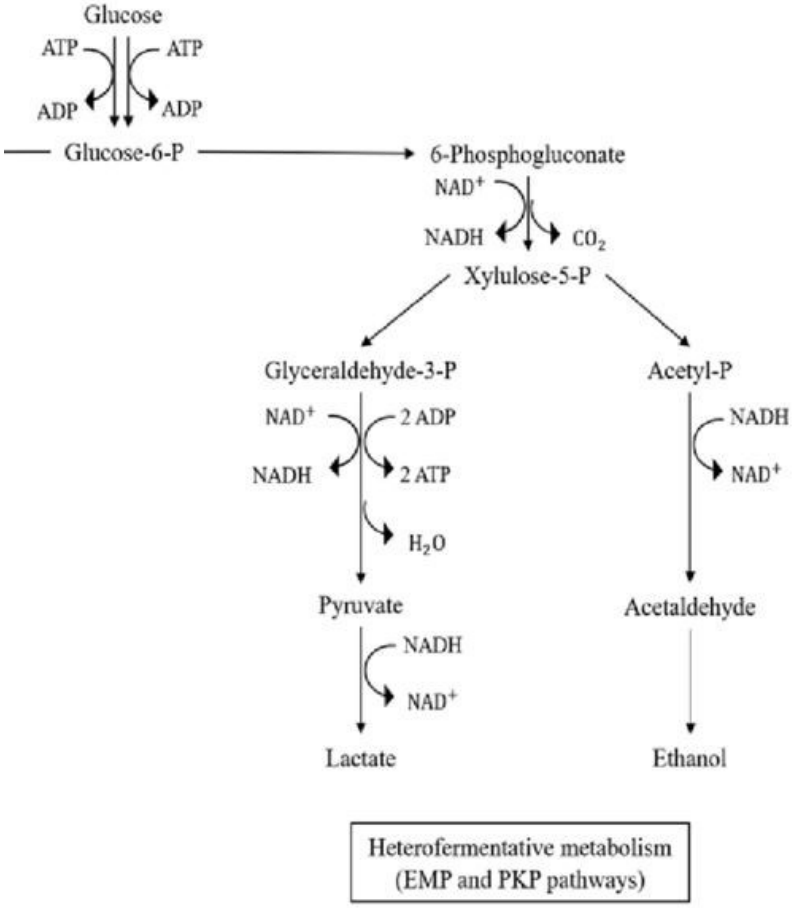


Figura 2, Metabolismo eterofermentante in batteri lattici (Cheah et al., 2022)

1.2.3 *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus*, a seconda del metabolismo, è suddiviso in tre gruppi:

gruppo 1: omofermentativo; avviene la fermentazione degli esosi e si forma esclusivamente acido lattico. I pentosi non sono fermentati. Le specie facenti parte di questo gruppo sono termofile *L. delbrueckiii subsp. delbrueckii; L. delbrueckii subsp bulgaricus; Lb. delbrueckii subsp. lactis; Lb. helveticus; L. acidophilus*

gruppo 2: omofermentativo, facoltativamente eterofermentativo. Questi lattobacilli formano solo acido lattico per fermentazione degli esosi, ma talvolta in carenza di zuccheri anche acido acetico, etanolo e acido formico; fermentano i pentosi con formazione di acido lattico e acetico. Il gruppo comprende molte specie mesofile: *Lactobacillus plantarum; Sakei; casei e rhamnosus.*

Gruppo 3: eterofermentativo obbligato; questi lattobacilli fermentano gli esosi con formazione di acido lattico, acetico, etanolo e anidride carbonica. Fermentano i pentosi con produzione di acido lattico e acetico. Fanno parte di questo gruppo: *Lactobacillus brevis; Lactobacillus buchneri; L sanfranciscensis; Lb. Kefiranofaciens; Lactobacillus fermentum; Lb. reuteri*. (Zambonelli C. et al.,2001).

1.2.4 *Leuconostoc*

I batteri lattici appartenenti al genere *Leuconostoc* sono comunemente associati agli alimenti e utilizzati come colture starter in alcune fermentazioni lattiero-casearie. Sono eterofermentanti e producono cellule a forma di bastoncello, somigliando ai lattobacilli, in particolare *Lactobacillus confusus* e *Lactobacillus viridescens* (Stiles M E, 1994)

Secondo il Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garvie E. et al, 1986), il genere *Leuconostoc* è suddiviso in quattro specie principali:

- *L. mesenteroides* ssp. *mesenteroides, dextranicum* e *cremoris*;
- *L. paramesenteroides*;
- *L. lactis*;
- *L. oenos*.

Successivamente questa pubblicazione, sono state descritte altre cinque specie, due di queste importanti per la microflora lattica presente nelle carni refrigerate e confezionate sottovuoto: *Leuconostoc carnosum e Leuconostoc gelidum (Shaw, B. G et al. 1989).*

I leuconostoc sono associati a fermentazioni spontanee di materiale vegetale e latte *(Garvie E. et al, 1986)*, oltre che di carni confezionate sottovuoto (Shaw, B. G et al. 1984), e alcuni sono adattati a habitat specifici, ad esempio:

- *L. mesenteroides* e *L. paramesenteroides* sono coinvolti nel deterioramento durante la lavorazione dello zucchero (Tilbury, R. H. 1975);
- *L. oenos* nella fermentazione malolattica della vinificazione (Stiles M E, 1994).

Nell'industria lattiero-casearia, sia *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* che *L. lactis* sono inclusi in alcune colture starter per formaggi e burro. I leuconostoc crescono lentamente, specialmente nel latte, e non sono quindi importanti per la fermentazione del lattosio, ma risultano fondamentali per la produzione di componenti aromatici grazie all'utilizzo del citrato per produrre diacetile (Drinan, D. F et al., 1976).

1.2.5 Acidi organici

Sono composti caratterizzati dalla presenza di uno o più gruppi carbossilici (-COOH) legati a catene alifatiche o cicliche di atomi di carbonio. Si tratta di prodotti derivati dalla degradazione fermentativa dei carboidrati o dal ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA). Vengono prodotti prevalentemente dal metabolismo dei batteri lattici (LAB) per il mantenimento dell'equilibrio redox intracellulare e per la generazione di energia sotto forma di ATP.

1.2.5.1 Acido lattico

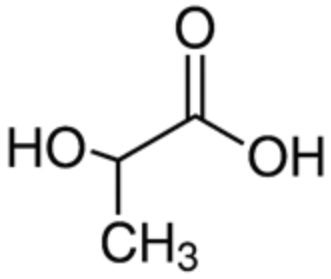


Figura 3, Molecola di acido lattico (https://it.wikipedia.org)

Si tratta di un α-idrossiacido prodotto naturalmente dal metabolismo anaerobico del glucosio attraverso la glicolisi, esistente nelle sue due forme enantiomeriche come acido D-lattico e acido L-lattico. La differenza sostanziale tra l'ottenimento di una forma rispetto all'altra sta nell'enzima lattato deidrogenasi. La lattato deidrogenasi è un enzima chiave per la trasformazione del piruvato in acido lattico e la sua stereospecificità ne determina la configurazione. L'acido D-lattico e l'acido L-lattico sono catalizzati rispettivamente dalla D-lattato deidrogenasi e dalla L-lattato deidrogenasi (Wang Yaqi et al., 2021). Le sintesi di questi enzimi dipendono dall'espressione genica nel ceppo produttore, che comporta la sintesi di un enzima rispetto all'altro. (Kim et al., 2020). Vale la pena notare che l'acido D-lattico non viene prodotto dalle cellule animali, quindi la maggior parte della produzione biotecnologica si concentra sull'acido L-lattico (Guo, M. et al, 2019). Le sue applicazioni spaziano in vari campi, tra cui la medicina, l'industria chimica, l'agricoltura, la protezione ambientale e, in particolare, l'industria alimentare (Aguirre-Garcia et al., 2024). La diminuzione del pH derivante dalla produzione di acidi organici come l'acido lattico esercita effetti antagonisti sulla crescita di batteri, lieviti e funghi filamentosi. L'efficacia della riduzione del pH attraverso la fermentazione dei batteri lattici (LAB) contro *Salmonella* spp. è stata confermata da Daliri et al., 2020. In una valutazione dell'impatto dell'acido lattico sullo sviluppo dei patogeni, è stata osservata la sua maggiore efficienza contro i batteri Gram-positivi rispetto a quelli Gram-negativi. Inoltre, è stato riscontrato che un aumento della concentrazione di acido lattico è correlato a una maggiore efficacia nell'inibire la crescita della microflora patogena negli alimenti (Zapaśnik, A et al, 2022). Tra i microrganismi più comunemente utilizzati per la produzione di questo acido organico ci sono *Streptococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium e Lactobacillus delbrueckii*, quest'ultimo il più ampiamente utilizzato nell'industria alimentare (Aguirre-Garcia et al., 2024). Oltre alla produzione

principale di acido lattico, essi possono generare vari acidi organici, tra cui succinato, acetato e propionato, con modalità dipendenti dal ceppo, dal metabolismo (omo- o eterofermentativo) e dalle condizioni ambientali.

1.2.5.2 Acido succinico

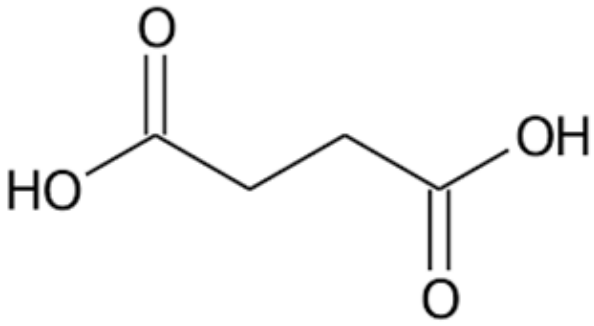


Figura 4, Molecola di acido succinico (https://it.wikipedia.org)

È un metabolita secondario derivante dalla carbossilazione del fosfoenolpiruvato (PEP) in ossalacetato, successivamente ridotto a malato, fumarato ed infine succinato. (Akira Tsuji et al. 2013). Pur non rappresentando il principale prodotto fermentativo dei batteri lattici, questo acido può essere rilasciato in concentrazioni significative in alcuni ceppi (*Lactobacillus plantarum, Lactococcus lactis)*. Inoltre ha un'importanza industriale come precursore di composti chimici e biopolimeri (Akira Tsuji et al. 2013).

1.2.5.3 Acido acetico

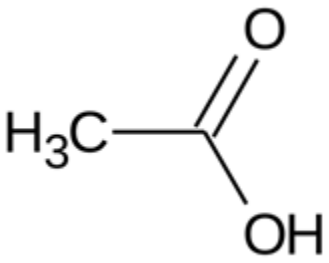


Figura 5, molecola di acido acetico (https://it.wikipedia.org)

Nei Lab eterolattici, l'acido acetico è generato attraverso la via della fosfochetolasi, che consente la conversione del glucosio in lattato, etanolo e/o acetato. La produzione di acido acetico non solo contrivuisce al bilancio energetico del LAB (con formazione di ATP), ma conferisce anche proprietà sensoriali ai prodotti fermentati, apportando note aromatiche tipiche (Wang Yaqi et al., 2021).

1.2.5.4 Acido propionico

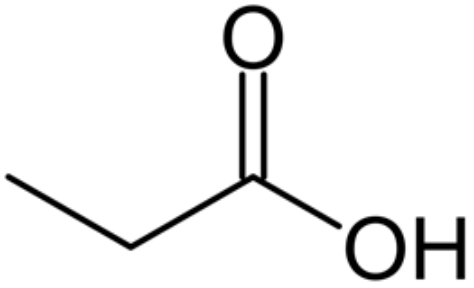


Figura 6, molecola di acido propionico (https://it.wikipedia.org)

La produzione di acido propionico da parte dei LAB è meno comune ed è generalmente associata a co-fermentazioni con *Propionibacterium spp.* In tali processi, l'acido lattico prodotto dai LAB funge da substrato per vie metaboliche specifiche (via dicarbossilica o via dell'acrilato) che conducono alla formazione di acido propionico, spesso accompagnata da acetato e CO_2 (Isipato M et al., 2020). Questo acido organico è di particolare interesse perché viene impiegato come conservante alimentare naturale grazie alla sua attività antimicotica (Isipato M et al., 2020).

1.3 Produzione di batteriocine

Oltre ai metaboliti elencati precedentemente, alcuni ceppi di batteri lattici possono produrre batteriocine. Si tratta di molecole di natura proteica, prodotte principalmente dopo la fase esponenziale di crescita batterica. Queste sono in grado di inibire la crescita di altri microrganismi e possono essere classificate in due gruppi principali: quelle che mostrano effetti battericidi prendendo di mira principalmente la membrana cellulare e quelle con effetti batteriostatici che influenzano l'espressione genica e la produzione proteica (Aguirre-Garcia et al., 2024). Sono considerate GRAS (generally recognized as safe) e sono relativamente stabili al calore e all'acidità. Possono essere più o meno inattivate dalle proteasi, dalle peptidasi che sono presenti nel prodotto alimentare, possono quindi essere più o meno attive in rapporto al pH e alle altre condizioni che si possono trovare nel prodotto in cui vanno ad esplicare la loro attività. Sono attive a bassi valori di pH e per periodi prolungati. Ci sono batteriocine ad ampio spettro di azione con azione nei confronti di microrganismi alteranti e patogeni, e batteriocine con ristretto spettro d'azione attive nei confronti dei principali ceppi appartenenti alla stessa specie del ceppo produttore. Le batteriocine possono essere divise in quattro classi principali:

• Batteriocine di classe I: comprendono i lantibiotici, piccoli peptidi cationici, idrofobici, stabili al calore, tra cui Lactocina, Lacticina, Carnocina, Variacina e Nisina. In base alle caratteristiche strutturali, le batteriocine lantibiotiche sono state inizialmente suddivise in due sottoclassi:

1. S*ottoclasse Ia* include peptidi relativamente allungati, flessibili e carichi positivamente; agiscono generalmente formando pori nelle membrane citoplasmatiche di specie bersaglio sensibili. La nisina è compresa in questo gruppo (Soccol et al.; 2007).

2. *Sottoclasse Ib* composta da peptidi tipicamente globulari, hanno una struttura più rigida e sono carichi negativamente o privi di carica netta. Esercitano la loro azione sui batteri sensibili interferendo con le reazioni enzimatiche essenziali (Deegan et al, 2006).

• Batteriocine di classe II sono piccoli peptidi (4-6 KDa) stabili al calore e non-lantibiotici. Questo gruppo è stato suddiviso in tre sottogruppi:

1. *Classe IIa*: peptidi attivi contro *Listeria*, i rappresentanti caratteristici sono pediocina PA-1 (Venema et al, 1997) e sakacina P.

2. *Classe IIb*: formata da un complesso di due peptidi distinti. Questi peptidi hanno poca o nessuna attività e non sembrano esserci somiglianze di sequenza tra peptidi complementari. In questo gruppo rientrano la lattococcina G e le plantaricine EF e JK (Soccol et al.; 2007).

3. *Classe IIc*: piccoli peptidi, termostabili, trasportati da peptidi leader. In questa sottoclasse si trovano solo le batteriocine divergicina A e acidocina B (Soccol et al.; 2007).

• Batteriocine di III classe: peptidi di grandi dimensioni, termolabili che non presentano un'attività antimicrobica specifica, meno studiate rispetto alle precedenti.

• Batteriocine di IV classe: molecole complesse, termolabili ed idrofobiche, nella cui struttura si riconoscono componenti sia di natura lipidica che glucidica, anch'esse poco studiate.

I batteri lattici appartenenti al genere *Lactobacillus* producono batteriocine che hanno uno spettro di attività ristretto. I principali produttori sono: *L. helveticus; L. Acidophiulus; L. plantarum* starter utilizzato per la fermentazione di olive e in grado di produrre batteriocine attive nei confronti di

diversi batteri gram positivi, tra cui clostridi, batteri propionici ed altri batteri lattici; *L.sakei*; quest'ultimo può produrre una batteriocina denominata sakacina in grado di inibire la *Listeria monocytogenes*.

Per quanto riguarda i batteri lattici appartenenti al genere *Leuconostoc,* la loro presenza in molte fermentazioni avventizie di alimenti e il loro impiego come colture starter in fermentazioni controllate, rendono le batteriocine prodotte da questi batteri interessanti come potenziali conservanti alimentari (Stiles M E, 1994). La produzione di batteriocine da parte delle specie di *Leuconostoc* fu osservata per la prima volta negli anni '50. Solamente dal 1984, quando fu segnalata l'attività antimicrobica delle specie di *Leuconostoc,* vennero condotti studi più approfonditi che portarono alla scoperta delle seguenti batteriocine (Stiles M E, 1994):

- **Mesentericina Y105**, prodotta da *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Mesenteroides,* si tratta di una batteriocine attiva esclusivamente contro specie di Listeria. *(*Hechard, Y et al, 1992);
- **Leucocina A-UAL 187**, prodotta da *Leuconostoc gelidum,* si è scoperta avere azione antimicrobica sia contro altri batteri lattici che contro 3 specie di *Listeria Monocytogenes* (Lewus, C. B et al. 1991);
- **Carnosina 44A**, prodotta da *Leuconostoc carnosum,* è una batteriocina termoresistente, stabile ad ampio range di pH (da 2 a 9) e con uno spettro d'azione simile a quello della Leucocina A *(*Van Laack et al.1992);
- **Leuconocina S**, prodotta da *Leuconostoc paramesenteroides,* si tratta di una glicoproteina con azione batteriostatica ad ampio spettro per diversi ceppi di *Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus,* e *Yersinia enterocolitica (*Lewus, C. B et al. 1992).

1.3.1 Ruolo delle batteriocine nella sicurezza alimentare: efficacia e regolamentazione

Grazie alle loro proprietà antimicrobiche naturali, le batteriocine stanno suscitando un crescente interesse come potenziali conservanti alimentari naturali, offrendo una promettente alternativa ai conservanti chimici. Queste molecole possono infatti presentare differenti spettri di attività: alcune sono altamente specifiche e colpiscono solo specie batteriche strettamente correlate, come quelle elencate precedentemente, mentre altre hanno uno spettro d'azione più ampio (Obafemi, Y.D et al, 2025). L'efficacia delle batteriocine dipende però da vari fattori ambientali, come il pH, la temperatura e la composizione del mezzo circostante, come per esempio la matrice alimentare in cui

vengono applicate. In generale, il livello di inibizione è direttamente correlato alla concentrazione della batteriocina presente, tanto maggiore sarà la concentrazione, tanto più determineranno un'inibizione significativa. Inoltre, la combinazione di batteriocine con altre sostanze, come i conservanti chimici, può potenziarne gli effetti inibitori. Ad oggi, La Food & Drug Administration (FDA), ovvero l'agenzia federale americana che regolamenta e supervisiona alimenti, farmaci e altri prodotti, ha approvato solo nisina, pediocina PA-1 e micocina come batteriocine per la conservazione degli alimenti (Obafemi, Y.D et al, 2025). Questa autorizzazione è stata concessa in seguito a rigorose valutazioni di sicurezza ed efficienza. Una delle ragioni principali di questa approvazione è che queste batteriocine, in particolare la nisina, hanno una lunga storia di utilizzo e derivano tipicamente da batteri dell'acido lattico (LAB), generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) (Obafemi, Y.D et al, 2025). Ampi studi tossicologici hanno inoltre dimostrato che il loro utilizzo non comporta rischi per la salute dei consumatori. È stato verificato, ad esempio, che nisina, pediocina PA-1 e micocina sono in grado di inibire efficacemente diversi patogeni di origine alimentare, in particolare batteri Gram-positivi come *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium botulinum* (Tadi SR et al, 2024)

Le approvazioni della FDA sono in genere collegate a specifiche applicazioni alimentari e condizioni d'uso, garantendo così che le batteriocine vengano applicate e gestite per massimizzarne l'efficacia riducendo al minimo i potenziali rischi. L'azione mirata di queste sostanze contro specifici gruppi di batteri, consente un controllo preciso della crescita microbica senza danneggiare i microrganismi benefici. Questo processo di approvazione include una revisione completa dei dati scientifici, che comprende studi di tossicità, allergenicità e attività antimicrobica. (Steier V. et al, 2024)

L'uso di batteriocine nella conservazione degli alimenti offre diversi vantaggi significativi:

- sono insapori, incolori e inodori, il che le rende ideali per preservare le proprietà originali dei prodotti alimentari
- stabilità ad alte temperature, basso pH e a diverse concentrazioni di sale (Verma DK. et al, 2022)
- l'estensione della shelf life dell'alimento

- la riduzione della diffusione di agenti patogeni nocivi di origine alimentare

- il miglioramento della protezione termica

- la riduzione al minimo delle perdite finanziarie dovute al deterioramento

- la possibilità di metodi di lavorazione meno intensivi che aiutano a mantenere il valore nutrizionale e la qualità (Inovejas RC. et al, 2024)

Tuttavia, possono sorgere alcune limitazioni, come la ristretta gamma di effetto o la natura idrofobica di batteriocine specifiche, che potenzialmente portano alla divisione dei lipidi organici nelle matrici alimentari (Obafemi, Y.D et al, 2025).

1.3.2 Applicazioni alla conservazione degli alimenti

In questo capitolo vengono presentati diversi studi relativi all'impiego delle batteriocine come conservanti naturali a diverse categorie di alimenti.

Dal punto di vista applicativo, le batteriocine trovano un utilizzo consolidato negli alimenti in scatola, come verdure, frutta, frutti di mare, zuppe e nei latticini, tra cui formaggi, yogurt e latte. In questi prodotti, queste molecole risultano particolarmente utili nel contrastare batteri sporigeni e termoresistenti, come *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* (Obafemi, Y.D et al, 2025). L'impiego delle batteriocine ha una lunga storia di utilizzo anche nei prodotti a base di carne, in particolare nell'industria della lavorazione carnea. Svolgono diverse funzioni essenziali, tra cui il miglioramento della pulizia delle carcasse bovine, l'inibizione della crescita dei patogeni associati alla carne e la prevenzione nel deterioramento microbico del prodotto. Questo contribuisce a prolungare la shelf life e la qualità della carne, soprattutto se confezionata in materiali sottovuoto (Wang, J. Et al. 2024)

Per quanto riguarda i prodotti ittici, soprattutto nei gamberetti, l'impiego di acido sorbico e acido benzoico rappresenta una pratica comune finalizzata all'estensione del periodo di conservabilità, mantenendo il prodotto idoneo al consumo per tempi più prolungati. Grazie a studi sperimentali con l'utilizzo di batteriocine, è stato evidenziato come la bavaricina A sia in grado di garantire una shelf-life di circa sedici giorni nei gamberetti in salamoia, mentre la nisina Z risulti maggiormente efficace, prolungando l'idoneità al consumo fino a trentuno giorni (Peng Z et al, 2023).

Le batteriocine si dimostrano di particolare interesse anche nei prodotti a base di frutta, in virtù della loro composizione, ricca di vari acidi organici. Esse sono in grado di contrastare efficacemente il deterioramento causato da *Clostridium tyrobutyricum* nella polpa di frutta in scatola e da *Alicyclobacillus* spp. nei succhi e negli estratti di frutta. Inoltre, patogeni di rilevanza alimentare quali *Salmonella typhimurium* ed *E. coli* O157:H7 possono essere efficacemente inibiti o la loro crescita rallentata dalla presenza di batteriocine presenti nei succhi di frutta (Strack L et al, 2020).

Nel settore lattiero caseario, e in particolare nella produzione di formaggi, l'impiego combinato di pediocina e nisina rappresenta uno stratagemma consolidato di bioconservazione (Nisa M, et al. 2023). In questo ambito, i ceppi batterici che producono batteriocine vengono utilizzati come colture starter o come culture aggiuntive nei formaggi fermentati, con lo scopo di prevenire il deterioramento, controllare i la proliferazione di patogeni e inibire i batteri lattici non starter indesiderati (NSLAB). Un esempio lo troviamo in uno studio effettuato sul formaggio Cheddar ottenuto mediante lattococchi produttori di nisina (301 e 387 UI/g), il quale ha mostrato un incremento della shelf life nelle creme spalmabili di formaggio pastorizzate e confezionate a freddo rispetto ai campioni di controllo. Inoltre, la presenza di nisina (a concentrazioni di 100-300 UI/g) ha ridotto significativamente i livelli di *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e spore di *Clostridium sporogenes* (Lahiri D et al, 2022).

2.Scopo

Esiste un interesse crescente nell'uso dei batteri lattici come conservanti naturali, per la loro potenziale produzione di metaboliti con attività antimicrobica come gli acidi organici (lattico e acetico), il perossido d'idrogeno, la CO_2, il diacetile (2,3-butandione) e le batteriocine. Tale orientamento, condiviso sia da laboratori industriali sia da centri di ricerca indipendenti, risponde a una crescente attenzione dei consumatori, che oggi cercano prodotti ottenuti con tecnologie moderne ma capaci di preservare aromi, sapori e qualità salutistiche tipiche delle produzioni tradizionali. L'interesse verso alimenti considerati salutari è evidenziato dall'aumento della richiesta di prodotti biologici, privi di conservanti artificiali. Le tecnologie produttive, infatti, rappresentano sempre un compromesso tra sicurezza e qualità, anche se, nella pratica, la scelta ricade spesso sulla soluzione tecnologica più economica tra quelle disponibili. Lo scopo di questo lavoro riguarda la selezione di batteri lattici, già precedentemente isolati da vari substrati e conservati in collezione, l'identificazione e la caratterizzazione delle loro attività antimicrobica al fine di ottenere microorganismi (M.O.) capaci di inibire dei batteri patogeni garantendo, allo stesso tempo, la salubrità e la sicurezza dei prodotti.

3.Materiali e metodi

3.1 Materiali

3.1.1 Terreno BHIB

Il Brain Heart Infusion (BHI) broth, prodotto da Biolife, è un terreno d'uso generale, basato sulla formulazione di Edward Rosenow del 1919, modificata successivamente da Russel Haden nel 1923. Il brodo BHI moderno utilizza in genere infusi in polvere di cuore e cervello, piuttosto che tessuto cerebrale e cardiaco, includendo il fosfato disodico come tampone, piuttosto che il carbonato di calcio utilizzato da Rosenow e Haden. BHI Broth è indicato per la coltivazione di una larga varietà di microrganismi, compresi i patogeni, aerobi ed anaerobi, lieviti e muffe, impiegando le temperature ed i tempi di incubazione adatti. Di seguito è riportata la scheda tecnica del terreno, contenente tutte le informazioni sulla destinazione d'uso, il metodo di preparazione e le caratteristiche del terreno.



Brain Heart Infusion Broth
da sinistra: terreno non inoculato, crescita di *S.aureus*

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale, per la coltivazione ed il mantenimento di microrganismi esigenti e non da campioni clinici e non clinici.

2 - COMPOSIZIONE

(FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA) *

Infuso di cervello disidratato	12,5 g
Infuso di cuore disidratato	5,0 g
Digerito enzimatico di tessuti animali	10,0 g
Glucosio	2,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio fosfato bibasico	2,5 g

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

4 – METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 37 g in 1000 mL di acqua purificata sterile. Scaldare per sciogliere completamente, distribuire sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra o provetta	limpido, giallo
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO – TIPO DI CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Brain Heart Infusion Broth	Terreno in polvere	4012302 4012304	500 g (13.5) 5 kg (135 L)

Figura 7, scheda tecnica del terreno BHIB (Biolife 401230)

3.1.2 Terreno BHIA

Il Brain Heart Infusion Agar di biolife è un terreno molto simile al precedente, con l'unica differenza che nella composizione di base vi è l'aggiunta di agar e di composti antimicrobici come penicillina, streptomicina oppure cicloximide e cloramfenicolo, rendendo così il terreno selettivo per funghi patogeni essendo ritardata e/o inibita la crescita dei batteri e di molti funghi saprofiti. Di seguito, è riportata la scheda tecnica del terreno con tutte le informazioni inerenti.



S.aureus su Brain Heart Infusion Agar

1 - DESTINAZIONE D'USO

Diagnostico *in vitro*. Terreno d'uso generale, per la coltivazione ed il mantenimento di microrganismi esigenti e non da campioni clinici e non clinici.

2 - COMPOSIZIONE

(FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIOGLIMENTO IN ACQUA) *

Infuso di cuore e cervello e peptoni	27,5 g
Glucosio	2,0 g
Sodio cloruro	5,0 g
Sodio fosfato bibasico	2,5 g
Agar	15,0 g

*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

4 – METODO DI PREPARAZIONE

Sospendere 52 g in 1000 mL di acqua purificata sterile, portare ad ebollizione sotto agitazione. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Per la preparazione delle piastre, raffreddare a 47-50°C, mescolare e distribuire in piastre di Petri sterili. Il terreno può anche essere distribuito in provetta prima della sterilizzazione.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione ed in piastra o provetta	limpido, giallo
pH (20-25°C)	7,4 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO – TIPO DI CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Brain Heart Infusion Agar	Terreno in polvere	4012352 4012354	500 g (9,6 L) 5 kg (96 L)

Figura 8, scheda tecnica del terreno BHIA (Biolife 401235)

3.1.3 Terreno MRS broth

Il terreno MRS broth (de Man, Rogosa and Sharpe Broth), prodotto da Oxoid, è un terreno di coltura liquido selettivo formulato per la crescita e l'isolamento di batteri lattici (LAB), in particolare specie appartenenti al genere *Lactobacillus*. Il particolare pH di questo terreno (circa 6,2) e la presenza di acetato di sodio, elencato nella scheda tecnica, conferiscono al terreno una moderata selettività, inibendo la crescita di microrganismi indesiderati senza compromettere quella dei lattobacilli. Grazie a queste caratteristiche, l'MRS Broth rappresenta lo standard di riferimento per lo studio fisiologico

e tecnologico dei lattobacilli e di altri LAB, risultando ampiamente utilizzato in microbiologia alimentare, industriale e probiotica. A seguire è riportata la scheda tecnica del terreno.

MRS BROTH (DE MAN, ROGOSA, SHARPE) **CM0359**

Typical Formula*

Peptone	grams per litre	10.0
'Lab-Lemco' powder		8.0
Yeast extract		4.0
Glucose		20.0
Sorbitan mono-oleate		1.0 ml
Di-potassium hydrogen phosphate		2.0
Sodium acetate .3H_2O		5.0
Tri-ammonium citrate		2.0
Magnesium sulphate .7H_2O		0.2
Manganese (II) sulphate .4H_2O		0.05

* adjusted as required to meet performance standards

Directions

Dissolve 52g in 1 litre of distilled water at 60°C. Mix well and distribute into final containers. Sterilize by autoclaving at 121°C for 15 minutes. Selectivity can be altered by pH adjustment.

Physical Characteristics

Dark straw, free-flowing powder
Colour on reconstitution - straw 4-amber 1
Moisture level - less than 7%
pH 6.2 ± 0.2 at 25°C
Clarity - clear (hazy when hot)

Figura 9, scheda tecnica MRS broth (Oxoid Thermo Scientific™ CM0359B)

3.1.4 Ceppi batterici analizzati per la produzione di metaboliti con attività antimicrobica

La ricerca di microrganismi produttori di batteriocine è stata condotta su sette ceppi appartenenti alla collezione Unimore Microbial Culture Collection (UMCC); rispettivamente:

- *Lactobacillus plantarum* UMCC 1843
- *Lactobacillus helveticus* UMCC 1817
- *Lactobacillus sakei* UMCC 1846
- *Lactobacillus fermentum* UMCC 1811
- *Leuconostoc mesenteroides* UMCC 1831
- *Lactobacillus curvatus* UMCC 1809

A seconda della tipologia di microrganismo, i ceppi sono stati coltivati in brodo MRS (Thermo Scientific™ CM0359B) all'interno di tubi da 9 ml del brodo di coltura a 37°C per 24h. I ceppi patogeni utilizzati per testare l'attività antimicrobica sono *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), rinfrescati in tubi da 9 ml di brodo BHI (Biolife 401230) e lasciati crescere a 37°C per 24h.

3.2 Metodi

3.2.1 Verifica dell'attività antimicrobica

3.2.1.1 Agar spot test

L'attività antimicrobica è stata valutata mediante la tecnica Agar spot test (1), seguendo la tecnica descritta da Gaudana et al. (2010). In breve, colture di lattobacilli sono state spottate (5 µL) su piastre petri di 90 mm di diametro contenenti MRSA e incubate per 24h a 37°C. Le colture di patogeni (*Escherichia coli*, EC, e *Staphylococcus aureus*, SA) sono state diluite 1:100 con BHI soft agar (contenente lo 0,6% di agar p/v) e versate sopra le piastre di MRSA contenenti le colonie sviluppate di lattobacilli. Ogni test è stato effettuato in triplice replica, accompagnato da controllo positivo (C+, senza inoculo del patogeno) e negativo (C-, senza inoculo del lattico). Tutte le piastre sono state poi incubate per 24 ore e i raggi delle zone di inibizione sono stati misurati tramite software di elaborazione di immagine ImageJ (v. 1.53a, National Institutes of Health, Bethesda, USA) [Schneider, C. et al, 2012].

3.2.1.2 Broth microdilution method

La tecnica del broth microdilution method (2) è stata impiegata per verificare la ritenzione dell'attività antimicrobica in assenza di competizione cellulare. In particolare, le colture di lattobacilli sono state fatte crescere in MRS broth per 24h a 37°C per poi essere centrifugate a 6000 giri per 20 min a 4°C. Il surnatante privo di cellule (CFS) è stato recuperato e sterilizzato mediante filtro siringa Durapore PVDF Millex-GV da 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, USA). I CFS dei vari ceppi così ottenuti sono stati aliquotati all'interno di eppendorf sterili da 1,5 ml e messi in freezer a -25°C per impedire la degradazione di molecole termolabili eventualmente prodotte dai M.O. I saggi in broth microdilution sono stati eseguiti come descritto da Mayrhofer et al. (2008). Colture di batteri patogeni (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) sono state inoculate (1% v/v) in tubi da 9 ml di BHIB, e

distribuite in piastre micro-plate a 96 pozzetti (Costar-Corning Incorporated, Corning, NY, USA). In questi pozzetti è stata creata una soluzione test da 100 µL, costituita da 10 µL di coltura patogena, 50 µL di CFS e 40 µL di BHIB sterile. I CFS sono stati utilizzati a concentrazioni del 50% nel volume finale (100 µL). La micro-plate è stata incubata a 37°C per 12h e la crescita dei batteri patogeni è stata monitorata misurando la densità ottica (OD600 nm) effettuando 13 letture, una all'ora, partendo da quella a tempo zero (T0). Le analisi sono state effettuate in triplo, accompagnate dai rispettivi controlli positivi (C+), composti esclusivamente da CFS e BHIB sterile, e controlli negativi (C-), costituiti da 10 µL di coltura patogena e BHIB sterile. L'attività antimicrobica è stata espressa come inibizione (%) della crescita del patogeno rispetto al controllo negativo (cioè il patogeno cresciuto in condizioni ottimali, senza CFS). Al termine delle prove, per determinare la carica patogena iniziale, contenuta in 1% v/v di BHIB, sono state effettuate delle diluizioni seriali sufficienti a l'enumerazione in piastre di BHIA, dopo 24h a 37°C di incubazione. Il giorno seguente l'enumerazione in piastra ha rilevato una carica di $2{,}63 \cdot 10^6 \pm 4{,}00 \cdot 10^5$ per *Escherichia coli* e di $2{,}01 \cdot 10^7 \pm 8{,}13 \cdot 10^6$ *Staphylococcus aureus*, rispettivamente.

3.2.2 Caratterizzazione dei CFS

Per determinare la natura dei metaboliti prodotti (CFS), sono state effettuati vari trattamenti tramite l'utilizzo di NaOH, temperature ed enzimi. Questi test sono stati effettuati unicamente sui surnatanti dei campioni che hanno dimostrato un efficace antimicrobica nei confronti dei patogeni testati (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) nei precedenti test di Agar spot test (3.2.1.1) e Broth microdilution method (3.2.1.2).

3.2.2.1 Neutralizzazione

Al fine di escludere l'attività di eventuali acidi organici prodotti dai batteri lattici, i CFS sono stati neutralizzati con NaOH 2 M fino a un pH di 6,5.

Ceppi	µL/mL
Lactobacillus plantarum	65 µL su 1 mL
Lactobacillus helveticus	30 µL su 1 mL
Lactobacillus sakei	50 µL su 1 mL
Lactobacillus fermentum	35 µL su 1 mL
Leuconostoc mesenteroides	60 µL su 1 mL
Lactobacillus curvatus	50 µL su 1 mL

3.2.2.2 Effetto dei trattamenti termici

È stato valutato l'effetto della temperatura sulle batteriocine trattando i surnatanti (CFS) a 60 e 90 °C, valutando l'attività delle batteriocine per ciascuna di queste temperature rispettivamente dopo 30 minuti. Oltre alle temperature precedentemente elencate, le batteriocine sono state esposte anche ad un trattamento di sterilizzazione, a 121°C per 15 minuti in autoclave (Arena et al., 2016). Dopo il trattamento termico, la ritenzione di attività antimicrobica e stabilità delle molecole presenti nei CFS, è stata valutata tramite broth microdilution method usando *E. coli (*ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) come microorganismi indicatori.

3.2.2.3 Trattamento enzimatico

È stato valutato inoltre, l'effetto di trattamenti enzimatici sulle proteine presenti in CFS tramite l'utilizzo di 2 enzimi proteolitici. In particolare, sono state impiegate, pepsina (250 U/mg) e tripsina (250 U/mg) seguendo il protocollo di Bu (2022).

3.2.2.4 Pepsina

Per la piena funzionalità dell'enzima, la soluzione enzimatica con pepsina deve avere un pH da 2 a 4. Per questo motivo, siamo andati a creare una soluzione di 10 ml di fisiologica sterile con l'aggiunta di HCl, diluito fino a 1M. Tramite l'ausilio di una pipetta, abbiamo aggiunto alla falcon contenente la pepsina un quantitativo di µL di acido che ci ha consentito di raggiungere un pH finale di 3.

Successivamente, la soluzione di pepsina è stata filtrata sotto cappa tramite filtri siringa Durapore PVDF Millex-GV da 0,22 μm (Millipore, Billerica, MA, USA) in una falcon sterile. Centodieci μL di soluzione enzimatica sterile a pH 3 sono stati aggiunti a un eppendorf contenente 990 μL dei nostri campioni di surnatante (CFS), ottenendo una diluizione 9:1 dell'enzima, come descritto da Bu (2022). I surnatanti dei vari ceppi neutralizzati, contenenti pepsina, sono stati incubati all'interno di un bagnetto termico alla temperatura di 37°C per 1h, così che gli enzimi potessero entrare ed esercitare in condizioni ottimali la loro attività proteolitica. Una volta terminata l'ora, i campioni sono stati spostati e lasciati in un altro bagnetto scaldato a 100°C per 5 minuti per inattivare l'enzima presente nelle eppendorf. Terminato questo processo, le eppendorf sono state tolte dal bagnetto, lasciate raffreddare sotto cappa e aliquotate all'interno della microplate per il test di broth microdilution spiegato in precedenza.

3.2.2.5 Tripsina

Per la piena funzionalità dell'enzima, la soluzione enzimatica con tripsina deve avere un ph intorno a 8. Per questo motivo, siamo andati a creare una soluzione di 9 ml di fisiologica sterile con l'aggiunta di NaOH, diluito fino a 2M. Tramite l'ausilio di una pipetta, abbiamo aggiunto alla falcon contenente la tripsina un quantitativo di μL di base che ci ha consentito di raggiungere un pH finale di 8. Successivamente, la soluzione di tripsina è stata filtrata sotto cappa tramite filtri siringa Durapore PVDF Millex-GV da 0,22 μm (Millipore, Billerica, MA, USA) in una falcon sterile. Come per la prova precedente con pepsina, sono stati aggiunti 110 μL di soluzione enzimatica sterile in un eppendorf contenente 990 μL dei nostri campioni di surnatante (CFS), ottenendo una diluizione 9:1 dell'enzima, come già citato in un articolo in precedenza. I surnatanti vari ceppi neutralizzati, contenenti pepsina, sono stati incubati all'interno di un bagnetto termico alla temperatura di 37°C per 1h, così che gli enzimi potessero entrare ed esercitare in condizioni ottimali la loro attività proteolitica. Una volta terminata l'ora, i campioni sono stati spostati e lasciati in un altro bagnetto scaldato a 100°C per 5 minuti per inattivare l'enzima presente nelle eppendorf. Una volta terminato il processo, le eppendorf sono state fatte raffreddare sotto cappa e aliquotate all'interno della microplate.

3.2.3 Analisi statistica

Per tutte le analisi effettuate è stata valutata la significatività statistica tramite ANOVA a una via ($p<0.05$) seguita da Post-HOC test Tukey HSD (Honestly Significant Difference) tra campioni.

3.2.3.1 ANOVA

L'analisi della varianza a singola via (ANOVA) serve per determinare se a livello statistico vi è una differenza significativa tra le medie dei valori dei ceppi rispetto alla loro azione sul patogeno. Il nostro valore d'interesse in questo test sta ad indicare la significatività, comunemente indicata con α, il quale corrisponde alla probabilità di commettere un errore di tipo I, cioè rifiutare l'ipotesi nulla quando essa è vera. Nell'ANOVA, l'ipotesi nulla (H_0) afferma che tutte le medie dei gruppi sono uguali, mentre l'ipotesi alternativa (H_1) afferma che almeno una media è diversa. Tipicamente il valore di α è 0,05, e tanto più questo valore è basso, tanto più significa che le differenze tra le medie sono significative.

3.2.3.2 Tukey HSD (Honestly Significant Difference)

Si tratta di una procedura di confronti multipli a posteriori, utilizzata per identificare quali coppie di medie tra i gruppi sono statisticamente differenti tra loro. I risultati sono stati riportati nei grafici tramite l'aggiunta delle lettere sulle colonne o accanto ai nomi dei ceppi. I ceppi che condividono la stessa lettera (es. "a", "ab") non sono significativamente diverse tra loro, mentre quelli con lettere diverse (es. "b" vs "c") sono significativamente diversi (Tukey HSD, $p < 0.05$).

4. Risultati e discussioni

4.1 Agar spot test

Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C, le piastre di MRSA contenenti i ceppi di lattici selezionati e i patogeni sono state sottoposte alla valutazione dell'attività antimicrobica. Quest'ultima è stata definita come la differenza tra il diametro occupato dallo spot del ceppo di lattico e il diametro dell'alone d'inibizione prodotto nei confronti del patogeno. Le misurazioni delle aree sono state effettuate su tutte le piastre mediante il software ImageJ. I valori ottenuti sono stati quindi elaborati statisticamente, calcolando la media e la deviazione standard per ciascun ceppo lattico. I dati risultanti sono stati rappresentati graficamente in due grafici distinti, uno per ogni patogeno analizzato, al fine di individuare i ceppi lattici caratterizzati dalla più elevata attività antimicrobica.

4.1.1 Risultati inibizione *Escherichia coli*

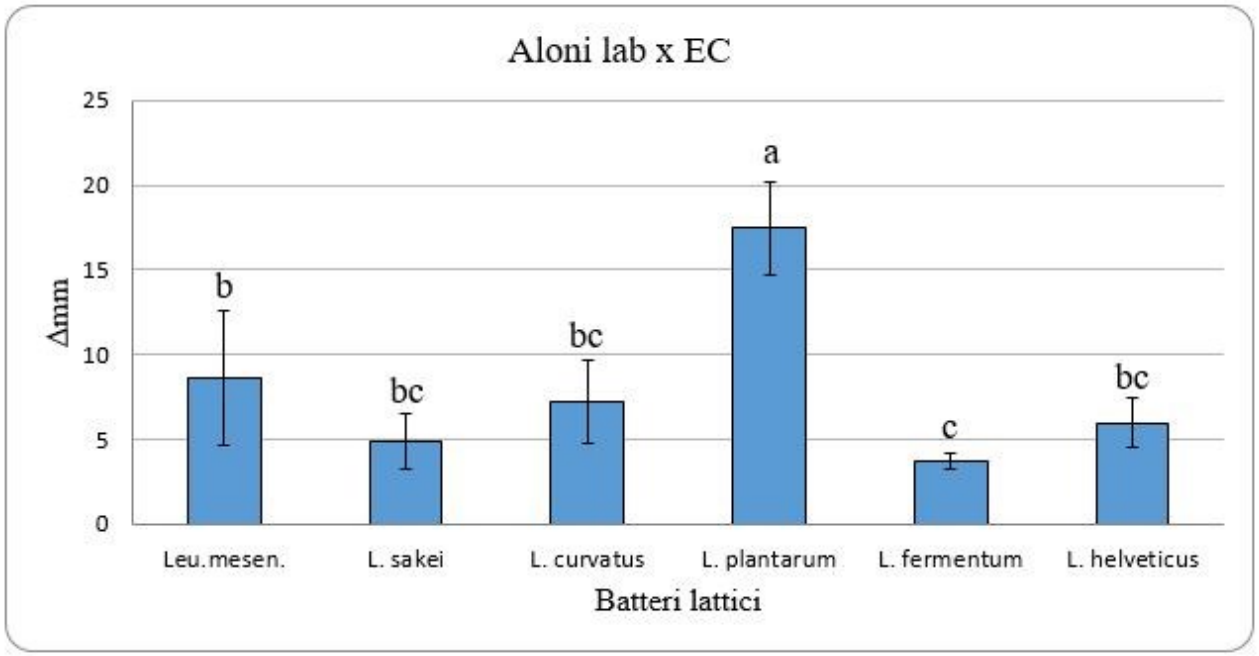


Grafico 1, resoconto aloni di inibizione microbica di ceppi di lattico su Escherichia coli. Per determinare la presenza o meno di differenze significative a livello statistico, è stata effettuata un'analisi della varianza a singolo fattore (ANOVA) e successivamente il test di Tukey HSD. Con un valore di α *pari a 0,0018, possiamo confermare la presenza di differenze significative tra i nostri gruppi. Una volta appurata questa ipotesi, si è effettuato il test di Tukey HSD. Come deduciamo dal grafico, ci sono ceppi che denotano una differenza significativa, specialmente Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides e Lactobacillus fermentum. Non è presente alcuna differenza significativa per i ceppi di Lactobacillus curvatus, sakei ed helveticus (bc), i quali presentano similitudini con i ceppi mesenteroides e fermentum. Al termine di questi risultati, possiamo affermare che il ceppo con maggiore attività antimicrobica contro il patogeno Escherichia coli è Lactobacillus plantarum, mentre Lactobacillus fermentum risulta il ceppo meno efficace tra quelli scelti.*

L'analisi dei diametri di inibizione evidenzia differenze significative tra i ceppi lattici testati nei confronti di *Escherichia coli*, confermando la natura ceppo-specifica dell'attività antagonista dei batteri lattici. In particolare, *Lactobacillus plantarum* ha mostrato il maggior effetto inibitorio, con valori significativamente superiori rispetto agli altri microrganismi. Tale risultato è coerente con la letteratura scientifica (García-Cano et al., 2019) (Arena et al., 2016), che attribuisce a *L. plantarum* un'elevata capacità di produrre batteriocine (es. plantaricine), acidi organici e composti in grado di compromettere l'integrità della membrana cellulare dei patogeni Gram-negativi. L'ampiezza dell'alone di inibizione è quindi riconducibile a un meccanismo multifattoriale, basato sia sull'acidificazione del microambiente, sia sulla sintesi di molecole antimicrobiche ad azione diretta.

4.1.2 Risultati inibizione *Staphylococcus aureus*

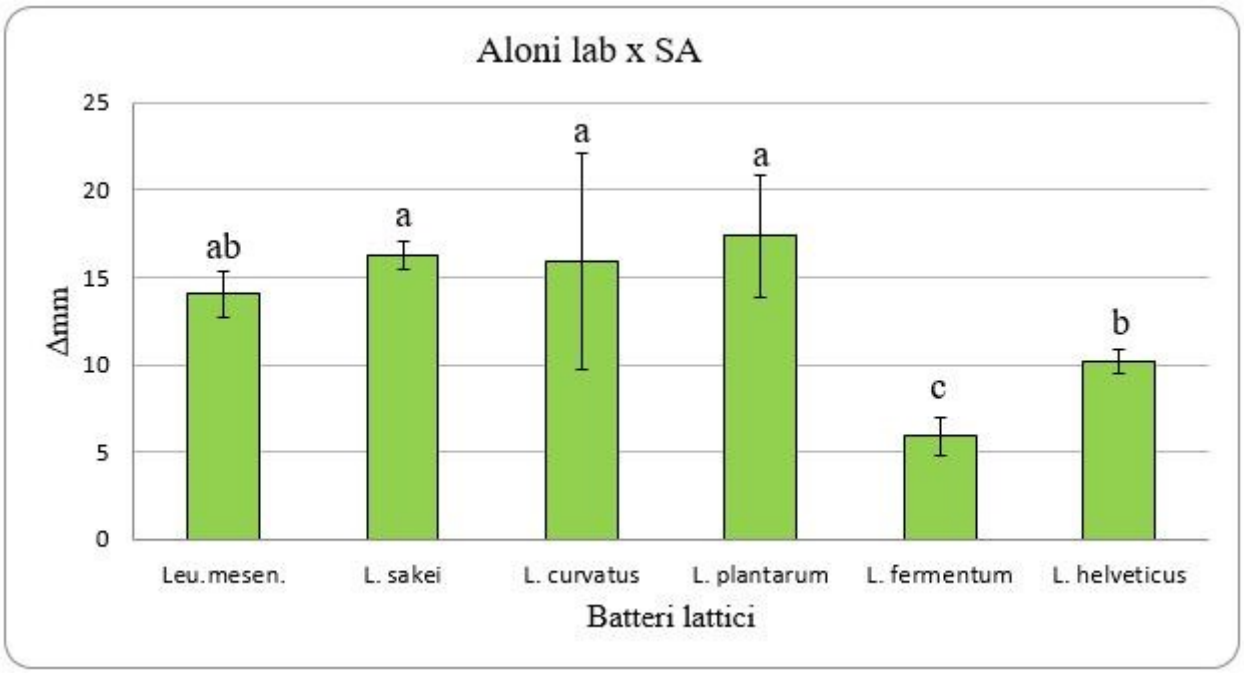


Grafico 2, resoconto aloni di inibizione microbica di ceppi di lattico su Staphylococcus aureus. Anche in questo caso è stata effettuata un'analisi della varianza a singolo fattore e in post hoc un test di Tukey HSD, per determinare la presenza di differenze significative nei risultati. Anche in questo caso, il valore di significatività α è al di sotto di 0,05 (0,0074), quindi siamo di fronte a una differenza significativa tra i ceppi. In post hoc, come per il grafico precedente, è stato effettuato il test di Tukey HSD. Le lettere sovrastanti le barre del grafico indicano le similarità tra i vari ceppi, evidenziando, in questo caso, una somiglianza tra i ceppi con maggior azione antimicrobica, cioè Lactobacillus sakei, Lactobacillus curvatus e Lactobacillus plantarum. I ceppi che sono statisticamente differenti rispetto a questi ultimi risultano essere Lactobacillus fermentum e Lactobacillus helveticus.

Andiamo ora ad analizzare il grafico a barre per l'effetto antimicrobico su *Staphylococcus aureus.* Si può notare come l'azione inibitoria dei ceppi lattici sia decisamente migliorata rispetto a quella su

Escherichia coli. I valori di inibizione osservati per *Lactobacillus plantarum*, *L. curvatus* e *L. sakei* ci permettono di affermare che sono i ceppi più efficaci, con valori medi superiori a quelli registrati per gli altri microrganismi. Tali risultati sono in linea con evidenze documentate in letteratura scientifica (Arena et al., 2016) (D. Arrioja-Bretón et al, 2020), che attribuiscono a questi taxa una produzione significativa di batteriocine (es. plantaricine, sakacine, curvaticine) e acidi organici come acido lattico e acetico, in grado di compromettere la parete cellulare e la funzionalità della membrana citoplasmatica di *S. aureus*, microrganismo Gram-positivo, particolarmente sensibile a sostanze ad azione batteriocinica e acidificante. *Leuconostoc mesenteroides* e *Lactobacillus helveticus* mostrano un effetto inibitorio intermedio, riconducibile alla produzione combinata di acidi organici, diacetile e peptidi bioattivi. Al contrario, *Lactobacillus fermentum* evidenzia l'inibizione più ridotta e statisticamente distinta, suggerendo una limitata capacità di interferire con la crescita di *S. aureus*. Ciò potrebbe dipendere da una minore produzione di batteriocine attive nei confronti dei Gram-positivi o da una sintesi quantitativamente inferiore di metaboliti secondari ad azione antagonista. In conclusione, l'eterogeneità dei risultati suggerisce una variabilità intra-specifica nell'attività antimicrobica dei lattobacilli, attribuibile a differenze nei metaboliti prodotti (presumibilmente acidi organici e batteriocine).

4.2 Broth microdilution method

Terminate le 12h ore di incubazione delle microplate e ottenute tutte le misurazioni di densità ottica (OD 600 nm), i valori ottenuti sono stati elaborati statisticamente, calcolando medie e deviazione standard per i singoli ceppi. I dati ottenuti sono stati raggruppati nei grafici seguenti, suddivisi a seconda dell'azione antimicrobica su ceppo patogeno e sul trattamento effettuato.

4.2.1 Filtrati (CFS)

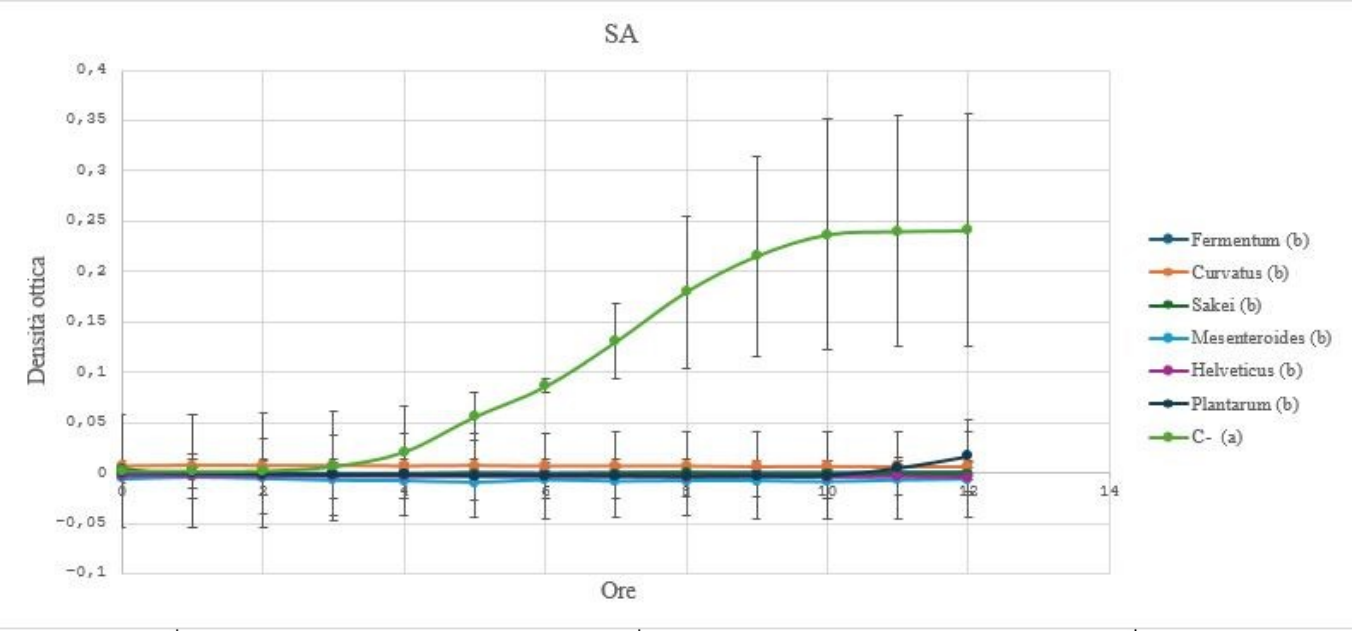


Grafico 3, Curve di crescita di Staphylococcus aureus in presenza di CFS dei vari ceppi lattici. Al *fine di verificare la significatività statistica delle differenze osservate, è stata condotta un'ANOVA a singolo fattore. I risultati mostrano una chiara differenza tra i gruppi (F = 15,61) con un valore di significatività estremamente basso ($\alpha = 2{,}2 \times 10^{-19}$), nettamente inferiore al valore critico di riferimento (F crit = 2,34). Questi dati confermano che le differenze rilevate tra i trattamenti non sono attribuibili al caso, bensì a un effetto reale esercitato dai metaboliti presenti nei filtrati. Successivamente è stato eseguito un test di Tukey per l'analisi post-hoc, i cui risultati sono stati riportati nel grafico mediante lettere affiancate al nome di ciascun ceppo. Tale analisi ha evidenziato che la differenza statisticamente significativa è presente unicamente tra il controllo negativo (C–) e i campioni di filtrato contenenti i ceppi lattici, mentre non sono emerse differenze rilevanti tra i diversi ceppi stessi, come intuibile dal grafico.*

Il grafico evidenzia che, nell'arco temporale delle 12 ore, la totalità dei ceppi testati *(L. fermentum, L. curvatus, L. sakei, Leuconostoc mesenteroides, L. helveticus e L. plantarum*) non ha determinato alcuna variazione nella curva di crescita nel tempo. Le loro traiettorie restano sostanzialmente allineate allo zero, indicando l'assenza di effetti proliferativi. Questo andamento, coerente con la letteratura scientifica (Arena et al., 2016) (D. Arrioja-Bretón et al, 2020), suggerisce che i metaboliti presenti nei rispettivi filtrati possiedono attività biologicamente attiva nei confronti del patogeno. In netta contrapposizione, il controllo negativo (*C–*) mostra un incremento progressivo della curva di crescita a partire dalla quinta ora, raggiungendo valori massimi compresi tra 0,25 e 0,30 nelle ultime ore di monitoraggio. Tale incremento testimonia la crescita del patogeno in assenza di fattori inibitori nel brodo di coltura impiegato. L'ampiezza delle barre di errore, più marcata nella fase finale, indica un aumento della variabilità biologica in corrispondenza della fase esponenziale di crescita, fenomeno frequentemente osservato nei sistemi microbiologici. In conclusione, l'esperimento conferma che,

indipendentemente dalle differenze qualitative e quantitative, tutti i ceppi di LAB sono in grado di bloccare efficacemente la proliferazione del patogeno.

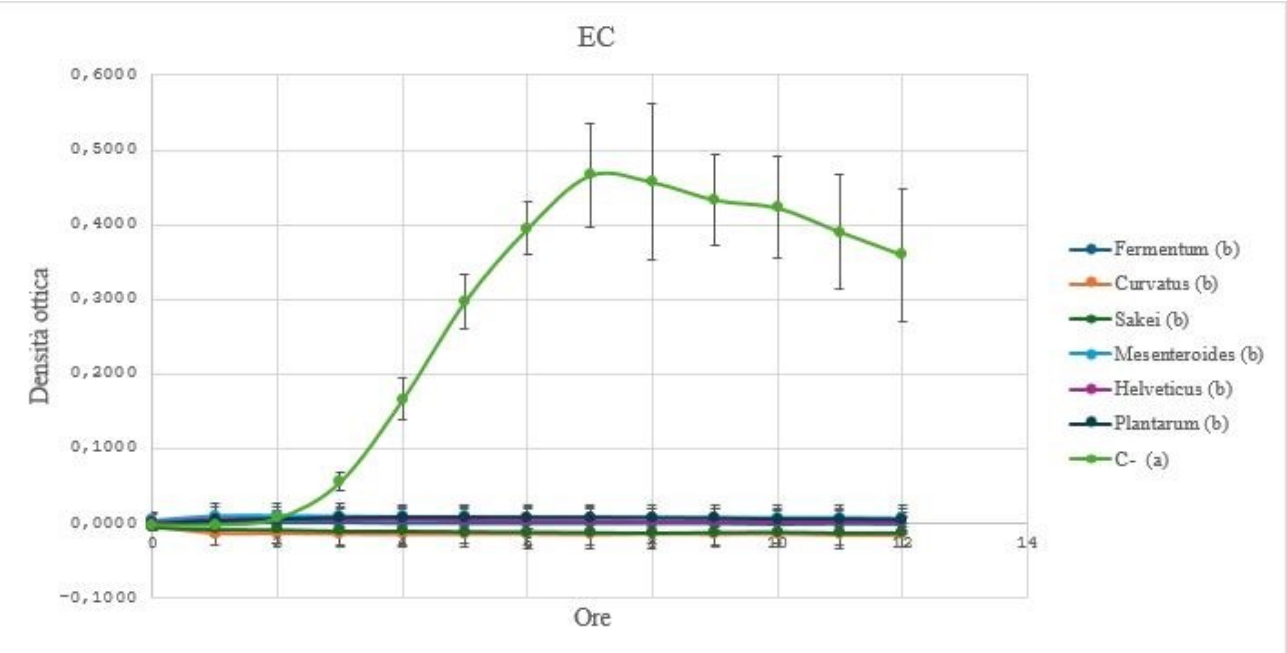


Grafico 4, Curve di crescita di Escherichia coli in presenza di CFS dei vari ceppi lattici. Per la determinazione della significatività, l'ANOVA a singolo fattore condotta sui dati ha confermato la presenza di una differenza significativa tra i ceppi. Il valore di F (25,85) risulta di gran lunga superiore al valore critico (F crit = 2,34), mentre il livello di significatività ($\alpha = 7{,}63 \times 10^{-15}$) è estremamente ridotto, escludendo che le differenze siano imputabili al caso. Anche in questo caso è stato effettuato un test di Tukey in post hoc, il quale ha evidenziato una differenza statisticamente significativa solo tra il controllo negativo (C-) e i vari ceppi di lattici, non facendo emergere differenze tra di loro come nel grafico precedente, come intuibile dal grafico.

Come nel grafico precedente, anche qui vi è l'evidenza che i ceppi testati *(L. fermentum, L. curvatus, L. sakei, Leuconostoc mesenteroides, L. helveticus e L. plantarum*) non hanno influenzato in maniera rilevante la curva di crescita nell'arco di 12 ore, mantenendosi costantemente su valori prossimi allo zero. Trovando riscontro coi test effettuati nella letteratura scientifica, (Arena et al., 2016) (D. Arrioja-Bretón et al, 2020), ciò suggerisce che i metaboliti presenti nei rispettivi filtrati esercitino effetti di inibizione sulla crescita nelle condizioni sperimentali adottate. Il controllo negativo (C–) invece mostra un andamento caratteristico di crescita, con un incremento marcato a partire dalla quarta ora e un picco compreso tra 0,45 e 0,50 raggiunto tra la 6ª e l'8ª ora. Tale incremento testimonia la crescita del patogeno in assenza di fattori inibitori nel brodo di coltura impiegato. L'aumento della variabilità, evidenziato dall'ampiezza delle barre di errore nella fase di crescita esponenziale, è un fenomeno atteso nei sistemi microbiologici. Si può quindi confermare che tutti i ceppi di LAB presenti nel test abbiano una forte attività antimicrobica rispetto a EC, determinata dalla presenza di sostanze con attività battericida come acidi organici o batteriocine.

4.3 Caratterizzazione dei CFS

4.3.1 Neutralizzati

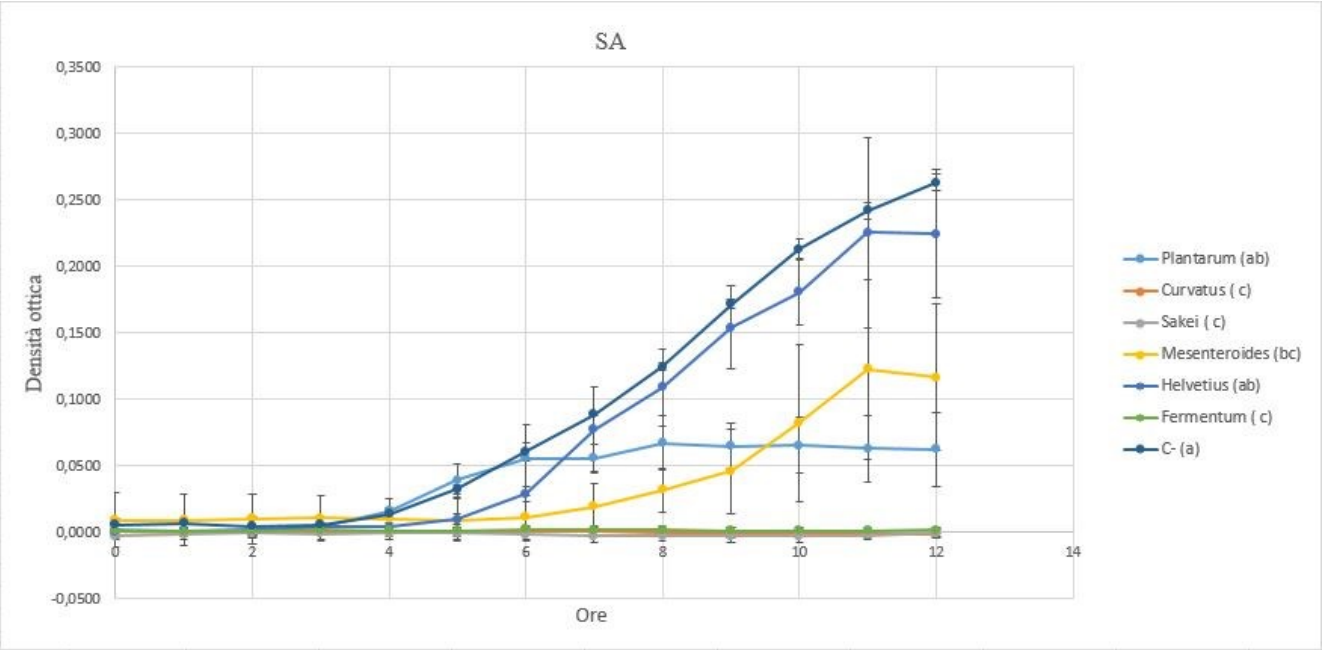


Grafico 5, Curve di crescita di Staphylococcus aureus in presenza di CFS neutralizzati dei vari ceppi lattici. Statisticamente, l'ANOVA a una via ha confermato la presenza di differenze statisticamente significative tra i gruppi ($F = 9,19$; $\alpha = 9,87 \times 10^{-8}$), evidenziando che il ceppo utilizzato rappresenta un fattore determinante nell'andamento della variabile misurata. Il successivo test di Tukey, riportato in figura mediante lettere accanto al nome dei ceppi, ha permesso di distinguere gruppi omogenei. Plantarum e Helveticus si collocano nel gruppo "ab", risultando tra i ceppi con la minore attività antimicrobica e significativamente distinti sia dal controllo (C–, gruppo "a") sia dai ceppi più attivi. Mesenteroides ("bc") occupa una posizione intermedia, condividendo parzialmente la significatività con entrambi i gruppi. Curvatus, Sakei e Fermentum ("c") si caratterizzano per i valori più bassi, determinando così la loro migliore azione antimicrobica rispetto agli altri campioni. Il controllo (C–), infine, conferma la sua assenza di attività antimicrobica, collocandosi nel gruppo "a" separato statisticamente dagli altri ceppi.

L'analisi dei campioni ha messo in evidenza comportamenti nettamente differenziati tra i surnatanti testati rispetto ai test precedenti. Come mostrato nel grafico, il CFS di *L. helveticus* ha presentato l'aumento più marcato, caratterizzato da una crescita progressiva e costante nel tempo. Si può dedurre che l'azione antimicrobica di *L. helveticus* possa essere data principalmente dalla presenza di acidi organici che, una volta neutralizzati, lo rendono praticamente inefficace contro SA. *Leu. mesenteroides e L. plantarum* hanno evidenziato un andamento intermedio, con un aumento significativo ma meno pronunciato rispetto al campione con maggior crescita, sottolineando la presenza di sostanze con un'azione antimicrobica moderata. Al contrario, i surnatanti di *L. Curvatus, L. Sakei e L. Fermentum* hanno mostrato valori molto contenuti e sostanzialmente stazionari per gran

parte del tempo, mentre il controllo negativo (C–) ha mostrato il classico andamento di crescita esponenziale. In conclusione, in accordo con la letteratura (Elyass ME et al, 2015) (Najjari A et al., 2020) si può dire che i metaboliti prodotti da *L. curvatus*, *L. sakei* e *L. fermentum* mostrano una marcata attività antimicrobica contro patogeni Gram-positivi come *Staphylococcus aureus*, probabilmente dovuta all'assenza della membrana esterna del patogeno, senza la quale queste sostanze portano alla formazione di pori sulla membrana citoplasmatica, provocando la morte cellulare.

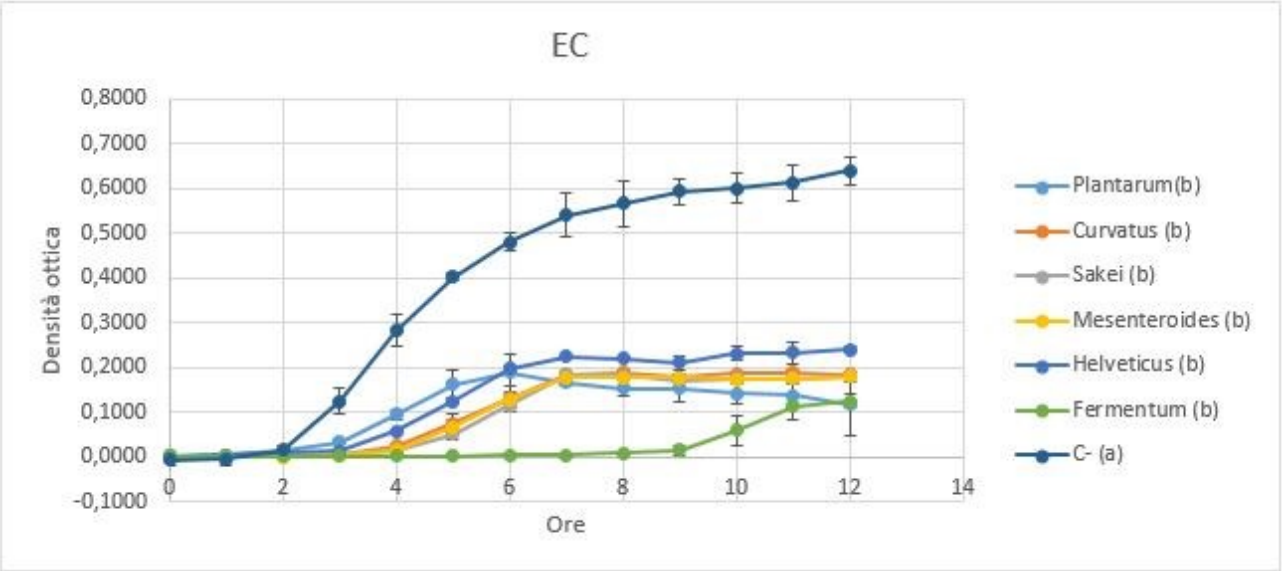


Grafico 6, Curve di crescita di Escherichia coli in presenza di CFS neutralizzati dei vari ceppi lattici. Con l'ANOVA a singola via è stata confermata la significatività delle differenze tra i gruppi ($F = 12,81$; $\alpha = 3,18 \times 10^{-10}$), con un valore nettamente superiore al critico (F crit $= 2,21$), evidenziando che il fattore CFS ha un impatto determinante sull'andamento della crescita. Con l'analisi post-hoc mediante test di Tukey, riportata nel grafico tramite lettere, si può dedurre che il controllo negativo (C–) collocato nel gruppo "a", essendo separato statisticamente da tutti gli altri campioni, i quali sono tutti stati associati al gruppo "b", conferma quanto l'effetto inibitorio dei metaboliti sia significativo rispetto al controllo. Nonostante ciò, non si può affermare di aver ottenuto un'attività battericida, ma unicamente batteriostatica, nei confronti di Escherichia coli.

Nel grafico si può notare come il controllo negativo (C–) ha mostrato la crescita più marcata, con un incremento rapido già nelle prime ore e valori di densità ottica che hanno raggiunto circa 0,65 al termine della prova. Al contrario, tutti i campioni dei surnatanti testati (*L. plantarum, L. curvatus, L. sakei, Leu. mesenteroides, L. helveticus e L. fermentum)* hanno registrato aumenti più contenuti, derivati dalla presenza di metaboliti, caratterizzati da una crescita progressiva ma limitata, che si è stabilizzata tra 0,15 e 0,25 nell'ultima fase. La risposta antimicrobica qui osservata trova riscontro con la letteratura, dove nei test effettuati da D. Arrioja-Bretón et al, 2020, sono stati riscontrati risultati

simili, confermando che i ceppi di *L plantarum e L. sakei* presentano la migliore risposta a ceppi patogeni gram-negativi come *Escherichia coli.*

4.3.2 Trattamenti termici

Per la caratterizzazione dei surnatanti tramite trattamenti termici, si è deciso di utilizzare esclusivamente i ceppi lattici che nelle prove precedenti hanno dimostrato un'attività antimicrobica migliore, ovvero *L. curvatus, L. fermentum e L. sakei*.

4.3.2.1 Trattamento a 60°C

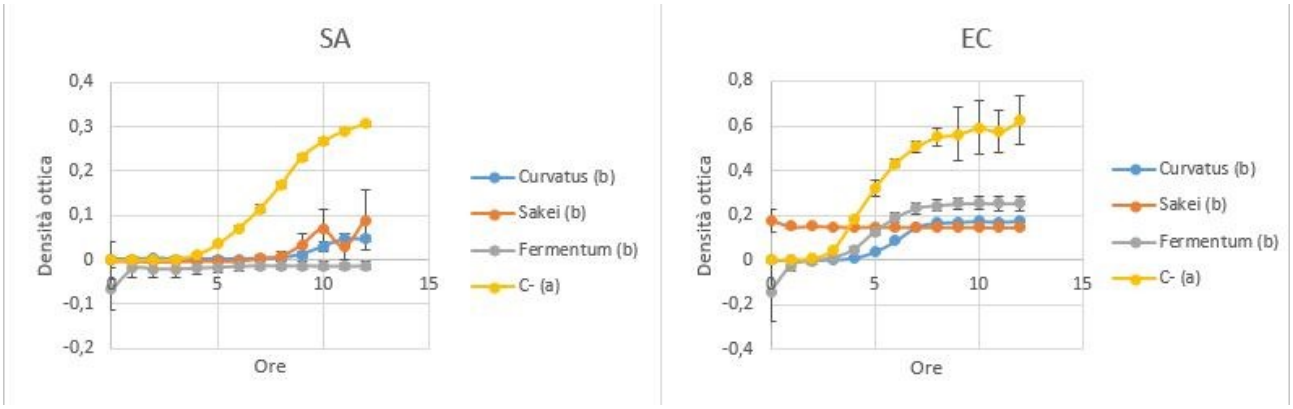


Grafico 7, Curve di crescita di Staphylococcus aureus ed Escherichia coli in presenza di CFS trattati a 60°C. Per entrambi i test è stata effettuata un ANOVA a singolo fattore e un test di Tukey HSD, per determinare la presenza di differenze significative. Sia con SA che con EC, è stata confermata la significatività delle differenze tra i gruppi, i quali hanno ottenuto rispettivamente valori di α inferiori a 0,05 (α SA = 1,36 × 10^{-5}; α EC = 0,000467). In post hoc è stato effettuato il consueto test di Tukey, il quale ha rivelato che l'unico campione significativamente diverso tra tutti è il C- (a), sia per SA che per EC, mentre tutti gli altri campioni (b) non presentano differenze significative tra loro.

I due grafici riportati qui sopra rappresentano l'andamento della densità ottica (OD600) misurata in funzione del tempo (ore), come indicatore diretto dell'attività antimicrobica, per i surnatanti dei ceppi *L. Curvatus, L. Sakei, L. Fermentum* rispetto al controllo C-, dove vi è la presenza di *Staphylococcus aureus* (SA) *ed Escherichia coli* (EC) in due sistemi differenti, entrambi trattati a 60°C. Nel grafico con SA, si osserva un incremento progressivo della OD esclusivamente nel controllo (C-), che raggiunge valori prossimi a 0,3 dopo 12 ore, con una crescita costante priva di fasi di latenza. I CFS testati, invece, non mostrano variazioni significative nel tempo, mantenendosi pressoché stabili attorno ai valori basali. Questo andamento suggerisce un'inibizione del ceppo patogeno inoculato anche dopo il trattamento termico. Nel grafico con EC, al contrario, si evidenzia una dinamica differente: oltre al controllo (C-), che presenta un incremento della OD con plateau intorno a 0,6 già

a partire dalla sesta ora, anche i campioni, dove sono presenti i nostri surnatanti, manifestano un aumento della densità ottica, seppur con entità diversa. In particolare, i CFS di *L. Fermentum* e di *L. Curvatus* mostrano un trend di crescita più sostenuto rispetto a quanto osservato in SA, raggiungendo valori compresi tra 0,15 e 0,25. Il CFS di *L. Sakei*, invece, mantiene un andamento quasi stazionario, simile a quanto osservato nel sistema SA. Si può quindi speculare sul fatto che l'aumento di densità ottica dei surnatanti con EC suggerisce una minor attività antimicrobica nello sviluppo del patogeno rispetto che nel sistema con SA, a parità di trattamenti termici effettuati. Per affermare ulteriormente le nostre speculazioni, troviamo riscontro con la letteratura, dove nello studio di Priscilia Y et al. 2015 sono stati testati vari ceppi di lattici, tra cui *L. fermentum,* a 65°C per 30 minuti su SA e EC. I risultati ottenuti da questo articolo evidenziano un mantenimento dell'attività antimicrobica anche dopo i trattamenti.

4.3.2.2 Trattamento a 90°C

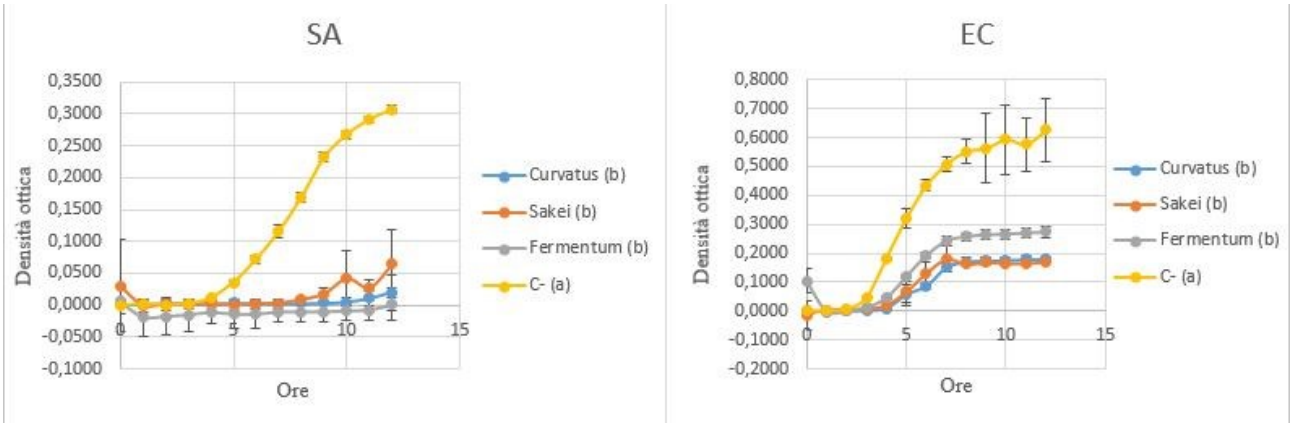


Grafico 8, Curve di crescita di Staphylococcus aureus ed Escherichia coli in presenza di CFS trattati a 90°C. Come da protocollo, successivamente sono stati effettuati un'analisi della varianza a singola via (ANOVA) per la significatività e un test di Tukey HSD in post hoc. I risultati dell'ANOVA descrivono la presenza di differenze significative in entrambi i test (α SA = 1,26 × 10^{-5}; α EC = 0,0003), confermata successivamente dal Tukey, il quale descrive per entrambi i test una differenza significativa tra C- (a) e i campioni con i surnatanti (b).

Il grafico per *Staphylococcus* mostra che in C- si ha la crescita del patogeno, con un aumento costante della OD fino a circa 0,3. I surnatanti derivati da *L. curvatus, L. sakei e L. fermentum* invece mantengono valori molto bassi e stabili, prossimi allo zero lungo tutto il periodo di osservazione. Questo indica un effetto antimicrobico marcato e persistente nei confronti di SA, nonostante il trattamento termico a 90°C. L'assenza di incrementi significativi di OD nei campioni trattati evidenzia un'inibizione quasi completa della crescita del patogeno. Per *Escherichia coli* si osserva un andamento differente. Il controllo (C-) evidenzia la maggiore crescita del patogeno, raggiungendo valori di OD superiori a 0,6 dopo circa 10 ore. I surnatanti di *L. curvatus* e *L. fermentum* mostrano un

effetto antimicrobico intermedio: la crescita del patogeno non è totalmente inibita, ma risulta comunque ridotta rispetto al controllo, con valori di OD finali intorno a 0,25–0,35. Il surnatante di *L. sakei*, invece, appare meno efficace, con valori più vicini al controllo e dunque un effetto inibente limitato. Anche in questo caso possiamo indagare sui risultati ottenuti come nel test precedente, nel quale si riflette la stessa situazione, ovvero che per tutti i surnatanti è mantenuta l'attività antimicrobica sia per SA che per EC, evidenziando quindi che i metaboliti presenti sono termoresistenti. In letteratura, troviamo un riscontro con Priscilia Y et al. 2015, in cui vari ceppi di *L.fermentum* sono stati testati a 100°C per 30 minuti, mantenendo un'attività antimicrobica residua del 80-90% su patogeni come SA e EC, confermando quanto provato nel nostro test.

4.3.2.3 Trattamento a 121°C

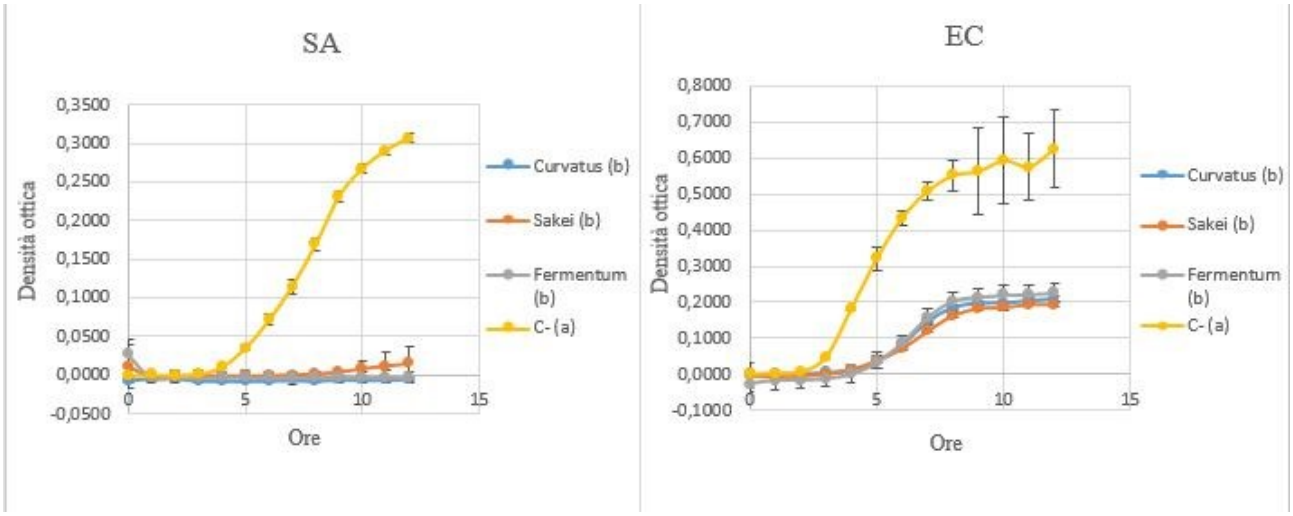


Grafico 9, Curve di crescita di Staphylococcus aureus ed Escherichia coli in presenza di CFS trattati a 121°C. Anche in questo caso sono stati effettuati un'analisi della varianza a singola via (ANOVA) per la significatività e un test di Tukey HSD in post hoc. I risultati dell'ANOVA descrivono la presenza di differenze significative in entrambi i test (α SA = 6,69× 10^{-6}; α EC = 1,53 × 10^{-4}), confermata successivamente dal Tukey, il quale descrive per entrambi i test una differenza significativa tra C- (a) e i campioni con i surnatanti (b).

Come di consuetudine, in entrambi i grafici si può notare una netta crescita dei controlli negativi, (C-), mostrando una propensione del patogeno *Escherichia coli* ad una crescita maggiore rispetto ad SA, determinata dai loro valori di OD nelle 12 ore. Nel grafico per *Staphylococcus,* i surnatanti derivati dai ceppi *L. curvatus, L. sakei e L. fermentum* mantengono valori molto bassi e pressoché costanti per l'intera durata dell'esperimento, prossimi allo zero. Questo indica un effetto antimicrobico marcato e resistente al trattamento termico estremo, con inibizione quasi totale della crescita del patogeno, evidenziando una specificità per i patogeni gram-positivi. Nel caso di *Escherichia coli*, i surnatanti

di *L. curvatus, L. sakei e L. fermentum*, pur mantenendo un certo grado di attività antimicrobica rispetto al controllo, mostrano una capacità inibente meno marcata rispetto a quanto osservato su SA: la OD finale dei campioni trattati si stabilizza attorno a valori compresi tra 0,2 e 0,25. Questo suggerisce che EC conserva una maggiore resistenza ai metaboliti antimicrobici, anche dopo esposizione a 121°C. Troviamo una discrepanza con la letteratura scientifica rispetto ai risultati ottenuti in Priscilia Y et al. 2015 e in Elyass ME et al, 2015, dove il trattamento termico a 121 °C per 15 minuti ha determinato una drastica compromissione dell'attività antimicrobica dei ceppi *L. fermentum e L.curvatus* nei confronti di *Staphylococcus aureus* ed *Escherichia coli*. Tale riscontro suggerisce che i composti bioattivi responsabili dell'effetto inibente (presumibilmente batteriocine) subiscono denaturazione o degradazione significativa a temperature superiori al punto di stabilità strutturale, cosa che non succede nel nostro caso studio.

4.3.3 Trattamenti enzimatici

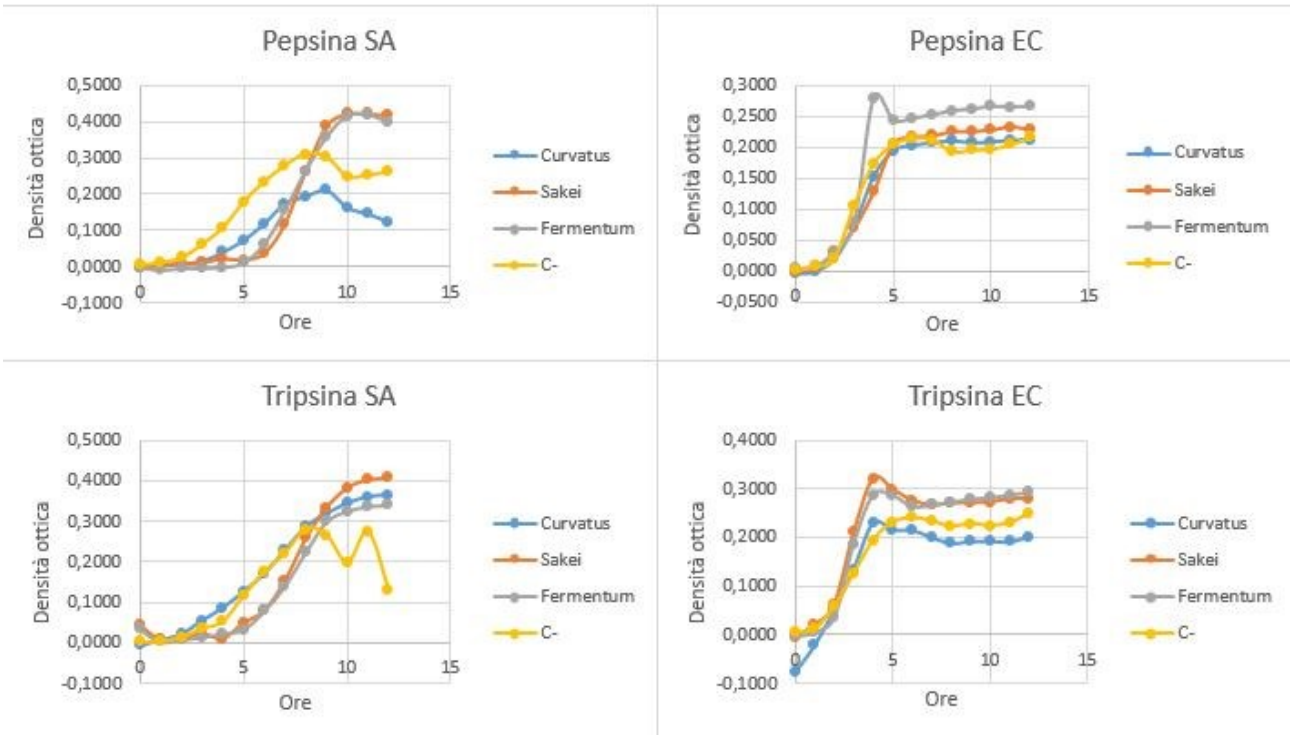


Grafico 10, Curve di crescita di Staphylococcus aureus ed Escherichia coli in presenza di CFS trattati con pepsina e tripsina. Il test statistico ANOVA a singola via risalta ulteriormente l'evidenza dei grafici, riscontrando dei risultati che indicano un'assenza di differenze significative in tutti i quattro test (α pepsina EC = 0,6403; α pepsina SA = 0,5491; α tripsina EC = 0,2891; α tripsina SA = 0,8335). Questo test rivela, con ogni probabilità, la natura proteica dei metaboliti presenti nei CFS, aprendo alla possibilità che i ceppi testati possano effettivamente produrre batteriocine.

Come si può dedurre dai grafici, il trattamento con pepsina ha ridotto l'attività antimicrobica dei surnatanti. Tutti i campioni mostrano un aumento progressivo della densità ottica dei patogeni: per

Staphylococcus aureus (SA) con valori finali compresi tra 0,25 e 0,45, mentre per *Escherichia coli* (EC) si sono raggiunti valori compresi tra 0,20 e 0,30. In particolare, si possono notare i surnatanti di *L. curvatus* e *L. fermentum*, i quali evidenziano valori differenti rispetto agli altri: *L. curvatus* mostra un'attività antimicrobica maggiore per SA, evidenziando come l'enzima abbia parzialmente inattivato i metaboliti, mentre *L. fermentum* indica un'inibizione meno marcata per EC. Il controllo (C-) mantiene valori di OD intermedi, sovrapponendosi in parte agli andamenti osservati nei ceppi. Nel complesso, la pepsina sembra neutralizzare gran parte dell'attività antimicrobica dei metaboliti, riducendo le differenze tra ceppi e controllo. Questo risultato può essere giustificato grazie a vari articoli scientifici: come quello di Priscilia Y et al. 2015, dove i risultati ottenuti per il ceppo *L. fermentum* sono simili a quelli appena elencati, o anche in quello di Elyass ME et al, 2015, nel quale si parla anche dell'azione della pepsina sui surnatanti di *L.curvatus*, dimostrando anche qui uno scenario simile a quello del nostro studio. Il trattamento con tripsina produce un quadro analogo: le crescite dei patogeni non risultano essere efficacemente inibite dai surnatanti. Tutti i ceppi mostrano valori di OD finali simili, compresi tra 0,35 e 0,45 per *Staphylococcus aureus* e tra 0.20 e 0.30 per *Escherichia coli*, con andamenti molto ravvicinati. Solo il controllo (C-) per SA appare in parte differente, con una curva meno regolare e valori leggermente inferiori, ma non tali da indicare una reale inibizione. L'effetto antimicrobico risulta essere praticamente annullato in seguito all'azione della tripsina, sottolineando la natura proteica dei metaboliti presenti nei surnatanti. Anche qui possiamo trovare dei riscontri con la letteratura, nell'articolo di Svetoslav Dimitrov Todorov et al, 2013, dove tramite tripsina vi è la completa inattivazione dei metaboliti prodotti da *L. sakei.*

5. Conclusioni

L'obiettivo di questa tesi di ricerca era quello di valutare il potenziale antimicrobico di metaboliti prodotti da batteri lattici, con la possibilità successiva di applicazione in sistemi di active packaging. Per determinare il potenziale antimicrobico sono stati effettuati vari test per verificare l'efficacia e la natura di questi metaboliti nei confronti di patogeni umani comunemente riscontrabili nell'ambito alimentare, come *Staphylococcus aureus ed Escherichia coli*. La scelta di questi patogeni non è casuale, per avere uno spettro di risposta antimicrobica più completa, siamo andati a scegliere un batterio Gram positivi e un Gram negativo, così da determinare se la presenza o meno dello strato di peptidoglicano potesse incidere sul risultato. Dall'analisi dei risultati ottenuti nei test con cellule *in vitro*, tramite l'agar spot test, è stato evidenziato come l'attività antimicrobica non fosse la stessa per tutti i ceppi lattici, ma che ci fossero ceppi con maggior potenziale antimicrobico rispetto ad altri. Per andare a determinare se la presenza delle cellule vive dei lattici potesse influenzare o meno lo spettro di attività antimicrobica, è stato deciso di effettuare dei test in broth microdilution method, verificando così l'attività dei surnatanti filtrati (CFS). La caratterizzazione dei surnatanti tramite filtrazione e neutralizzazione, ci ha permesso di definire quali fossero i ceppi lattici con un'azione inibitoria migliore, ovvero *Lactobacillus curvatus, Lactobacillus sakei e Lactobacillus fermentum*. I surnatanti filtrati di questi ceppi sono stati ulteriormente trattati tramite l'impiego di temperature ed enzimi per caratterizzarne i metaboliti presenti. Dall'analisi complessiva dei dati ottenuti emerge con chiarezza che i surnatanti dei ceppi lattici testati possiedono un'attività antimicrobica di rilievo, capace di ridurre in maniera significativa la crescita dei patogeni SA ed EC. Nei test condotti a differenti temperature (60°C, 90°C e 121°C) questa attività si mantiene quasi inalterata: le curve di crescita dei campioni trattati restano sempre nettamente inferiori a quelle del controllo non trattato, soprattutto nei confronti di *Staphylococcus aureus*, che risulta il microrganismo più sensibile. Anche contro *E. coli* l'effetto è evidente, sebbene più contenuto, con valori finali di crescita superiori rispetto a SA ma comunque significativamente più bassi del controllo. La persistenza dell'attività dopo trattamenti termici così drastici, fino a 121°C, indica che i fattori antimicrobici sono termostabili, caratteristica particolarmente interessante in prospettiva applicativa. Il quadro cambia radicalmente quando i surnatanti vengono sottoposti a digestione enzimatica con pepsina e tripsina. In questo caso, l'inibizione della crescita dei patogeni scompare quasi del tutto e le curve di crescita tornano a sovrapporsi a quelle del controllo, sia per SA che per EC. Questo dato fornisce un'evidenza diretta che l'attività antimicrobica è dovuta a molecole di natura proteica, sensibili alla degradazione proteolitica. La combinazione di termostabilità e sensibilità agli enzimi proteolitici suggerisce con forza la presenza di batteriocine o peptidi antimicrobici come principali responsabili dell'effetto

osservato. Le analisi statistiche confermano in modo concreto queste osservazioni. L'ANOVA a una via evidenzia differenze altamente significative tra i gruppi per entrambi i patogeni, registrando valori di molto inferiori a 0,05. Si tratta di risultati che indicano un effetto consistente dei diversi trattamenti, con una varianza spiegata particolarmente elevata nel caso di SA, coerente con la maggiore sensibilità di questo microrganismo ai composti prodotti dai lattici. Dal punto di vista biologico, la differenza di risposta tra SA ed EC può essere spiegata con la diversa struttura della parete cellulare: i Gram-positivi, come SA, sono notoriamente più vulnerabili a peptidi antimicrobici che agiscono sulla membrana, mentre la membrana esterna dei Gram-negativi come EC può rappresentare una barriera parziale, limitando l'accesso delle molecole attive. Questo dato è di rilievo perché conferma una certa specificità di spettro e suggerisce che l'impiego dei surnatanti possa risultare particolarmente efficace nei confronti di patogeni Gram-positivi. Per quanto riguarda le possibilità applicative di queste molecole, sarà fondamentale identificarle in modo diretto, attraverso procedure di purificazione e caratterizzazione come cromatografia, spettrometria di massa e sequenziamento peptidico, per poi completare la verifica dei possibili fattori accessori come acidi organici o perossido di idrogeno mediante controlli specifici. Infine, servirà la validazione in matrici alimentari reali, con valutazione della stabilità nel tempo e dell'eventuale impatto sensoriale, le quali rappresentano il passo necessario per tradurre questi risultati in applicazioni concrete.

In conclusione, i dati indicano in modo coerente e convergente che i ceppi lattici studiati producono peptidi antimicrobici termostabili, efficaci soprattutto contro SA e in grado di ridurre in modo significativo anche la crescita di EC. Questa combinazione di caratteristiche come efficacia, termostabilità e origine naturale, conferisce ai surnatanti un potenziale applicativo di grande interesse per il controllo microbiologico in ambito alimentare, aprendo la strada a future ricerche orientate alla caratterizzazione molecolare e allo sviluppo di nuovi composti bio protettivi.

6. Bibliografia

Kim HS, Lee SY, Kang HJ, Joo ST, Hur SJ. Effects of Six Different Starter Cultures on Mutagenicity and Biogenic Amine Concentrations in Fermented Sausages Treated with Vitamins C and E. Food Sci Anim Resour. 2019 Dec;39(6):877-887. doi: 10.5851/kosfa.2019.e66.

Bu, Y.; Liu, Y.; Liu, Y.; Wang, S.; Liu, Q.; Hao, H.; Yi, H. Screening and Probiotic Potential Evaluation of Bacteriocin-Producing *Lactiplantibacillus plantarum* In Vitro. *Foods* **2022**, *11*, 1575.

Schneider, C., Rasband, W. & Eliceiri, K. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**, 671–675 (2012). https://doi.org/10.1038/nmeth.2089

Vincenzini M., Romano P., Farris G.A.(2005) Microbiologia del vino. Edizioni Ambrosiana.

Parada JL, Caron CR, Medeiros ABP, Soccol CR. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. Braz arch biol technol [Internet]. 2007May;50(3):512–42. Available from: https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000300018

Šuškovic, J., Kos, B., Beganovi c, J., Leboš Pavunc, A., Habjani c, K., and Matošic, S. (2010). Antimicrobial activity–the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. Food Techn. Biotechnol. 48,296–307.

Arena Mattia Pia, Silvain Amandine , Normanno Giovanni , Grieco Francesco , Drider Djamel , Spano Giuseppe , Fiocco Daniela. Use of Lactobacillus plantarum Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms, Frontiers in Microbiology; Volume 7 – 2016 (2016) https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.00464
DOI=10.3389/fmicb.2016.00464; ISSN=1664-302X

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J. M. D., and de Souza Oliveira, R. P. (2014). Overview of Lactobacillus plantarum as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food Res. Int. 64, 527–536. doi: 10.1016/j.foodres.2014.07.041

Singh S., Goswami P., Singh R., Heller K. J., 2008. Application of molecular identification tools for Lactobacillus, with a focus on disrimination between closely related species: a review. LWT-Food Science and Technology, 1-10.

Wang Yaqi, Wu Jiangtao , Lv Mengxin , Shao Zhen , Hungwe Meluleki , Wang Jinju , Bai Xiaojia , Xie Jingli , Wang Yanping , Geng Weitao. Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and

the Expanding Applications in Food Industry Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, Volume 9 – 2021, 2021, DOI=10.3389/fbioe.2021.612285, ISSN=2296-4185

Aguirre-Garcia, Y.L.; Nery-Flores, S.D.; Campos-Muzquiz, L.G.; Flores-Gallegos, A.C.; Palomo-Ligas, L.; Ascacio-Valdés, J.A.; Sepúlveda-Torres, L.; Rodríguez-Herrera, R. Lactic Acid Fermentation in the Food Industry and Bio-Preservation of Food. *Fermentation* **2024**, *10*, 168. https://doi.org/10.3390/fermentation10030168

Guo, M.; Song, W. The Growing US Bioeconomy: Drivers, Development, and Constraints. *New Biotechnol.* **2019**, *49*, 48–57.

Daliri, F.; Aboagye, A.A.; Daliri, E.B.-M. Inactivation of foodborne pathogens by lactic acid bacteria. *J. Food Hyg. Saf.* **2020**, *35*, 419–429.

Zapaśnik, A.; Sokołowska, B.; Bryła, M. Ruolo dei batteri lattici nella conservazione e sicurezza degli alimenti. *Foods* **2022** , *11* , 1283.

Stiles, M E. "Bacteriocins produced by Leuconostoc species." *Journal of dairy science* vol. 77,9 (1994): 2718-24. doi:10.3168/jds.S0022-0302(94)77214-3

Garvie, E. 1. 1986. Genes Leuconostoc. Page 1071 in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. P.H.A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and 1. G. Holt, ed. Williams and Wilkins, Baltimore, MD

Drinan, D. F., S. Toroin, and T. M. Cogan. 1976. Citric acid metabolism in hetero- and homofermentative lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 31: 481.

Tilbury, R. H. 1975. Occurrence and effects of lactic acid bacteria in the sugar industry. Page 177 ill Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. 1. G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting, ed. Academic Press, London, England.

Shaw, B. G., and C. D. Harding. 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuumpacked beef, pork, lamb and bacon. J. Appl. Bacteriol. 56:25.

Hechard, Y., B. Derijard, F. Letellier, and Y. Cenatiempo. 1992. Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-Listeria bacteriocin from Leuconostoc mesenteroides. J. Gen. Microbiol. 138:2725

Van Laack, R.L.J.M., U. Schillinger, and W. H. Holzapfel. 1992. Characterization and partial purification of a bacteriocin produced by Leuconostoc carnosum LA44A. Int. J. Food Microbiol. 16:183.

Lewus, C. B., A. Kaiser, and T. 1. Montville. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57:1683.

Lewus, C. B., S. Sun, and T. J. Montville. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical Leuconostoc paramesenteroides strain. Appl. Environ. Microbiol. 58:143.

Shaw, B. G., and C. D. Harding. 1989. Leuconostoc gtlidum sp. nov. and Leuconostoc camosum sp. nov. from chill-stored meats. Int. J. Syst. Bacteriol. 39:217

Akira Tsuji, Sanae Okada, Pascal Hols, Eiichi Satoh, Metabolic engineering of Lactobacillus plantarum for succinic acid production through activation of the reductive branch of the tricarboxylic acid cycle, Enzyme and Microbial Technology, Volume 53, Issue 2, 2013, Pages 97-103, ISSN 0141-0229, https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2013.04.008.

Isipato M, Dessì P, Sánchez C, Mills S, Ijaz UZ, Asunis F, Spiga D, De Gioannis G, Mascia M, Collins G, Muntoni A, Lens PNL. Propionate Production by Bioelectrochemically-Assisted Lactate Fermentation and Simultaneous CO_2 Recycling. Front Microbiol. 2020 Dec 15;11:599438. doi: 10.3389/fmicb.2020.599438. PMID: 33384675; PMCID: PMC7769879.

Obafemi, Y.D., Obiukwu, A.C. & Oranusi, S.U. Revisiting the application, current trends, and prospect of bacteriocins in food preservation. *Discov Food* **5**, 165 (2025). https://doi.org/10.1007/s44187-025-00472-w

Wang, J.; Liu, R.; Huang, X.; Bao, Y.; Wang, X.; Yi, H.; Lu, Y. The Effect of Nanoscale Modification of Nisin by Different Milk-Derived Proteins on Its Physicochemical Properties and Antibacterial Activity. *Foods* **2024**, *13*, 1606. https://doi.org/10.3390/foods13111606

Tadi SR, Mukherjee S, Sekhar S, Ramesh A, Sivaprakasam S. Valorization and kinetic modelling of pediocin production from agro and dairy industrial residues by *Pediococcus pentosaceus* CRA51. Waste Biomass Valori. 2024;15(4):2099–120. https://doi.org/10.1007/s12649-023-02257-7.

Steier V, Prigolovkin L, Reiter A, Neddermann T, Wiechert W, Reich SJ, Riedel CU, Oldiges M. Automated workflow for characterization of bacteriocin production in natural producers *Lactococcus*

lactis and *Latilactobacillus sakei*. Microb Cell Fact. 2024;23(1):74. https://doi.org/10.1186/s12934-024-02349-6.

Verma DK, Thakur M, Singh S, Tripathy S, Gupta AK, Baranwal D, Patel AR, Shah N, Utama GL, Niamah AK, Chávez-González ML. Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: biosynthesis, separation and application. Food Biosci. 2022;46: 101594. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101594.

Inovejas RC, Divina CC, Jacob JK, Abucay JB Jr, Inovejas EL. Antimicrobial activities and characterization of bacteriocin-like substances isolated from lactic acid bacteria of local fermented foods. Microbiology. 2024;93(4):450–8. https://doi.org/10.1134/S0026261723601999.

Peng Z, Xu X, Fan P, Qiao B, Xie M, Huang T, Xiong T. Identification and characterization of a novel pH and heat stable bacteriocin-like substance lactococcin036019 with food preserving potential. Food Control. 2023;148: 109682. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109682.

Strack L, Carli RC, da Silva RV, Sartor KB, Colla LM, Reinehr CO. Food biopreservation using antimicrobials produced by lactic acid bacteria. Res Soc Dev. 2020;9(8):e998986666. https://doi.org/10.33448/rsd-v9i8.6666.

Nisa M, Dar RA, Fomda BA, Nazir R. Combating food spoilage and pathogenic microbes via bacteriocins: a natural and eco-friendly substitute to antibiotics. Food Control. 2023;149: 109710. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.109710.

Lahiri D, Nag M, Dutta B, Sarkar T, Pati S, Basu D, Abdul Kari Z, Wei LS, Smaoui S, Wen Goh K, Ray RR. Bacteriocin: a natural approach for food safety and food security. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:1005918. https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1005918

Herlina VT, Setiarto RH. Terasi, exploring the Indonesian ethnic fermented shrimp paste. J Ethn Foods. 2024;11(1):7. https://doi.org/10.1186/s42779-024-00222-w.

Aouadhi C, Turki M, Maaroufi A. Screening and characterization of lactic acid bacteria with antibacterial effect against heat-resistant spore outgrowth of *Bacillus sporothermodurans*. Int Dairy J. 2024;158(1):106047. https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2024.106047.

Nirmal NP, Santivarangkna C. Bio-preservation of dairy products: a non-thermal processing and preservation approach for shelf-life extension of dairy products. In Non-thermal processing technologies for the dairy industry 2021 (pp. 111–126). CRC Press.

García-Cano, Israel et al. “Lactic acid bacteria isolated from dairy products as potential producers of lipolytic, proteolytic and antibacterial proteins.” *Applied microbiology and biotechnology* vol. 103,13 (2019): 5243-5257. doi:10.1007/s00253-019-09844-6

D. Arrioja-Bretón, E. Mani-López, E. Palou, A. López-Malo,Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef, Food Control, Volume 115, 2020, 107286, ISSN 0956-7135, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286.

Elyass ME, Altayar MA, Mahdi AA, Abdelrawaf SS, Shigidi MT, et al. (2015) Characterization and Evaluation of Antimicrobial Activity of Bacteriocins from Lactobacillus Curvatus and Pediococcus Pentosaceus. J Infect Non Infect Dis 1: 001. DOI:10.24966/INID-8654/100001

Najjari A, Boumaiza M, Jaballah S, Boudabous A, Ouzari HI. Application of isolated *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus xylosus* strains as a probiotic starter culture during the industrial manufacture of Tunisian dry-fermented sausages. Food Sci Nutr. 2020 Jul 3;8(8):4172-4184. doi: 10.1002/fsn3.1711. PMID: 32884698; PMCID: PMC7455971.

Priscilia Y. Heredia-Castro, José I. Méndez-Romero, Adrián Hernández-Mendoza, Evelia Acedo-Félix, Aarón F. González-Córdova, Belinda Vallejo- Cordoba, Antimicrobial activity and partial characterization of bacteriocin-like inhibitory substances produced by Lactobacillus spp. isolated from artisanal Mexican cheese, Journal of Dairy Science,Volume 98, Issue 12,2015, Pages 8285-8293, ISSN 0022-0302, https://doi.org/10.3168/jds.2015-10104.

Svetoslav Dimitrov Todorov, Manuela Vaz-Velho, Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, Wilhelm Heinrich Holzapfel, Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of Lactobacillus sakei, isolated from salpicao, a fermented meat product from North-West of Portugal, Food Control, Volume 30, Issue 1,2013, Pages 111-121, ISSN 0956-7135, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.07.022.

Immagini

Cheah, Siang Aun & Chai, Choi & Tan, Inn shi & Foo, Henry & Lam, Man. (2022). Review - New prospect of algae for sustainable production of lactic acid: Opportunities and challenges. Progress in Energy and Environment. 21. 19-28. 10.37934/progee.21.1.1928.