

*Corso: Microbiologia Molecolare e Genomica
Microbica*

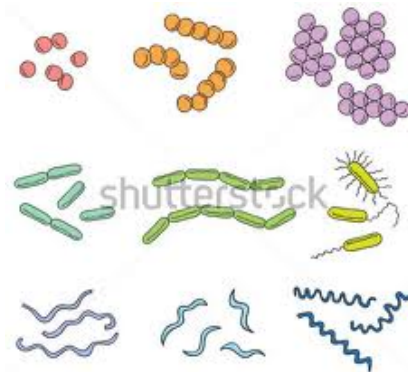
IL MICROBIOTA ALIMENTARE

Chiara Devirgiliis

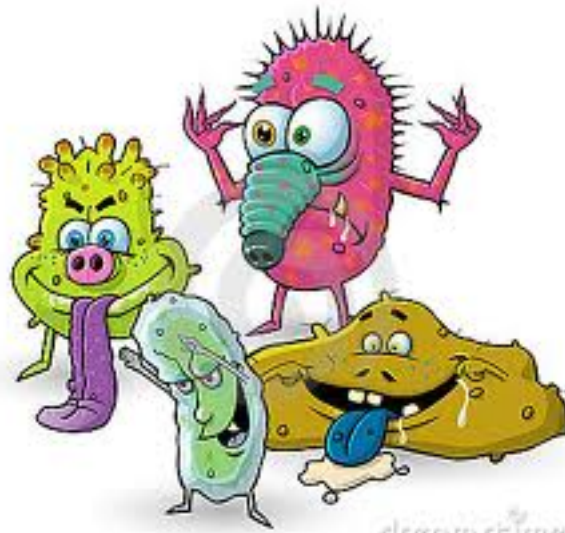


CREA-AN
Centro Ricerca Alimenti e Nutrizione
chiara.devirgiliis@crea.gov.it

Numerosi alimenti vengono prodotti sfruttando la capacità di microrganismi di operare trasformazioni biochimiche che conferiscono a ciascun prodotto le caratteristiche organolettiche tipiche



.....d'altra parte molti altri microrganismi sono responsabili di deterioramento o contaminazione di vari alimenti.....

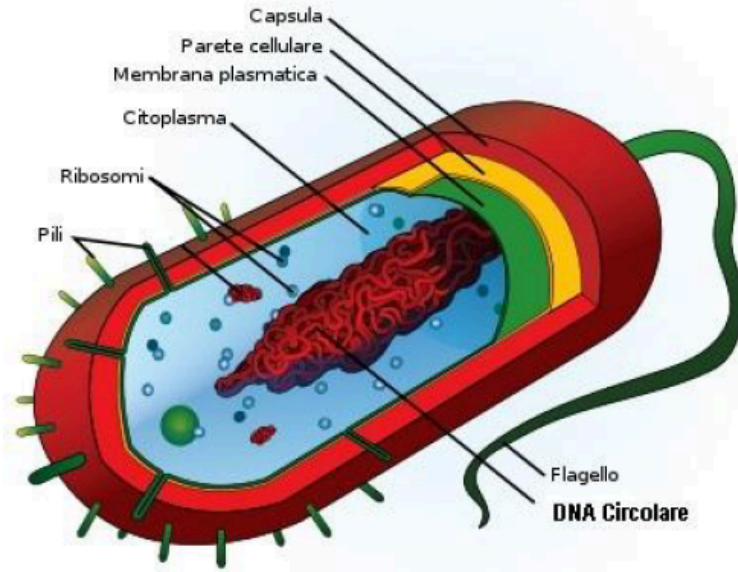


dreamstime.com

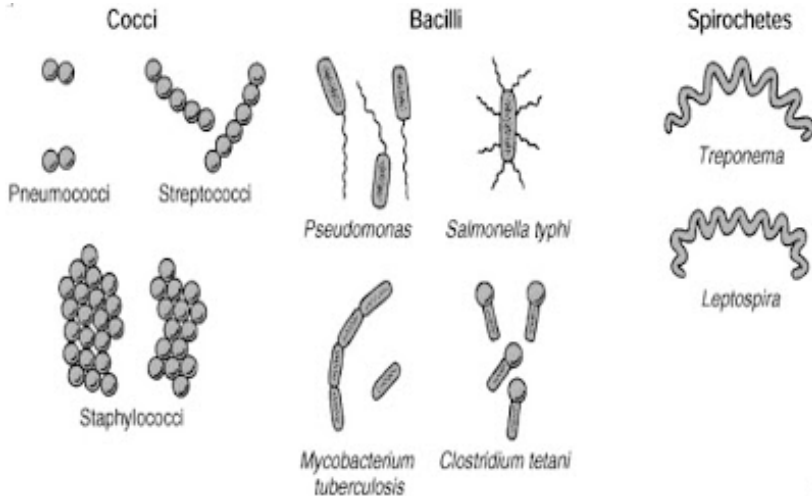


**QUALI SONO I PRINCIPALI
MICROORGANISMI PRESENTI
NEGLI ALIMENTI?**

BATTERI



dimensioni: 0.5-2 micron



- ORGANISMI PROCARIOTI
- MOLTIPLICAZIONE PER SCISSIONE BINARIA
- MOBILI/IMMOBILI
- PARETE CELLULARE COMPLESSA COSTITUITA DA PEPTIDOGLICANO (Gram + e -)
- MORFOLOGIE DIVERSE
- STRAORDINARIA VERSATILITA' METABOLICA
- ADATTAMENTO ALLA SOPRAVVIVENZA IN AMBIENTI OSTILI (spore)
- CRESCITA E SOPRAVVIVENZA INFLUENZATE DA CONDIZIONI AMBIENTALI

FUNGHI

- ❖ EUCARIOTI
- ❖ DUE PRINCIPALI GRUPPI DI INTERESSE ALIMENTARE: **LIEVITI**
E MUFFE
- ❖ ETEROTROFI, NON MOBILI, AEROBI, MESOFILI E/O
PSICROTROFICI
- ❖ ALCUNI POSSONO TOLLERARE AMBIENTI CON BASSA
UMIDITA' (XEROFILI), CON ALTO CONTENUTO DI SALI O
ZUCCHERI (OSMOFILI) E CON BASSO pH (ACIDOFILI)

LIEVITI



- ❖ SETTORE ENOLOGICO
- ❖ SETTORE BIRRARIO
- ❖ SETTORE PANARIO

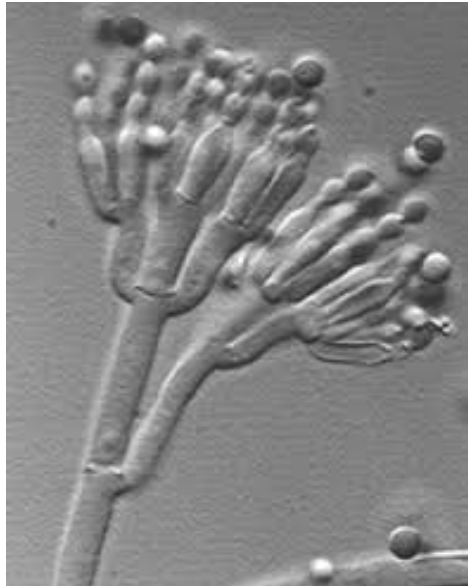
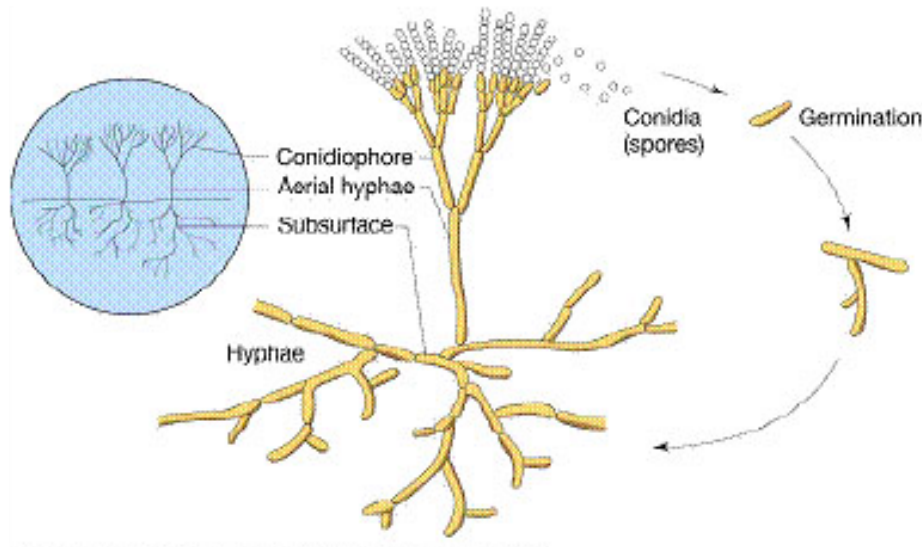


MICROBIOTA SECONDARIO IN MOLTE PRODUZIONI ALIMENTARI:

- **PRODOTTI LATTIERO-CASEARI**
- **PRODOTTI CARNEI**

Dal punto di vista metabolico il lievito produce molte sostanze biologicamente attive, quali amminoacidi e polisaccaridi

MUFFE



Funghi multicellulari
Struttura vegetativa
(micelio) costituita da
lunghi filamenti (ife)

Svolgono azioni sia positive
(maturazione di formaggi e
insaccati) che negative
negli alimenti (alterazione,
produzione micotossine)

ATTIVITA' METABOLICHE DI INTERESSE TECNOLOGICO

- ❖ LIPOLISI
- ❖ PROTEOLISI

Origine dei microrganismi negli alimenti

- Ogni alimento possiede un **microbiota** che è strettamente dipendente dalla natura delle materie prime, dall'ambiente in cui viene prodotto (coltivazione, allevamento) e dalle condizioni in cui viene trasformato, conservato e consumato.
- Le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche degli alimenti sono tali da permettere la colonizzazione e lo sviluppo di un gran numero di microrganismi, alcuni dei quali utili, altri indesiderati, sia patogeni che alterativi.

Origine dei microrganismi negli alimenti

- Inizialmente le materie prime possono essere colonizzate da microrganismi provenienti dall'aria, dall'acqua, dal suolo, dalla superficie di vegetali e animali (**contaminazione primaria**)
- Nel corso della trasformazione gli alimenti possono essere nuovamente colonizzati (**contaminazione secondaria**) da microrganismi derivanti dagli ambienti di lavorazione e conservazione, dalle superfici, da utensili e attrezzature, dal personale impegnato nelle attività produttive.

Tabella 2.8 Esempi di contaminazione primaria e secondaria.

Contaminazione primaria		Contaminazione secondaria	
Materie prime alimentari	Acqua, suolo, aria, pulviscolo, prodotto stesso	Materie prime dopo trasformazione	Processi tecnologici, derivanti dalla fabbrica (ambienti, superfici, acqua, materiali, personale)

Origine dei microrganismi negli alimenti

- Lo specifico **processo tecnologico** cui l'alimento viene sottoposto determinerà variazioni qualitative del microbiota presente naturalmente o aggiunto, come conseguenza delle modificazioni delle caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento stesso.
- Infine, l'alimento potrà subire contaminazioni e/o variazioni del contenuto microbico nelle **successive fasi** di stoccaggio, trasporto, distribuzione e di consumo.

Fattori predisponenti la concentrazione e il tipo di microrganismi

- Materia prima
- Qualità microbiologica prima del processo di trasformazione
- Condizioni igienico-sanitarie in cui l'alimento viene manipolato e processato
- Adeguatezza delle condizioni di confezionamento e conservazione del prodotto finito
- Aggiunta deliberata e appropriata di microrganismi selezionati (starter)

Per permettere la crescita di microrganismi l'alimento deve avere caratteristiche favorevoli alla loro presenza e moltiplicazione

Fattori determinanti:

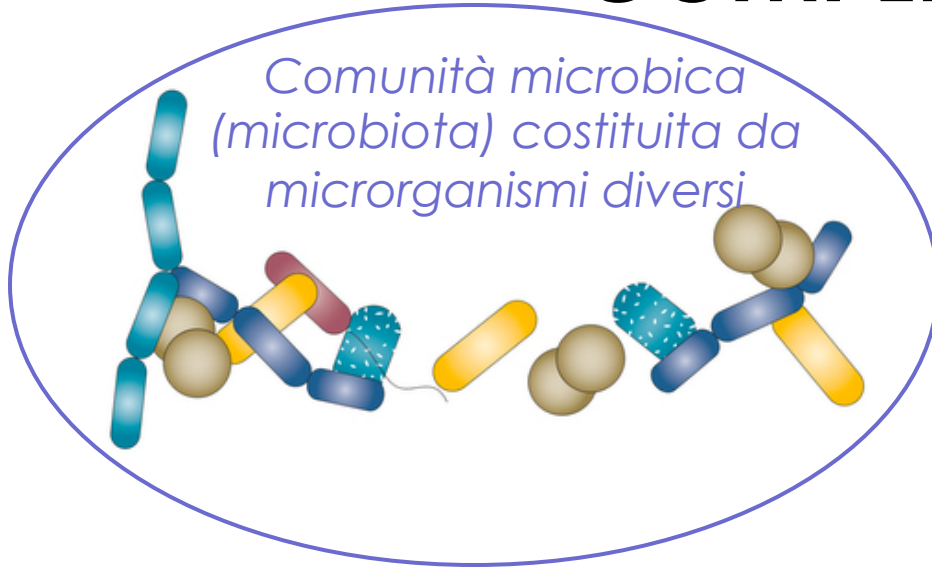
- **disponibilità di nutrienti** per la crescita
- **fattori fisici, chimici e biologici** che si succedono lungo la filiera di produzione

Fonti di contaminazione:

- **NATURALI**: superficie di prodotti vegetali; pelle/pelo, feci per prodotti di origine animale (es. latte)
- **ESTERNE**: aria, suolo, acqua, mangimi, uomo, macchinari

CONTAMINAZIONE: non necessariamente accezione negativa!

ALIMENTO COME ECOSISTEMA COMPLESSO



AMBIENTE ESTERNO

La colonizzazione di un alimento e il destino dei MO dipendono dalle **condizioni ecologiche** che si realizzano nell'alimento stesso

FATTORI INTRINSECI

FATTORI ESTRINSECI

FATTORI IMPLICITI

FATTORI CHE INFLUENZANO LA VITA DEI MICRORGANISMI IN UN ALIMENTO

FATTORI INTRINSECI: ESPRESSIONE DELLE CARATTERISTICHE FISICHE, CHIMICHE E BIOLOGICHE DELL'ALIMENTO

FATTORI ESTRINSECI: ESPRESSIONE DELL'AMBIENTE IN CUI SI TROVA L'ALIMENTO

FATTORI IMPLICITI: ESPRESSIONE DEI FENOMENI DI INTERAZIONE MICROBICA

Tabella 3.2 I fattori che influenzano crescita e sopravvivenza dei microrganismi.

Gruppo di fattori	Definizione	Esempi
Fattori intrinseci	Fattori caratteristici dell'alimento, derivanti dalla sua composizione o struttura	pH/acidità, attività dell'acqua, potenziale redox, disponibilità di nutrienti, presenza di agenti antimicrobici naturali, barriere fisiche
Fattori estrinseci	Fattori ambientali che agiscono durante la trasformazione o conservazione dell'alimento. Possono modificare i fattori intrinseci	temperatura di conservazione, trattamenti fisici (calore, irraggiamento, trattamenti con alte pressioni o correnti elettriche pulsate, essiccamento), modificazione dell'atmosfera di confezionamento, aggiunta di conservanti
Fattori impliciti	Fattori che derivano dall'interazione fra popolazioni microbiche durante la produzione o la conservazione	Interazioni positive (commensalismo, protocoooperazione, simbiosi), interazioni negative (competizione, amensalismo, predazione, parassitismo)

RUOLO DEI MO NEGLI ALIMENTI

GRADEVOLI: MO PRO-TECNOLOGICI, PROBIOTICI

SGRADEVOLI: MO CONTAMINANTI, DETERIORANTI

DANNOSI: MO PATOGENI

CONCETTI IMPORTANTI:

QUALITA' ALIMENTARE

SICUREZZA ALIMENTARE

I MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI

- ❖ Microrganismi tipici o pro-tecnologici
- ❖ Microrganismi alterativi o anti-tecnologici
- ❖ Microrganismi patogeni
- ❖ Microrganismi probiotici

QUALITA'

SICUREZZA

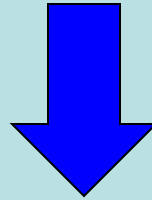


ATTIVITA' VIRTUOSE

FERMENTAZIONE

uno dei più antichi processi biotecnologici utilizzato per la conservazione degli alimenti

Demolizione carboidrati



Acidi, alcoli, CO₂

Composti antimicrobici, vitamine

Contrasto crescita patogeni

Aumento digeribilità

Incremento valore nutrizionale alimento

Influenza sul microbiota intestinale



OLIVO

Atena/Minerva



VITE

Dioniso/Bacco



GRANO

Demetra/Cerere



Nelle regioni Mediterranee in particolare, grazie al clima favorevole e alle specie colturali autoctone (cereali, uva e olivo) si sviluppò una gamma ampia e diversificata di prodotti fermentati, che ancor oggi caratterizzano il profilo alimentare Mediterraneo

La loro formazione dalle materie prime era attribuita a capacità divine



Tabella 2.2 Ruolo di diversi microrganismi in prodotti lattiero-caseari.

Alimenti	Specie	Attività principali
Formaggi e latti fermentati	<i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , subsp. <i>cremoris</i> , subsp. <i>lactis</i> bv. <i>diacetylactis</i> , <i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>	Abbassamento del pH; produzione di acidi organici (citrato, malato); fermentazione di zuccheri con produzione di acido lattico ed altri prodotti (eterofermentanti, acido acetico, etanolo, acetaldeide, anidride carbonica); produzione di composti aromatici; influenza sulla tessitura; produzione di sostanze inibitrici, batteriocine, che inibiscono patogeni e agenti di deterioramento
Formaggi	<i>Brevibacterium linens</i>	Proteolisi, lipolisi, pigmentazione
Latti fermentati	<i>Bifidobacterium</i> spp.	Attività probiotica
Emmental, Gruyere ecc.	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> (ex. <i>shermanii</i>), <i>P. acidipropionici</i>	Produzione acido propionico (aroma); produzione di anidride carbonica, acido propionico ed acido acetico da zuccheri e acido lattico
Formaggi a maturazione superficiale	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Influenza su sapore e aroma
Gorgonzola, Stilton, Blue, Roquefort ecc.	<i>Penicillium roqueforti</i>	Proteolisi, lipolisi, aspetto
Camembert, Brie ecc.	<i>Penicillium camemberti</i>	Proteolisi, aspetto
Bevande fermentate lattiche	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Produzione di etanolo e anidride carbonica

Tabella 2.3 Ruolo di diversi microrganismi in prodotti derivati da cereali.

Alimenti	Specie	Attività principali
Pane, prodotti da forno	<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i>	Abbassamento del pH; produzione di acidi organici (citrato, malato); fermentazione di zuccheri con produzione di acido lattico ed altri prodotti; produzione di composti aromatici; influenza sulla tessitura; produzione di sostanze inibitrici, che inibiscono patogeni e agenti di deterioramento
Pane e prodotti lievitati da forno	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>Hanseniaspora (Kloeckera)</i> spp.	Produzione di etanolo e di anidride carbonica, produzione di composti aromatici, influenza sulla qualità salutistica
Birra	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>Hanseniaspora (Kloeckera)</i> spp.	Produzione di etanolo e di anidride carbonica, produzione di composti aromatici, influenza sulla qualità salutistica
Ang-kak (riso rosso)	<i>Monascus purpureus</i>	Produzione di pigmenti, fermentazione

Tabella 2.4 Ruolo di diversi microrganismi in prodotti derivati da frutta e vegetali.

Alimenti	Specie	Attività principali
Vegetali fermentati (crauti, cetrioli, olive)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Abbassamento del pH; produzione di acidi organici (citrato, malato); fermentazione degli zuccheri con produzione di acido lattico ed altri prodotti (eterofermentanti, acido acetico, etanolo, acetaldeide, anidride carbonica); produzione di composti aromatici; influenza sulla tessitura; produzione di sostanze inibitrici, batteriocine, che inibiscono patogeni e agenti di deterioramento
Vino	<i>Oenococcus oeni</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>	Produzione di etanolo e di anidride carbonica, produzione di composti aromatici, influenza sulla qualità salutistica
Vino	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>S. bayanus</i> , <i>Hanseniaspora (Kloeckera) spp.</i>	Produzione di etanolo e di anidride carbonica, produzione di composti aromatici, influenza sulla qualità salutistica
Aceto	<i>Acetobacter aceti</i> , <i>A. pasteurianus</i> , <i>Gluconobacter oxydans</i>	Produzione di acido acetico e sostanze aromatiche
Salsa e pasta di soia	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. soyae</i>	Produzione di proteasi e amilasi
Tempeh	<i>Rhizopus oligosporus</i>	Proteolisi, lipolisi, idrolisi di polisaccaridi, influenza l'aspetto

Tabella 2.5 Ruolo di diversi microrganismi in prodotti carnei.

Alimenti	Specie	Attività principali
Carni fermentate (salami)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	Abbassamento del pH; produzione di acidi organici (citrato, malato); fermentazione di zuccheri con produzione di acido lattico ed altri prodotti; produzione di composti aromatici; influenza sulla tessitura; produzione di sostanze inibitrici che inibiscono patogeni e agenti di deterioramento
Insaccati	<i>Staphylococcus carnosum</i> , <i>S. xylosus</i>	Riduzione dei nitrati (stabilizzazione del colore), aroma, proteolisi, lipolisi
Insaccati	<i>Streptomyces griseus</i>	Proteolisi, aspetto
Salami	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Influenza su sapore e aroma
Insaccati	<i>Penicillium camemberti</i>	Protezione della superficie, aroma

**GRUPPI MICROBICI DI INTERESSE
NELLA MICROBIOLOGIA DEGLI
ALIMENTI**

MICROORGANISMI PRO-TECNOLOGICI

- ❖ **Batteri lattici**
- ❖ Batteri propionici
- ❖ Batteri acetici
- ❖ Micro-Stafilococchi
- ❖ Lieviti
- ❖ Muffe

BATTERI LATTICI (LAB=Lactic Acid Bacteria)

Gram-positivi asporigeni, catalasi-negativi, anaerobi ossigeno-tolleranti, in grado di fermentare zuccheri con **produzione di acido lattico**

Comprendono diversi generi, morfologia bacillare o coccica

Lactobacillus (non patogeni)

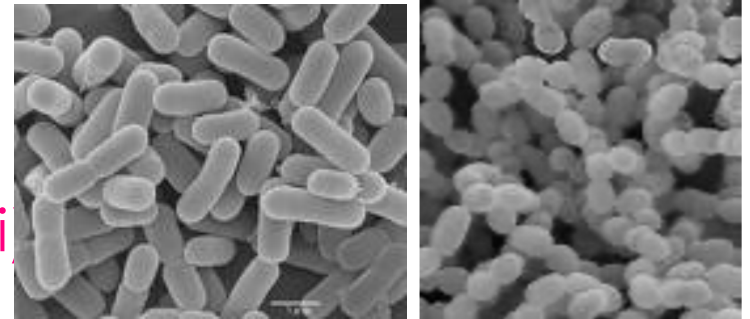
Streptococcus (patogeni opportunisti)

Lactococcus (non patogeni)

Enterococcus (patogeni opportunisti)

Leuconostoc

Pediococcus



Non hanno citocromi e una catena di trasporto degli elettroni, traendo energia unicamente dalla fosforilazione a livello del substrato nel corso della fermentazione degli zuccheri

Hanno esigenze nutrizionali complesse richiedendo per il loro sviluppo aminoacidi, purine, pirimidine e vitamine

BATTERI LATTICI (LAB=Lactic Acid Bacteria)

Importanti nelle **fermentazioni alimentari**: abbassamento pH e produzione di batteriocine limita lo sviluppo di specie patogene o alterative

Alcune specie sono normalmente presenti nel tratto gastro-intestinale umano (**microbiota intestinale**)

Alcune specie mostrano **caratteristiche probiotiche**

I LAB sono diffusi nella maggior parte dei prodotti fermentati:

- Caseari (specialmente da latte crudo)
- Carnei (insaccati fermentati)
- Vino e Sidro
- Altri (pesce, vegetali)

Le funzioni più importanti nelle fermentazioni alimentari sono svolte da **geni batterici coinvolti nel metabolismo degli zuccheri, dei lipidi e nei sistemi proteolitici**. In particolare, la **fermentazione** caratterizza le fasi iniziali delle trasformazioni, mentre **proteolisi e lipolisi** giocano un ruolo fondamentale nella maturazione dei prodotti, soprattutto nel determinarne la consistenza e l'aroma.

Carboidrati fermentabili

I LAB sono in grado di utilizzare diversi tipi di zuccheri, in relazione alla presenza e alla regolazione di geni metabolici che possono essere differenti tra le diverse specie e ceppi

MONOSACCARIDI

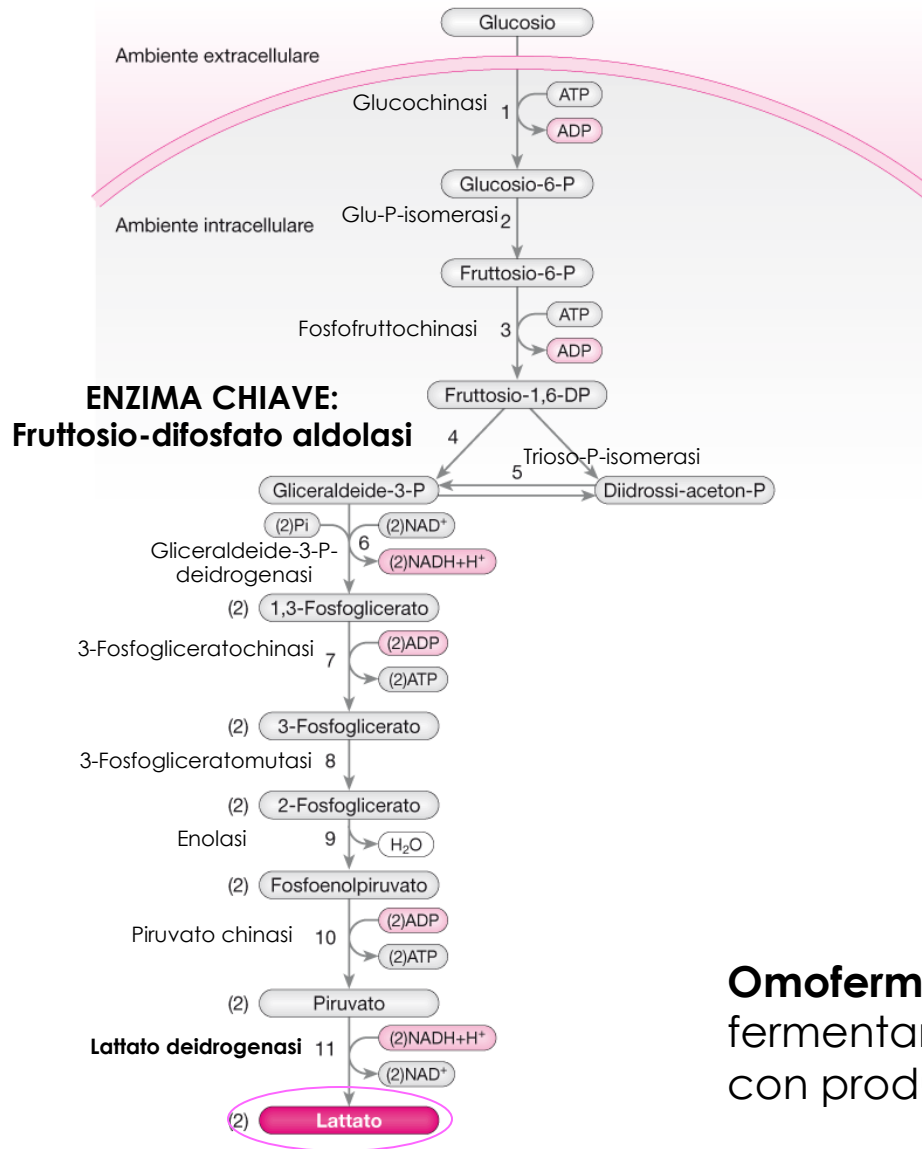
ESOSI: Glucosio, Galattosio, Fruttosio, Mannosio, ecc.

PENTOSI: Arabinosio, Ribosio, Xilosio, Ramnosio

DISACCARIDI

Lattosio, Saccarosio, Trealosio, ecc.

FERMENTAZIONE OMOLATTICA



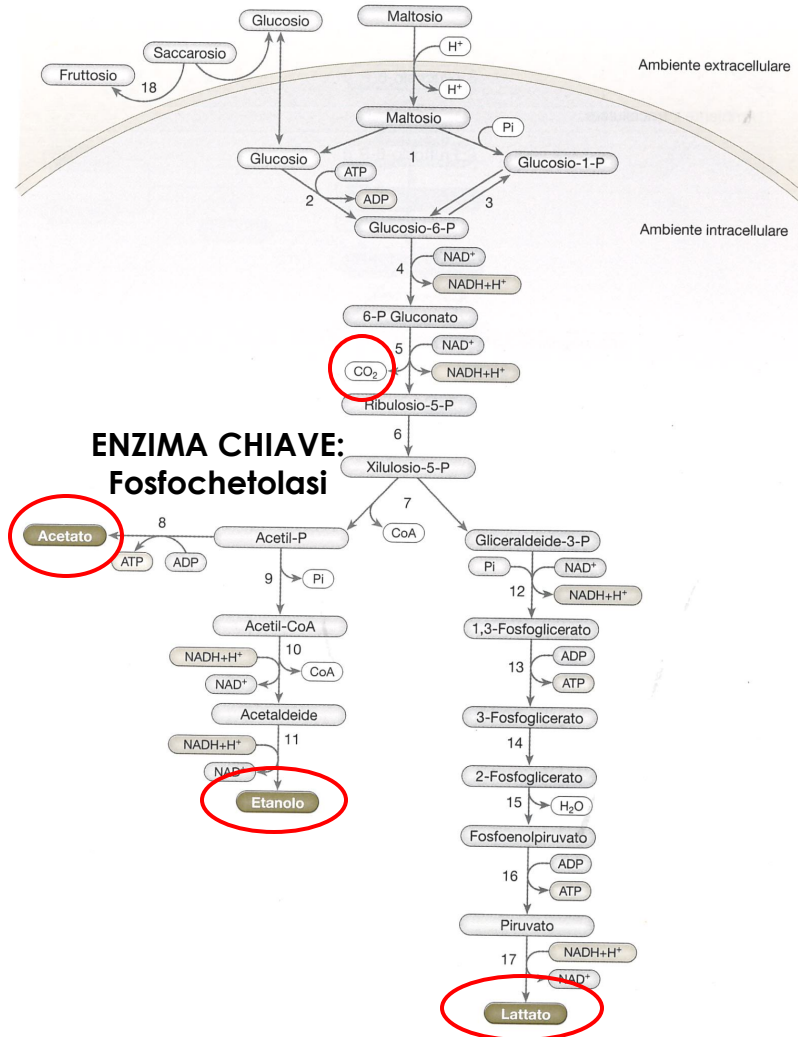
Omofermentanti obbligati:
fermentano solo gli esosi, via EMPG,
con produzione di acido lattico

FERMENTAZIONE ETEROLATTICA

Figura 16.7 La fermentazione eterolattica (via 6-PG/PK, 6-fosfogluconato/fosfochetolasi) condotta dai lattobacilli eterofermentanti obbligati e, solo in presenza di pentosi, dai lattobacilli eterofermentanti facoltativi. In figura è anche riportato l'esempio del catabolismo del maltosio (un disaccaride) in *Lactobacillus sanfranciscensis*: una parte del glucosio liberato in seguito ad idrolisi del maltosio entra nella via 6-PG/PK dopo fosforilazione.

1, maltosio fosforilasi; 2, esochinasi; 3, fosfo-glucomutasi; 4, glucosio-6-fosfato deidrogenasi; 5, 6-fosfogluconato decarbossilasi; 6, epimerasi; 7, fosfochetolasi; 8, acetato chinasi; 9, fosfo-transacetilasi; 10, acetaldeide deidrogenasi; 11, alcol deidrogenasi; 12, gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi; 13, 3-fosfoglicerato chinasi; 14, fosfoglicerato mutasi; 15, enolasi; 16, piruvato chinasi; 17, lattato deidrogenasi; 18, fruttosil-trasferasi.

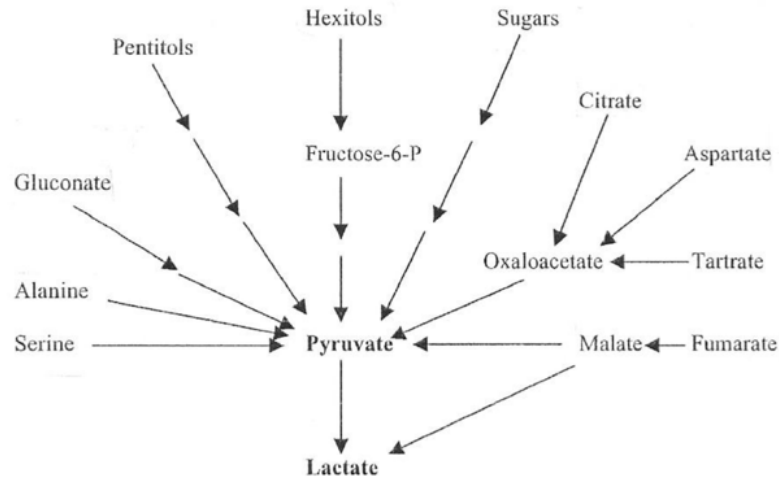
(da Gobbetti, M., *Fisiologia e biochimica dei batteri lattici*, cap 8, pp. 153-170, in M. Gobbetti e A. Corsetti, cit.).



Eterofermentanti obbligati: fermentano esosi e pentosi (via PK) con produzione di ac. lattico, etanolo/ac. acetico e CO₂ (assente in presenza di pentosi) in quantità equimolari

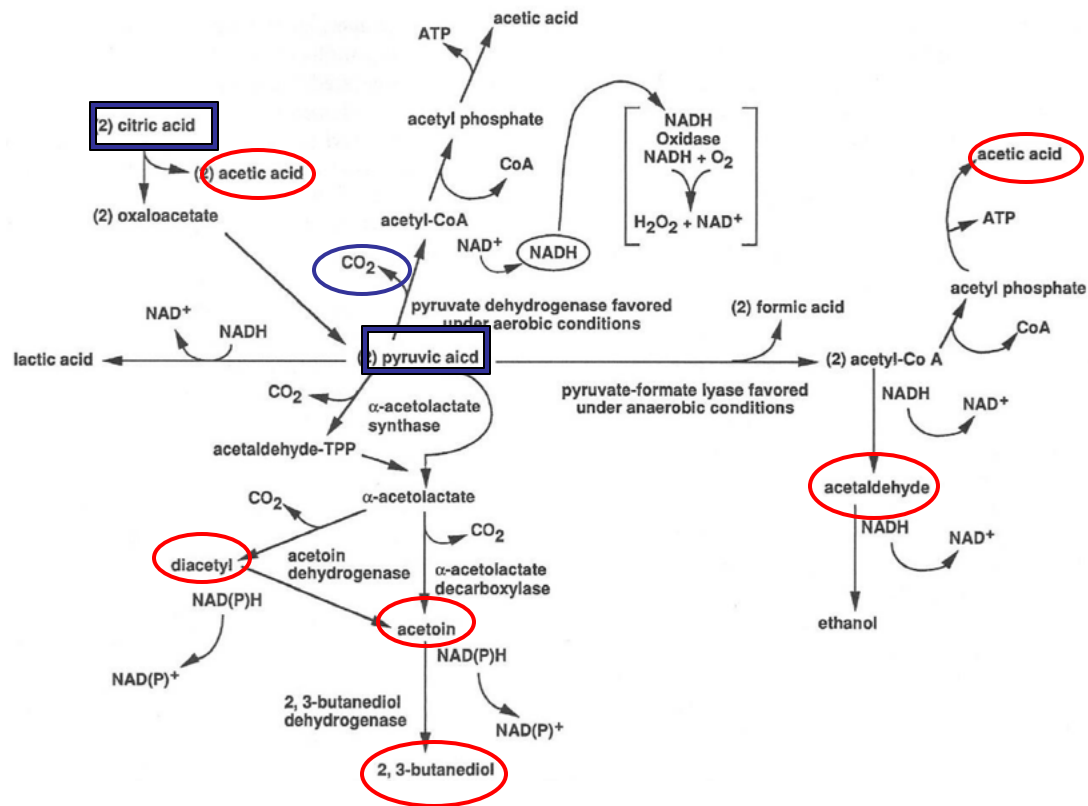
Eterofermentanti facoltativi: fermentano esosi (via EMP) e pentosi (via PK) con produzione di ac. lattico, acetico e CO₂

Alcuni LAB sono comunque in grado di utilizzare altre fonti di carbonio, come polioli, acidi organici e aminoacidi, usando vie metaboliche alternative, sia specie- che ceppo-specifiche



Potenziali substrati fermentabili dai LAB per la formazione del piruvato e del lattato. Da Liu, (2003)

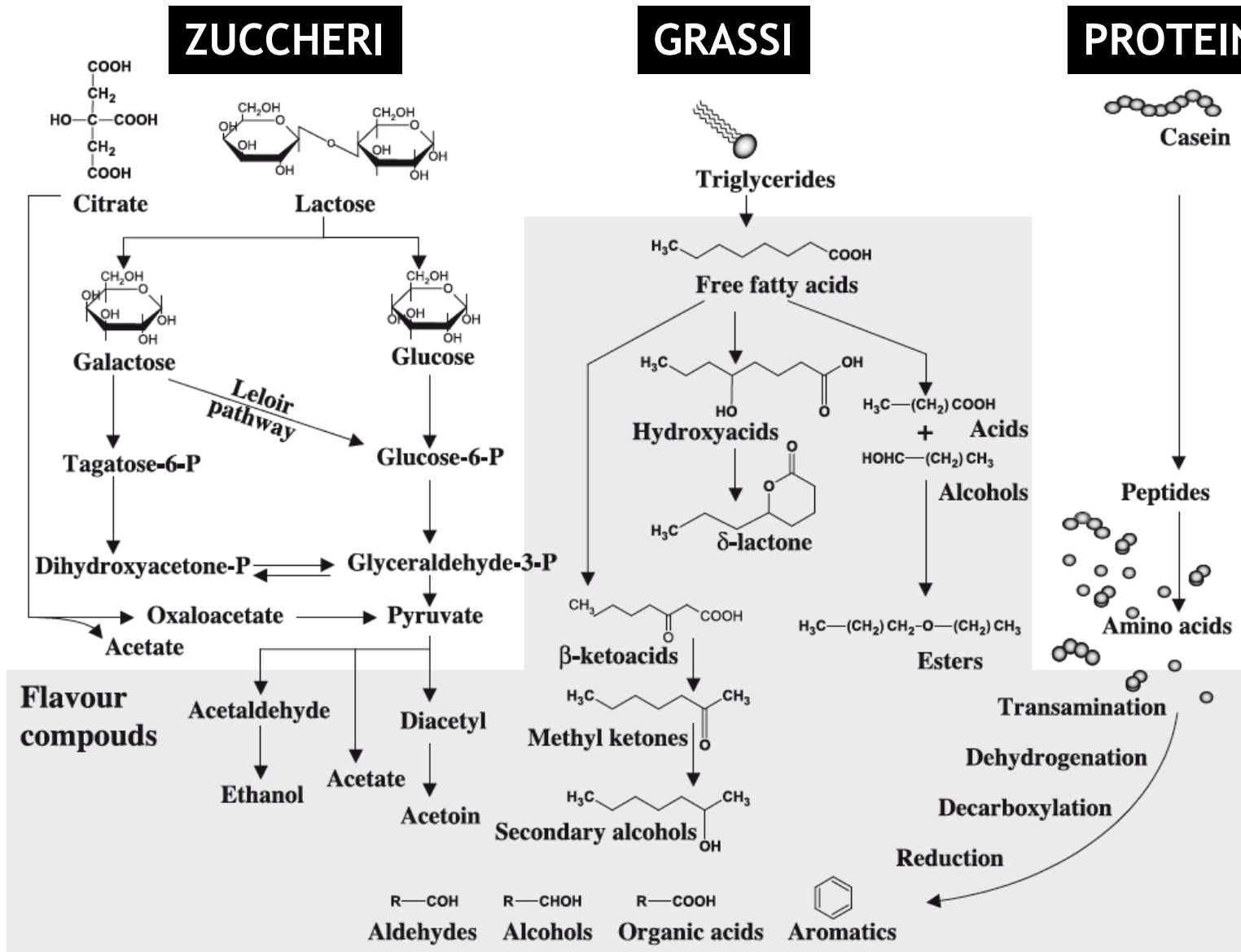
METABOLISMO DEL PIRUVATO E DEL CITRATO



Importante per lo sviluppo di molecole responsabili di aromi

Lactococcus lactis-Cit+
Leuconostoc

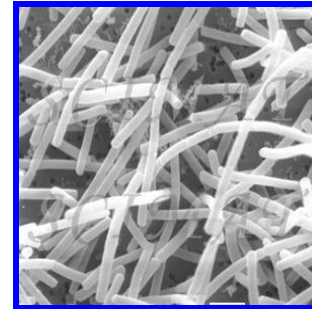
PATHWAYS BIOCHIMICI CHE PORTANO ALLA PRODUZIONE DI COMPOSTI RESPONSABILI DEGLI AROMI



GENERI DI LAB CON MORFOLOGIA CELLULARE BASTONCELLARE

Lactobacillus

Carnobacterium (lattobacilli atipici)



GENERI DI LAB CON MORFOLOGIA CELLULARE COCCICA

Lactococcus

Enterococcus

Streptococcus

Leuconostoc

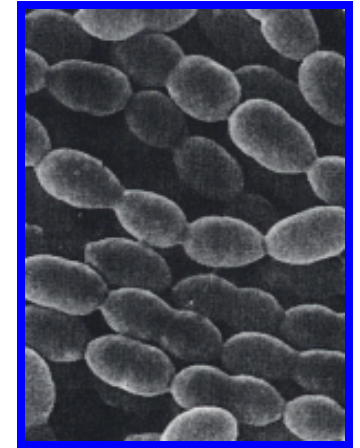
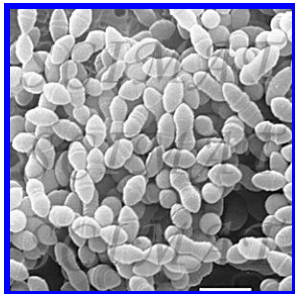
Weissella

Oenococcus

Pediococcus

Tetragenococcus (ex *Pediococcus halophilus*)

Vagococcus (ex streptococchi mobili)



Lactobacillus

Anaerobi facoltativi o microaerofili di forma bastoncellare, catalasi negativi.

In relazione al **metabolismo**, le specie di *Lactobacillus* possono essere divise in tre gruppi:

Omofermentanti obbligati (Gruppo I)

L. acidophilus, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. salivarius*

Eterofermentanti facoltativi (Gruppo II)

L. casei/paracasei, *L. curvatus*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*,
L. sakei

Eterofermentanti obbligati (Gruppo III)

L. brevis, *L. buchneri*, *L. fermentum*, *L. reuteri*

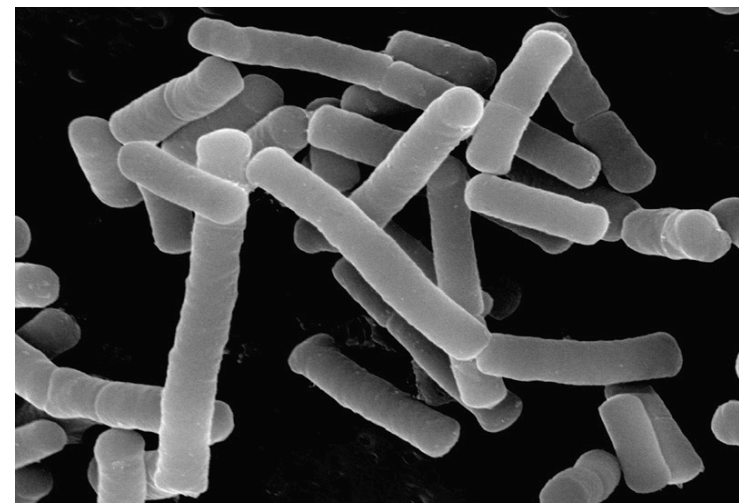
Caratteristiche

Presentano diverse e complesse esigenze nutrizionali (CHO, aa, peptidi, vitamine, ecc.)

Il principale prodotto della fermentazione è l'acido lattico

Crescono in una grande varietà di habitats, caratterizzati dalla presenza di alti livelli di CHO solubili, prodotti del catabolismo proteico, vitamine e bassa tensione di ossigeno.

Sono acido-tolleranti, e la produzione di elevati livelli di acido lattico abbassa il pH inibendo la crescita di altri batteri. Questa caratteristica li rende particolarmente adattabili e contribuisce alla loro capacità di colonizzare ambienti diversi e a tollerare condizioni spesso sfavorevoli



- ❖ **CAVO ORALE**
- ❖ **TRATTO GASTRO-INTESTINALE**
- ❖ **VAGINA UMANA**
- ❖ **SUOLO, ACQUE E LETAME**

Leuconostoc

Morfologia di cocci o ovoidale, catalasi negativi, arginina negativi, produzione di gas da glucosio, produzione di isomero D(-)-lattato. Ne esistono 10 specie, tra cui *Leuc. lactis* e *Leuc. mesenteroides*

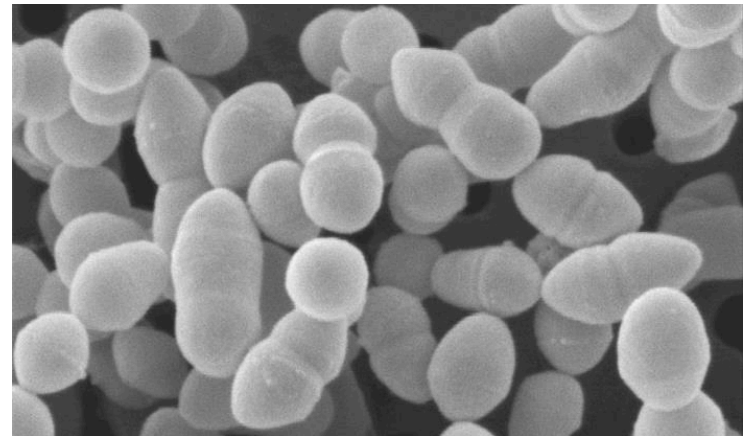
Caratteristiche

Eterofermentanti obbligati chemioorganotrofi (organismi che utilizzano energia proveniente da sostanze organiche)

Presentano diverse e complesse esigenze nutrizionali (CHO, aa, peptidi, vitamine, ecc.)

Condividono numerosi habitats naturali e artificiali (specialmente matrici alimentari) con altri LAB, in particolare lattobacilli, pediococchi e carnobatteri.

Presenti in diverse matrici alimentari (carnee, vegetali ma soprattutto casearie), in associazione con *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* e *Carnobacterium*. Nei prodotti caseari è responsabile della produzione di diacetile, che conferisce aroma di burro, e acetoino.



Lactococcus

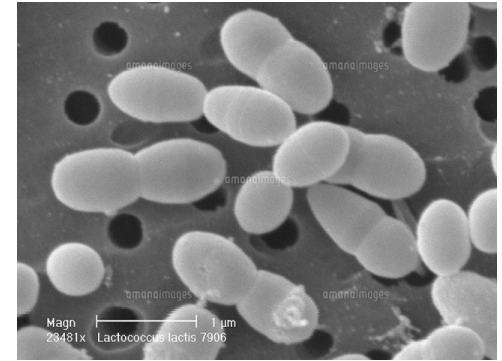
Omofermentanti, catalasi-negativi, morfologia di cocci non-mobili singoli, appaiati, o associati in “catenelle”.

Comprendono le specie *Lc. lactis*, *Lc. garviae*, *Lc. plantarum*, *Lc. piscium* and *Lc. raffinolactis*

I più comuni habitats sono rappresentati da matrici casearie. La specie *Lactococcus lactis* e le sue sottospecie sono ampiamente utilizzate nell'industria lattiero-casearia e sono riconosciute come GRAS (generally recognized as safe).

Impiegati in colture singole o miste per la produzione di diversi tipi di formaggi e latti fermentati

Lactococcus lactis biovar “*diacetylactis*” è responsabile della produzione di diacetile, a partire da citrato (presente nel latte in soluzione o nelle micelle di caseina sotto forma di complessi caseina-citrato-calcio-fosfato).



Type of product	Composition of starter culture
1. Cheese type without eye formation (Cheddar, Camembert, Tilsit)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95 to 98%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 2 to 5%
2. Cottage cheese, quarg, fermented milks, cheese types with few or small eyes (e.g., Edam)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 95%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%; or <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 85 to 90%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , 3%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 5%
3. Cultured butter, fermented milk, buttermilk, cheese types with round eyes (e.g., Gouda)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , 70 to 75%; <i>Lactococcus lactis</i> subsp. “ <i>diacetylactis</i> ,” 15 to 20%; <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , 2 to 5%
4. Taette (Scandinavian ropy milk)	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
5. Viili (Finnish ropy milk)	<i>Oidium lactis</i> (covers surface); <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> (ropy strain)
6. Casein	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
7. Kefir	Kefir grains containing lactose-fermenting yeasts (e.g., <i>Candida kefir</i>), <i>Lactobacillus kefir</i> , <i>Lactobacillus kefirianofaciens</i> , <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>

Streptococcus thermophilus

è l'unico streptococco di interesse alimentare



- ❖ E' un importante microrganismo starter nella tecnologia dello yogurt e di molti formaggi.
- ❖ Cresce a 45° C
- ❖ E' relativamente termoresistente

ESEMPIO: PRODOTTI LATTIERO-CASEARI



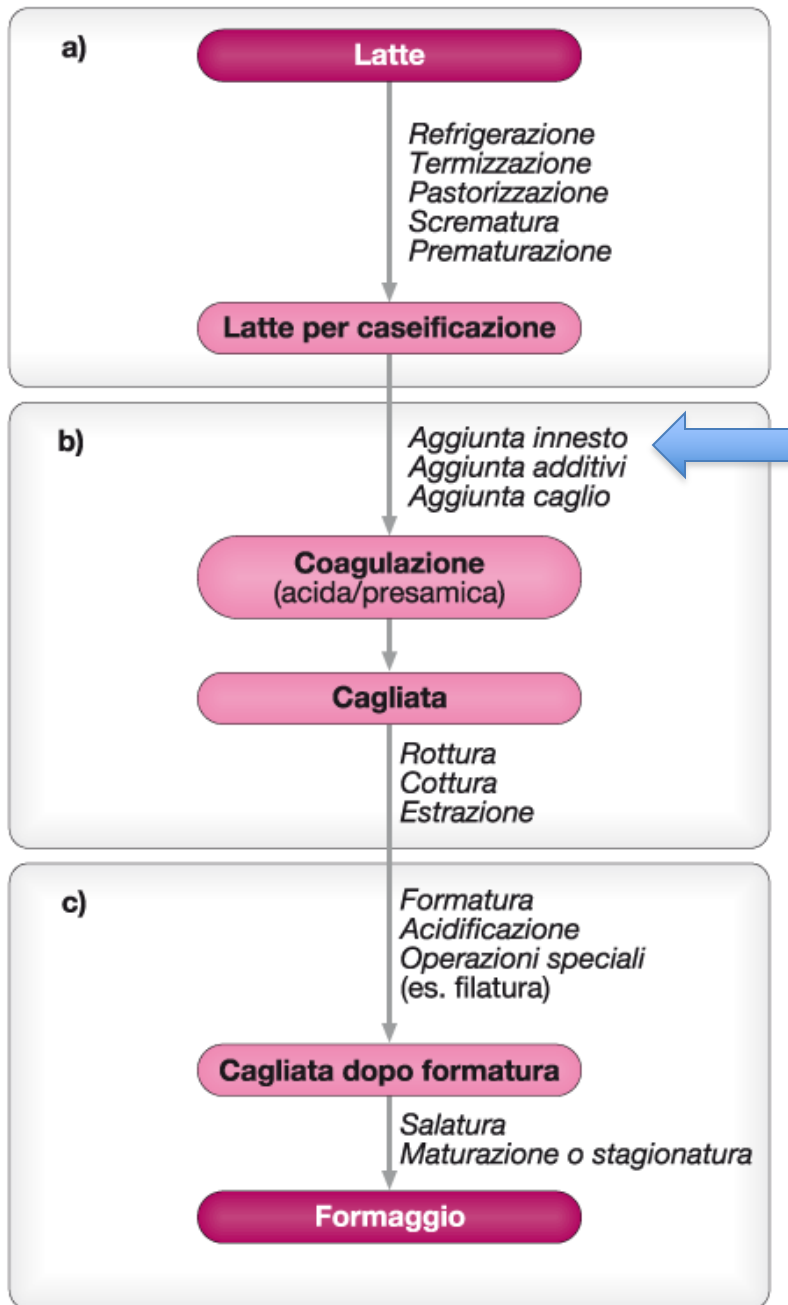
SUCCESSIONE MICROBICA DURANTE LA FERMENTAZIONE CASEARIA

Colture starter (SLAB) – rapida produzione di acido lattico e conseguente diminuzione del pH della matrice alimentare. Comprendono *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc spp.*, come specie mesofile (optimum di crescita tra 25° C e 30° C) e *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, come specie termofile (optimum di crescita tra 37° C e 42° C)

Colture non-starter (NSLAB) – svolgono un importante ruolo nella maturazione del prodotto, conferiscono particolari aromi e consistenza. Gruppo eterogeneo, rappresentato da *Lactobacillus* (*L. farciminis*, *L. casei*, *L. paracasei* e *L. plantarum*), *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*

LA COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA STARTER CARATTERIZZA IL FORMAGGIO

PROCESSI DI CASEIFICAZIONE



1° BLOCCO
avviene in vasca di coagulazione (caldaia) ed è costituito dalle fasi di lavorazione del latte che portano alla produzione della cagliata

2° BLOCCO
avviene fuori dalla caldaia ed è costituito da una serie di operazioni che trasformano la cagliata in formaggio

Innesto/Starter

L'innesto o starter ha il compito di avviare la fermentazione lattica e la conseguente acidificazione

Il microbiota dell'innesto si somma a quello residuo che è stato selezionato dalle fasi di lavorazione precedenti.

Il microbiota residuo sarà più numeroso e diverso quanto più blandi sono stati i trattamenti termici del latte.

la caseificazione a latte crudo e senza innesto è ormai limitata a piccolissime produzioni artigianali.

STARTER NATURALI

il latte o il siero provenienti dalla lavorazione precedente

Latto-innesti

Siero-innesti

STARTER SELEZIONATI

innesti diretti:

inoculo diretto in caldaia

innesti semi-diretti:

per propagazione progressiva

Liquidi

In polvere

Congelati

Innesto/Starter

L'innesto o starter ha il compito di avviare la fermentazione lattica e la conseguente acidificazione

Il microbiota dell'innesto si somma a quello residuo che è stato selezionato dalle fasi di lavorazione precedenti.

Il microbiota residuo sarà più numeroso e diverso quanto più blandi sono stati i trattamenti termici del latte.

la caseificazione a latte crudo e senza innesto è ormai limitata a piccolissime produzioni artigianali.

ECCELLENZA ITALIANA

STARTER NATURALI

il latte o il siero provenienti dalla lavorazione precedente

Latto-innesti

Siero-innesti

STARTER SELEZIONATI

innesti diretti:

inoculo diretto in caldaia

innesti semi-diretti:

per propagazione progressiva

Liquidi

In polvere

Congelati

Innesto/Starter

e.g.
Grana Padano
Parmigiano Reggiano
Mozzarella di bufala campana
Taleggio

40% della produzione casearia italiana

ECCELLENZA ITALIANA

STARTER NATURALI

il latte o il siero provenienti dalla lavorazione precedente

Latto-innesti

Siero-innesti

La complessità microbiologica (in termini di biodiversità) dello starter naturale garantisce la flessibilità nell'impiego tecnologico, intesa come capacità di adattamento e di resilienza della popolazione microbica dell'innesto a fattori anti-tecnologici esterni.

siero innesto

deriva dal siero della caseificazione del giorno prima, stabilisce un ciclo continuo, spesso ininterrotto da decenni. Dipende dal tipo di tecnologia impiegata.

latto innesto

prodotto per riscaldamento di un'aliquota di latte crudo. Esempio: riscaldamento a 60-65° C per 10-30 min e poi **incubazione a 40-45° C**. Ogni latto-innesto tradizionale ha la sua procedura di preparazione e il risultato finale è strettamente dipendente dalla tipologia (anche microbiologica) del latte crudo utilizzato.

PRODOTTI FERMENTATI

I prodotti fermentati tradizionali contengono una comunità microbica complessa di origine ambientale, potenzialmente capace di colonizzare in modo transiente il tratto gastro-intestinale



TIPICI (DOP e IGP)



- microbiota starter **naturale**
- pre-esistente nelle materie prime non pastorizzate



INDUSTRIALI



- colture starter **selezionate** (commerciali)
- aggiunte a materie prime pastorizzate

Certificazione DOP (Designazione di Origine Protetta)

Gli alimenti fermentati tipici dei Paesi Mediterranei spesso utilizzano specie batteriche ambientali pre-esistenti nelle materie prime (latte, carne, vegetali)

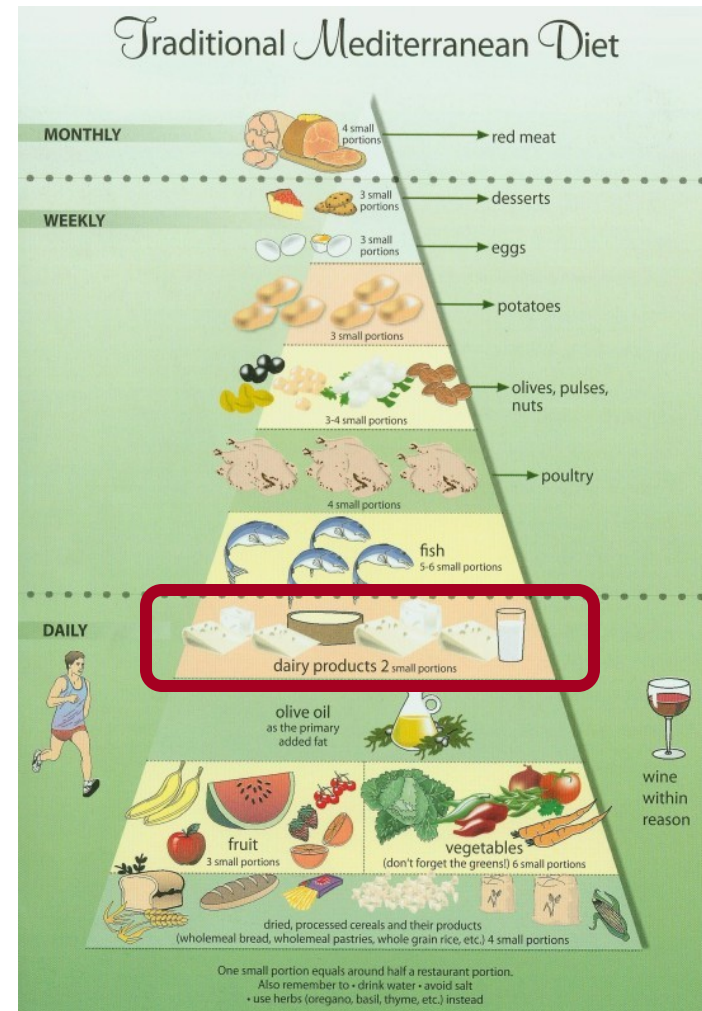
La composizione di questo microbiota ambientale riflette le specie più rappresentate in distretti geografici ristretti

I prodotti finali della fermentazione sono quindi caratterizzati da aromi e consistenze specifiche, ottenibili esclusivamente in aree geografiche definite (IGP: Indicazione Geografica Protetta)



I prodotti fermentati possono rappresentare un veicolo importante di batteri probiotici per l'organismo umano

Molti prodotti lattiero-caseari freschi come yogurt, latticini fermentati e latticini, sono caratteristici della dieta mediterranea e contengono un titolo elevato di batteri lattici.



ORIGINE DELLE COLTURE STARTER NATURALI NEI PRODOTTI CASEARI FERMENTATI TRADIZIONALI

Microbiota
gastrointestinale degli
animali



Ambiente/silaggio



Colonizzazione del
latte

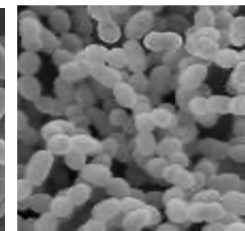


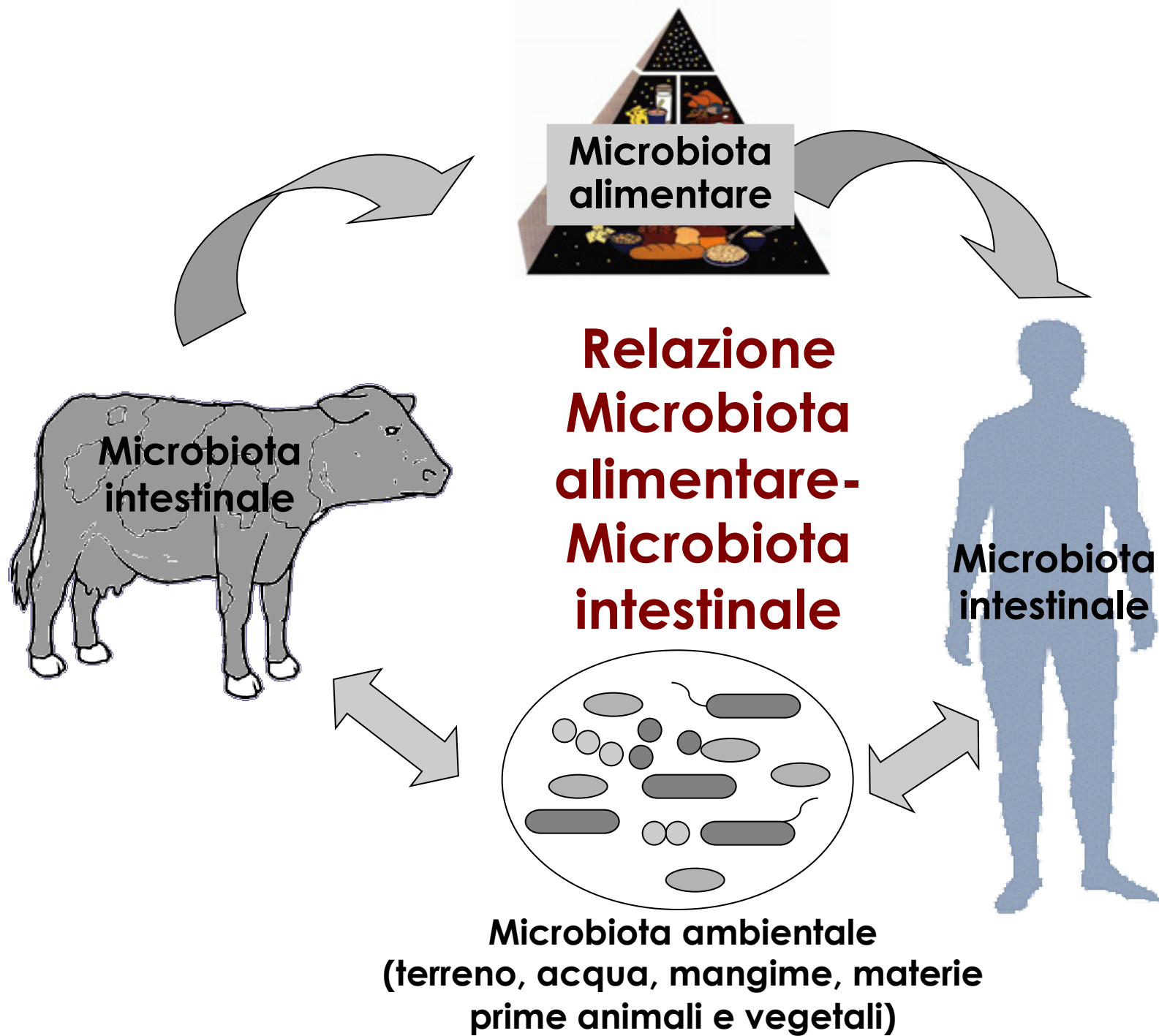
Culture starter (LAB)



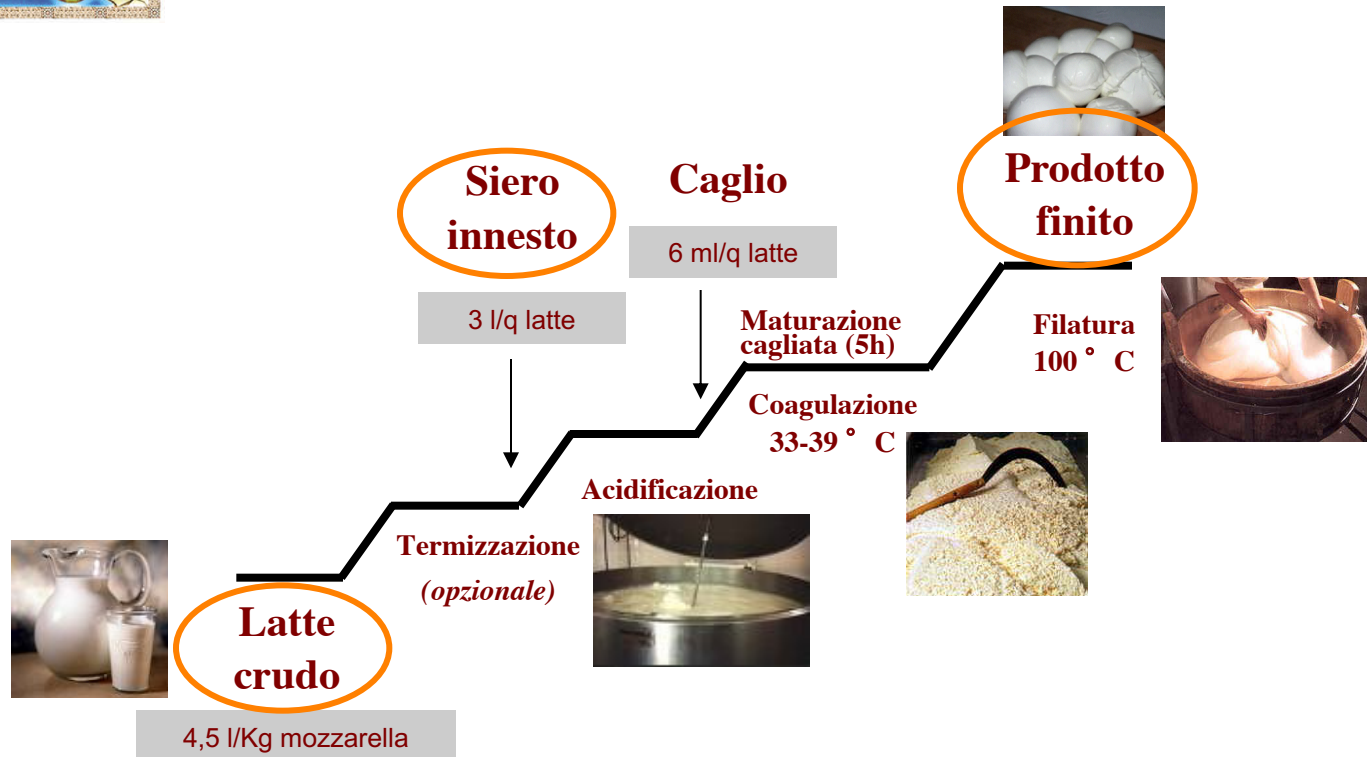
Fermentazione
lattica

Lactobacillus
Lactococcus *Leuconostoc* *Enterococcus*
Pediococcus *Streptococcus*





PROCESSO DI PRODUZIONE DELLA MOZZARELLA DI BUFALA CAMPANA



IMPATTO DEI MICRORGANISMI ALIMENTARI SULLA SALUTE

INTERAZIONE MICRORGANISMO-OSPITE

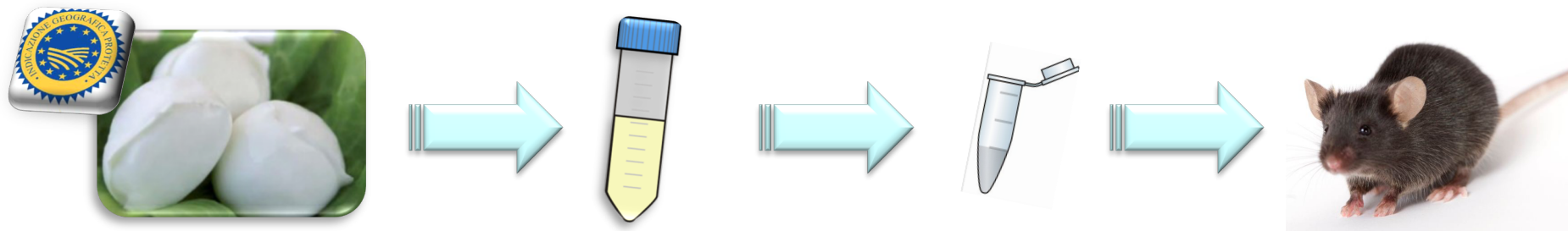
RESEARCH

Open Access



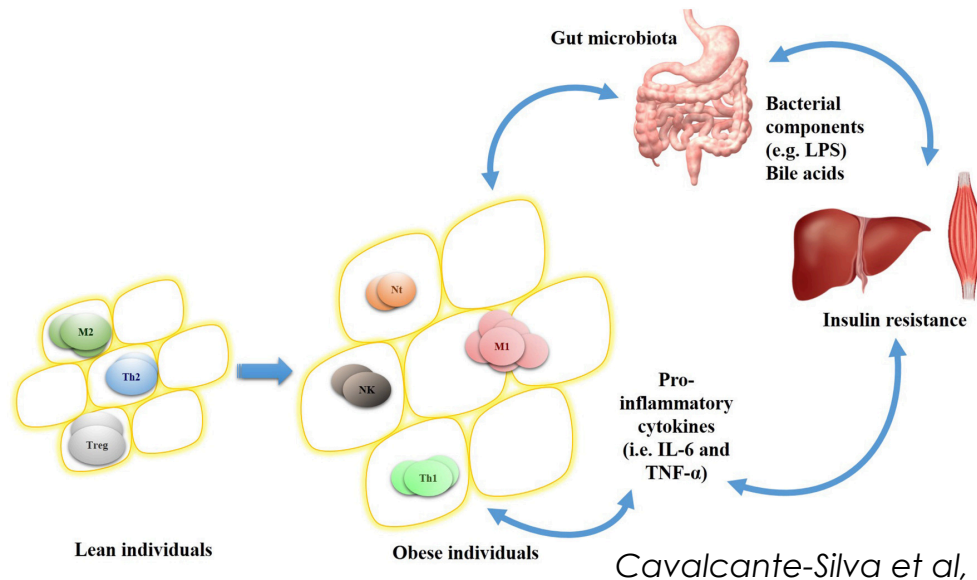
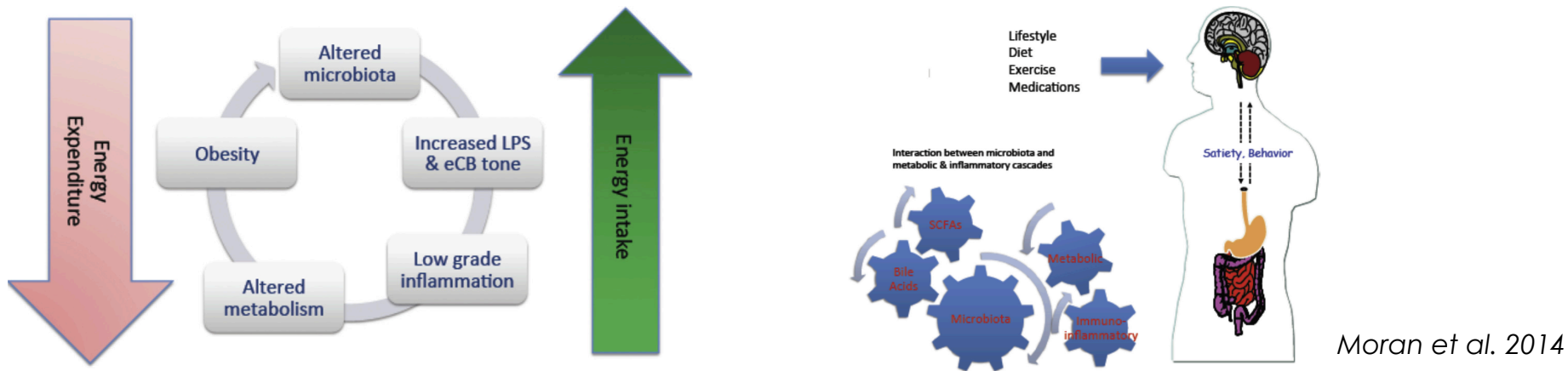
Impact of supplementation with a food-derived microbial community on obesity-associated inflammation and gut microbiota composition

Marianna Roselli, Chiara Devirgiliis*, Paola Zinno, Barbara Guantario, Alberto Finamore, Rita Rami and Giuditta Perozzi



Obesità

I meccanismi coinvolti nella patogenesi dell'obesità includono **alterazione del microbiota intestinale**, aumento della permeabilità intestinale e dei livelli di LPS che portano a uno **stato infiammatorio**

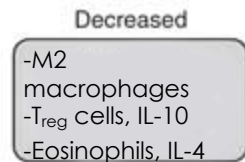
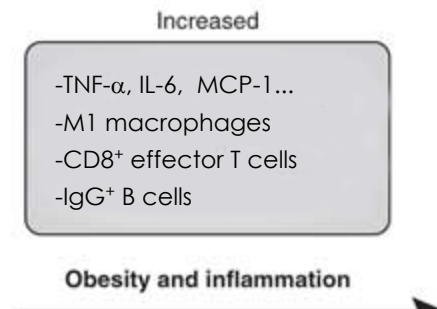
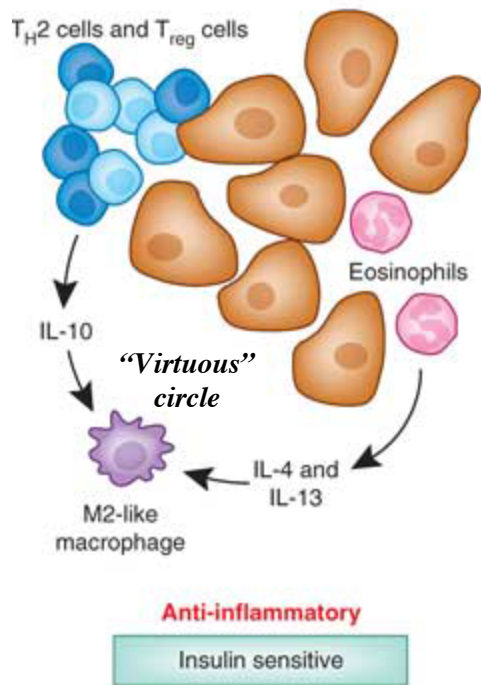


Negli individui magri gli adipociti sono infiltrati di cellule anti-infiammatorie e Th2, mentre negli obesi sono presenti adipociti ipertrofici associati a cellule pro-infiammatorie, NK e linfociti Th1, che promuovono il rilascio di citochine pro-infiammatorie.

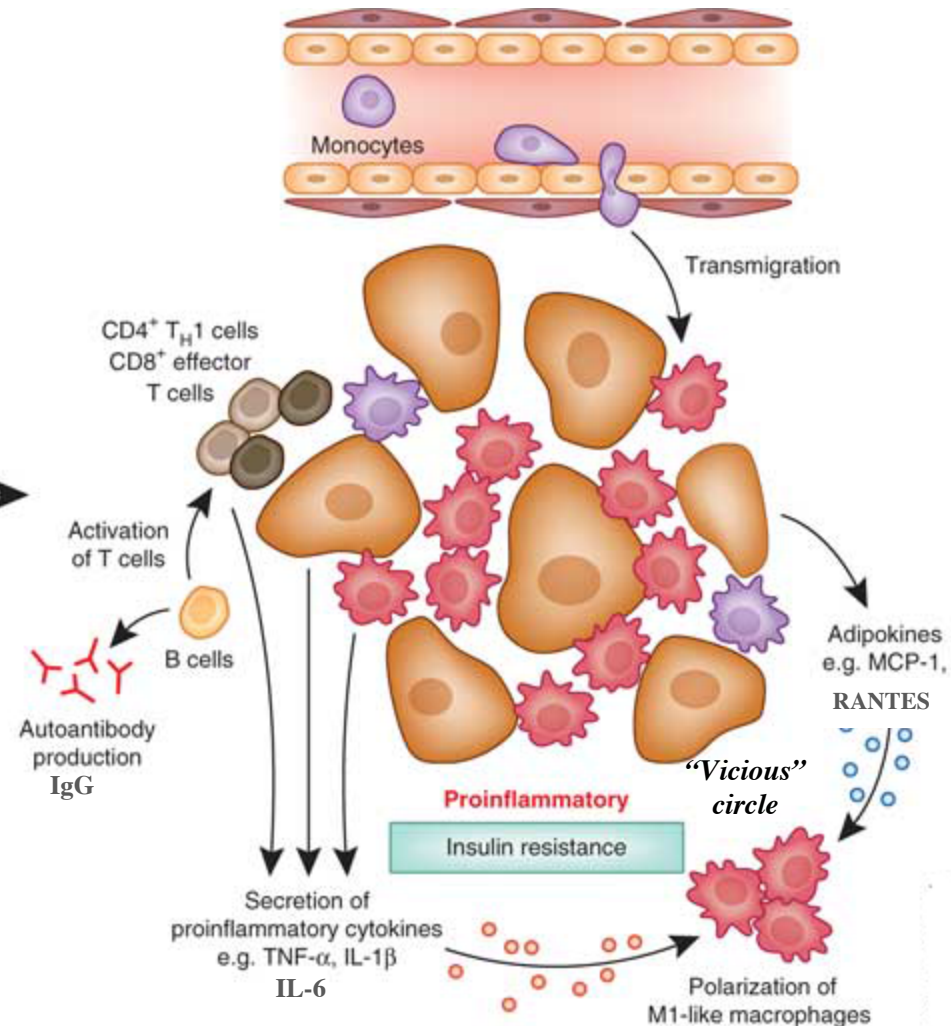


OBESITA' E INFIAMMAZIONE

"Lean" white adipose tissue (WAT)



"Obese" WAT





EVIDENZE CRESCENTI SUGGERISCONO CHE LA SUPPLEMENTAZIONE CON PROBIOTICI POSSA CONTRASTARE L'OBESITA'

In alternativa ai probiotici commerciali.....



I prodotti lattiero-caseari possono rappresentare una fonte di comunità microbiche complesse (in particolare LAB)

Table 1. Diverse Fermented Foods Provide Ample Opportunities to Study Microbial Communities

Type of Food	Fermented Product	Main Ingredients	Major Microbial Groups	Opportunities to Study	References
Fruit	wine	pressed grapes	Y (natural styles: LAB)	biogeography, population biology due to wide geographical distribution	Bokulich et al. (2014a); Knight and Goddard (2015)
	chocolate	cacao pods	FF, Y, LAB, AAB, OBG	community interactions and dynamics due to successional development and broad phylogenetic diversity	Meersman et al. (2013)
	coffee	coffee cherries	FF, Y, OBG	community interactions and dynamics due to successional development and broad phylogenetic diversity	Vieira et al. (2010)
Dairy	yogurt	milk	LAB	co-evolution and adaptation due to serial transfer over long time periods	Sieuwerts et al. (2008)
	cheese	milk, salt	FF, Y, LAB, AAB, OBG	biogeography, community interactions and dynamics, and abiotic selection due to wide geographical distribution, broad phylogenetic diversity, and strong abiotic filters	Wolfe et al. (2014); Montel et al. (2014)
	kefir	milk	Y, LAB, AAB, OBG	co-evolution, adaptation, and biofilm formation due to self-replicating, highly organized biofilm and serial transfer over long time periods	Marsh et al. (2013)
Grains	beer	barley, hops, water	Y (lambic styles: AAB, LAB, OBG)	adaptation, community interactions and dynamics in lambic styles: accumulation of species in facility, successional development	Bokulich et al. (2012)
	sake, soy sauce, miso	rice, water (soy beans added for soy sauce and miso)	FF, Y, LAB, AAB, OBG	community interactions and dynamics due to successional development, adaptation due to domestication of <i>Aspergillus oryzae</i>	Bokulich et al. (2014b); Gibbons et al. (2012)
	sourdough	wheat flour, water	Y, LAB	biogeography, co-evolution, adaptation due to wide geographical distribution and serial transfer over long time periods	Minervini et al. (2014)
Meat	salami	ground meat, salt	FF, Y, LAB, OBG	community interactions and dynamics due to broad phylogenetic diversity	Coccolin et al. (2011)
Plants	kimchi	cabbage, spices, salt	Y, LAB	community interactions and dynamics, abiotic selection due to successional development and strong abiotic filters	Jung et al. (2011)
	sauerkraut	cabbage, salt	LAB	community interactions and dynamics, abiotic selection due to successional development, abiotic filters	Pengvidhya et al. (2007)
	kombucha	tea, sugar	Y, LAB, AAB, OBG	co-evolution, adaptation, biofilm formation due to self-replicating, highly organized biofilm and serial transfer over long time periods	Marsh et al. (2014)

Key: FF = filamentous fungi; Y = yeast; LAB = lactic acid bacteria; AAB = acetic acid bacteria; OBG = other bacterial groups

Wolfe&Dutton 2015

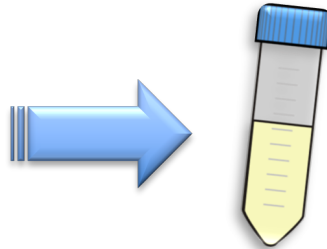
SCOPO DELLO STUDIO

Valutare l'impatto della supplementazione con un consorzio batterico di origine casearia sullo stato di infiammazione e sulla composizione del microbiota intestinale di topi obesi

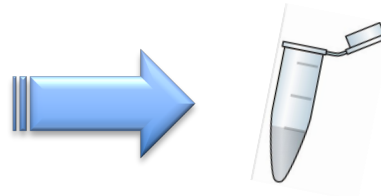
MOZZARELLA di BUFALA CAMPANA (MBC) COME FONTE DI ISOLAMENTO DEL MICROBIOTA ALIMENTARE



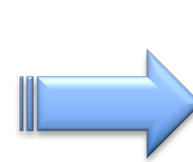
Homogenization of MBC samples in Na-Citrate



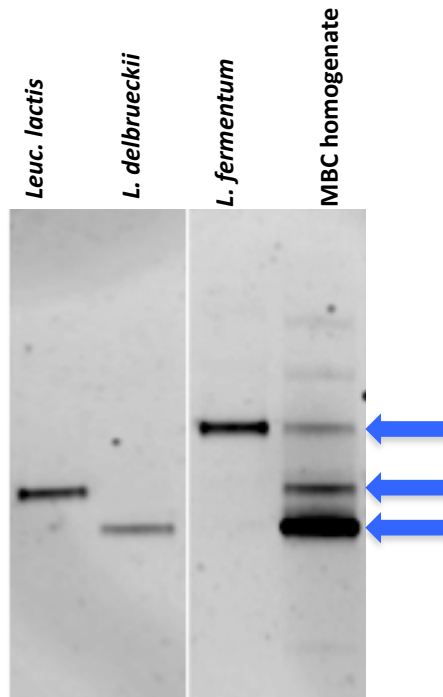
Homogenates inoculated in MRS and anaerobically grown at 37 ° C to OD₆₀₀ = 3



Glycerol stocks of daily doses (1x10⁹ CFU)






Daily administration to mice



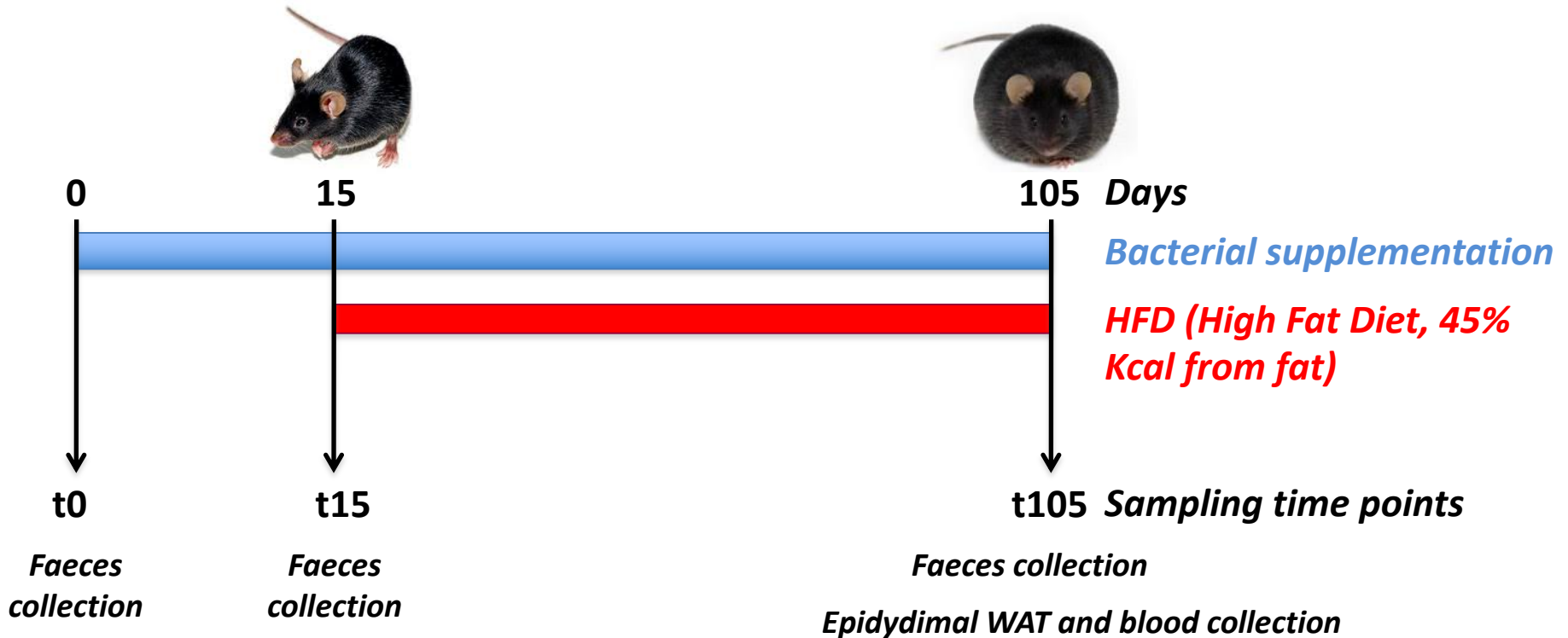
L'analisi DGGE del microbiota della MBC mostra la presenza di 3 specie dominanti: *Lactobacillus fermentum*, *L. delbrueckii* e *Leuconostoc lactis*

DISEGNO SPERIMENTALE

-  *MBC microbiota (1x10⁹ CFU/day)*
-  *LGG (1x10⁹ CFU/day)*
-  *PBS (CTRL)*



C57BL/6J mice
6 weeks-old



LA SUPPLEMENTAZIONE CON MBC RIDUCE LA QUANTITA' DI WAT EPIDIDIMALE E MIGLIORA IL PROFILO LIPIDICO DEL SIERO

Body weight, epididymal WAT weight, food and energy intake from HFD of MBC, LGG or CTRL mice.

	MBC	LGG	CTRL
Body weight (g)			
<i>Initial</i>	19.19 ± 1.44	19.41 ± 1.79	18.80 ± 0.89
<i>Final</i>	31.75 ± 1.97	31.88 ± 2.13	30.63 ± 3.35
<i>Gain</i>	11.61 ± 1.94	12.47 ± 2.55	12.36 ± 2.63
WAT weight (g)	1.35*[#] ± 0.31	1.78 ± 0.30	1.89 ± 0.49
Food intake (g/day)	2.40 ± 0.66	2.54 ± 0.62	2.48 ± 0.63
Energy intake from HFD (Kcal/day)	10.80 ± 0.60	11.39 ± 0.69	11.26 ± 1.05

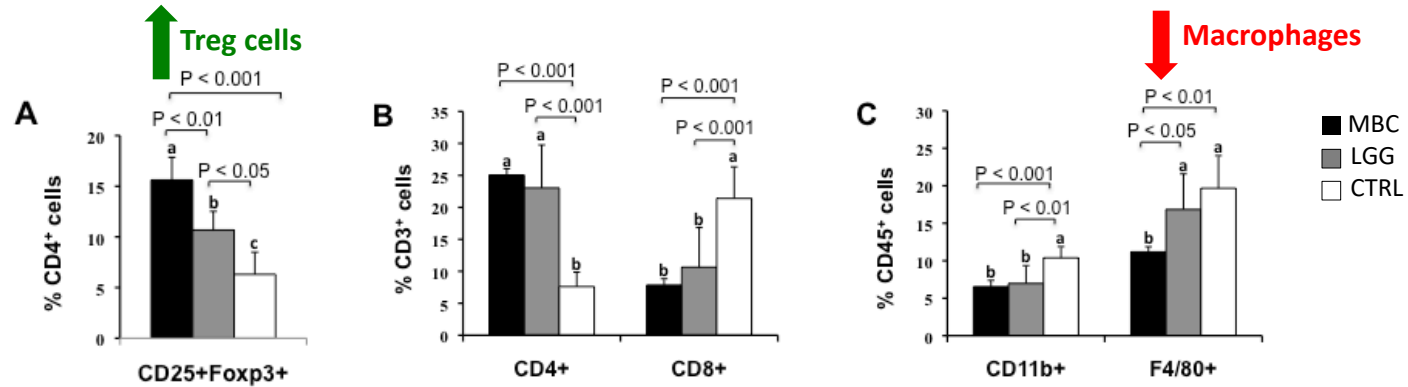
*P < 0.05 versus CTRL); [#]P < 0.01 versus CTRL and LGG (ANCOVA)

Serum metabolic measurements in MBC, LGG or CTRL mice.

	MBC	LGG	CTRL
Glucose (mg/dl)	107.42 ± 47.74	72.97 ± 7.64	86.91 ± 11.43
Insulin (μIU/ml)	3.37 ± 0.94	34.87 ± 24.79	7.88 ± 0.008
Triglycerides (mg/dl)	147.12* ± 65.91	163.21[#] ± 69.23	316.98 ± 142.39
HDL-cholesterol (mg/dl)	155.91** ± 16.13	137.29* ± 25.21	108.86 ± 12.91
LDL-cholesterol (mg/dl)	92.75[#] ± 19.06	105.77 ± 48.03	132.83 ± 15.09
Adiponectin (μg/ml)	16.25 ± 3.39	17.46 ± 4.87	19.23 ± 5.53
Leptin (pg/ml)	213.54 ± 187.18	108.86 ± 47.30	74.69 ± 30.92

*P < 0.05 versus CTRL; **P < 0.001 versus CTRL; [#]P = 0.05 versus CTRL

LA SUPPLEMENTAZIONE CON MBC HA UN EFFETTO ANTI-INFIAMMATORIO NEL WAT EPIDIDIMALE



Roselli et al., 2017

LA COMPOSIZIONE DEL MICROBIOTA FECALE E' INFLUENZATA DALLA HFD MENTRE LA SUPPLEMENTAZIONE BATTERICA NON MODIFICA LA BIODIVERSITA' COMPLESSIVA

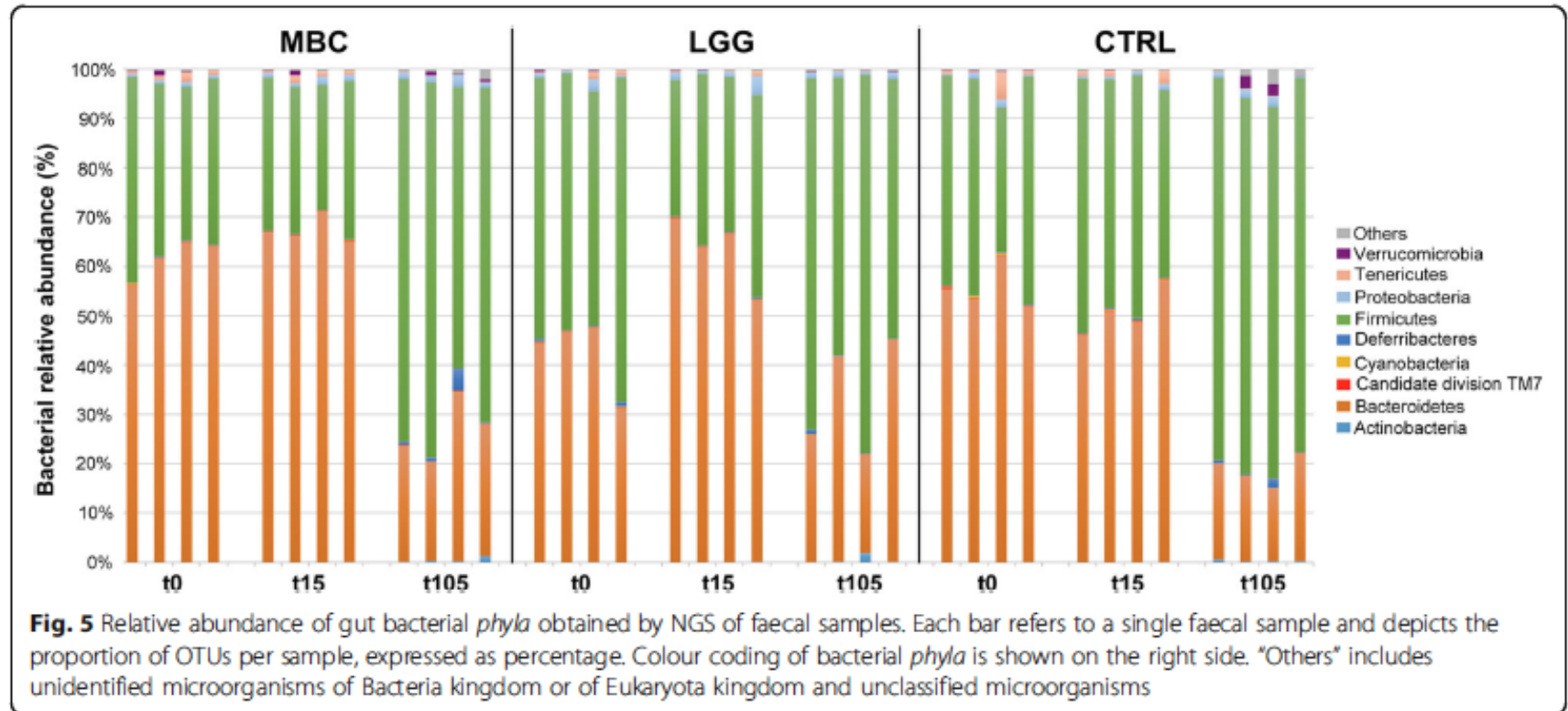


Fig. 5 Relative abundance of gut bacterial *phyla* obtained by NGS of faecal samples. Each bar refers to a single faecal sample and depicts the proportion of OTUs per sample, expressed as percentage. Colour coding of bacterial *phyla* is shown on the right side. "Others" includes unidentified microorganisms of Bacteria kingdom or of Eukaryota kingdom and unclassified microorganisms

Roselli et al., 2017

E' comunque importante notare che le specie ***L. delbrueckii*** e ***Leuc. lactis***, che rappresentano due dei principali componenti del microbiota della MBC microbiota, sono **stati ritrovati esclusivamente in campioni fecali di topi supplementati con MBC**, seppure a bassi livelli di abbondanza relativa

CONCLUSIONI

- Il **consorzio microbico complesso** si è dimostrato più efficace del probiotico *single-strain* nel migliorare lo stato infiammatorio
- **consorzi microbici complessi naturalmente presenti in alimenti fermentati come potenziali probiotici**
- possibili interazioni sinergistiche tra i ceppi microbici di derivazione ambientale presenti nel consorzio

Studi più approfonditi saranno comunque necessari per chiarire meglio le potenzialità probiotiche dei microrganismi di origine alimentare e per identificare ceppi probiotici di nuovo isolamento