

Condizioni di stress e metabolismo del *Lactobacillus sakei*: impatto sulle caratteristiche dei prodotti fermentati

Nome e Cognome: Michael Magnani (e-mail: michael.magnani2@unibo.it)
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna
Corso di Dottorato: Scienze e Tecnologie Agrarie, Ambientali e Alimentari
Curriculum: Scienze e Biotecnologie degli Alimenti; Ciclo di dottorato: XXXII; Anno di frequenza: II
Tutor: Prof. Fausto Gardini

1. Stato dell'arte

Lactobacillus sakei è un batterio Gram-positivo appartenente al phylum Firmicutes ed è associato a prodotti a base di carne come componente del microbiota responsabile della fermentazione spontanea (McLeod et al., 2008). L'attività principale dei batteri lattici nei processi di fermentazione è l'acidificazione della matrice che si traduce in una rapida conversione degli zuccheri fermentescibili, principalmente in acido lattico. È stato ottenuto il sequenziamento completo del genoma di *L. sakei* (Chaillou et al., 2005) e ha confermato che questa specie è altamente specializzata per una specifica nicchia ecologica (carne) come dimostrato dalla sua auxotrofia per 18 aminoacidi (solo il glutammato e l'aspartato possono essere sintetizzato ex novo).

Poiché questo microorganismo è comunemente isolato da salami fermentati spontaneamente, viene spesso usato come coltura starter nella produzione industriale di salumi fermentati. Il suo ruolo nella fermentazione riguarda in primo luogo l'acidificazione che è essenziale per il raggiungimento delle caratteristiche qualitative ed igienico-sanitarie.

Grazie all'abbassamento del pH e alla presenza di specifici acidi organici che ostacolano la crescita di patogeni e/o agenti degradativi, aumenta la sicurezza alimentare e la shelf-life dei salumi. Nei prodotti a base di carne, i carboidrati fermentescibili vengono consumati in pochi giorni, se non in ore, mentre le operazioni di maturazione possono continuare per tempi molto più lunghi. Durante questo periodo, *L. sakei* rimane la componente dominante del microbiota. Pertanto, a seguito della deplezione dei carboidrati, il metabolismo di *L. sakei* viene reindirizzato ad attività "secondarie" che influenzano la consistenza, il valore nutrizionale e il profilo aromatico degli alimenti. Negli alimenti fermentati, la formazione degli aromi, appartenenti a diverse classi chimiche quali alcoli, aldeidi, chetoni, acidi grassi, esteri e composti di zolfo, è dovuta alla produzione di composti volatili e aromatici. L'origine di questi composti può essere molto diversa l'una dall'altra e in ogni caso attribuibile alla trasformazione biochimica di carboidrati, proteine e lipidi. Molte delle attività metaboliche che portano alla produzione di composti aromatici nei batteri lattici (LAB) richiedono complessi percorsi metabolici piuttosto che singoli enzimi. Nel caso di *L. sakei*, le attività principali riguardano il metabolismo degli amminoacidi (ramificati e solforati) e il metabolismo dei prodotti derivanti dai carboidrati. Questi metabolis mi alternativi consentono di produrre energia e quindi permettono la sopravvivenza di *L. sakei* anche in ambienti caratterizzati da condizioni ambientali e nutrizionali avverse. Per quanto riguarda il metabolismo degli aminoacidi ramificati, le trasformazioni attribuibili a *L. sakei* sono numerose e ben note, anche se non è ancora chiaro come la cellula scelga tra le varie opzioni disponibili o quante di queste vie contribuiscano al bilancio energetico finale.

L'acido lattico, prodotto in seguito ai metabolis mi primari, può anche essere substrato per altre vie metaboliche in grado di fornire energia alle cellule, e che possono portare alla produzione di composti aromatici. La variabilità con cui queste vie metaboliche sono presenti in *L. sakei*, anche all'interno di ceppi appartenenti alla stessa specie, e l'espressione di geni correlati che possono essere ugualmente variabili, rendono necessario intraprendere un lavoro di ricerca approfondito per individuare alcuni ceppi di *L. sakei* e studiarne i meccanismi che regolano la sua attività metabolica. Queste diverse attività metaboliche possono essere sfruttate per ottenere prodotti fermentati innovativi o per conferire connotazioni aromatiche differenti da quelle tradizionali. Infatti, la modifica di parametri chimico-fisici come la temperatura di fermentazione, il pH, la composizione dei nutrienti, la concentrazione di sale e l'osmolarità possono influenzare le performance metaboliche (Smid e Kleerebezem, 2014). Allo stesso tempo, la biodiversità dei prodotti fermentati spontaneamente derivanti da diverse parti del mondo continua ad essere un serbatoio da cui attingere per isolare e caratterizzare nuovi ceppi con specifiche attività enzimatiche coinvolte nella formazione del flavour.

2. Bibliografia

- Smid EJ, Kleerebezem M (2014) Production of aroma compounds in lactic fermentations, *Annu Rev Food Sci Technol* **5**: 313-326.
- Chaillou S, Champomier-Verge's MC, Comet M, Le Coq AMC, Dudez AM, Martin V, Beaufils S, Darbon-Rongère E, Bossy R, Loux V, Zagore M (2005) The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K, *Nat Biotechnol* **23**: 1527-1533.
- McLeod A, Nyquistb ON, Snipenb L, Naterstada K, Axelsson L (2008) Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods, *Syst appl microbial* **31**: 393-403.

3. Obiettivi

Per il raggiungimento degli obiettivi del progetto della tesi di dottorato il lavoro è stato suddiviso nelle seguenti attività secondo il diagramma di Gantt riportato in Tabella 1:

- A1) Ricerca bibliografica ed identificazione di ceppi di *Lactobacillus sakei* isolati da diverse matrici:** scelta di ceppi di interesse appartenenti alla specie *Lactobacillus sakei*.
A2) Screening su diversi ceppi di *L. sakei*: screening di ceppi di *L. sakei* su terreni e valutazione delle curve di acidificazione e di crescita, in relazione fattori quali temperatura, sale.
A3) Metabolismo in carenza nutrizionale: selezione dei ceppi dotati delle migliori caratteristiche e valutazione del profilo aromatico, della produzione di acidi e del contenuto di amino acidi, in condizioni di carenza nutrizionale.
A4) Prove in tampone con cellule vive: produzione di acidi, amine biogene, metaboliti volatili.
A5) Prove in sistema reale: valutazione dell'inoculo di colture selezionate in prodotti fermentati su scala pilota.
A6) Scrittura e pubblicazione della tesi di dottorato, poster, articoli scientifici e presentazione orale.

Tabella 1. Diagramma di Gantt dell'attività di ricerca del dottorato

Attività	Mese	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	36
A1) <i>Ricerca bibliografica</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A2) <i>Screening su diversi ceppi di Lactobacillus sakei</i>		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
A3) <i>Metabolismo in carenza nutrizionale</i>																			
1) Selezione dei ceppi dotati delle migliori caratteristiche																			
2) Studio di vie metaboliche alternative (zuccheri pentosi, arginina)																			
A4) <i>Prove in tampone con cellule vive</i>																			
1) Valutazione delle cinetiche di fermentazione																			
2) Valutazione della produzione di metaboliti volatili ed acidi organici																			
A5) <i>Prove in sistema reale</i>																			
1) Valutazione delle cinetiche di fermentazione in prodotti fermentati su scala pilota (es. salami)																			
2) Valutazione dell'impatto di tali colture sulle caratteristiche del prodotto finito (molecole volatili tramite SPME-GC-MS, acidi organici tramite HPLC)																			
3) Valutazione dell'impatto di tali colture sulla sicurezza e shelf-life del prodotto finito (molecole ad attività antagonista es. batteriocine)																			
A6) <i>Preparazione della tesi e di articoli</i>																			

4. Stato di avanzamento della ricerca e principali risultati

Durante il primo anno dell'attività di ricerca del mio dottorato sono stati sviluppati i punti A1 e A2 del diagramma di Gantt sopra riportato. In particolare, diverse centinaia di ceppi sono stati isolati da diverse matrici fermentate spontaneamente. Questi sono stati testati per il loro grado di biodiversità attraverso tecniche RAPD-PCR e i diversi biotipi sono stati identificati a livello molecolare mediante sequenziamento parziale della regione 16s rRNA.

Tra i ceppi appartenenti alla specie *L. sakei* sono stati scelti i seguenti:

- *L. sakei* CM3, isolato da un prodotto tipico algerino a base di carne di cammello salata e disidratata;
- *L. sakei* BR3, isolato da un salame fermentato spontaneamente;
- *L. sakei* E13G, isolato da un salame fermentato spontaneamente di tipo felino.

Sono stati inclusi anche un ceppo commerciale (HJ-7), prodotto dall'azienda Chr. Hansen e impiegato come coltura starter dalle industrie di salumi e due ceppi di collezione: il *L. sakei* DSMZ 20017 (DSMZ, Braunschweig, Germania), ceppo tipo isolato da sakè e *L. sakei* DSMZ 6333 (DSMZ, Braunschweig, Germania), ceppo da collezione isolato da carne di maiale confezionata sotto vuoto.

I ceppi di *L. sakei* sono stati valutati per le loro performance di crescita e capacità acidificanti in un sistema modello (terreno di coltura Man Rogosa and Sharpe, MRS broth) a diverse condizioni di temperatura ed in presenza di diverse concentrazioni di sale, per simulare le condizioni riscontrabili nelle diverse produzioni di salumi fermentati. A questo scopo, i ceppi sono stati pre-coltivati e successivamente inoculati in MRS (livello di inoculo circa 5 log UFC/ml) per monitorare la loro capacità di crescita mediante la variazione di densità ottica (DO_{600nm}) con uno spettrofotometro UV-VIS. A tempi definiti è stato misurato anche il pH (pH meter Basic 20) per valutare la cinetica di acidificazione durante la crescita. In particolare, l'effetto della temperatura è stato monitorato incubando i ceppi a temperature comprese tra 5 e 40°C (con step di 5°C); mentre l'effetto dell'NaCl è stato valutato a 30°C, aggiungendo 0, 2, 4, 6 e 8% (p/v) di NaCl. I dati di densità ottica e pH sono stati elaborati mediante l'equazione di Gompertz come modificata da Zwietering:

$$y = Ae^{-e\left[\left(\frac{\mu_{max}e}{A}\right)(\lambda-t)+1\right]}$$

dove y è la densità ottica (o pH) al tempo t , A rappresenta il valore massimo di DO_{600nm} raggiunto oppure il massimo decremento di pH, μ_{max} è la massima velocità d'incremento di DO_{600nm} o decremento di pH in fase esponenziale, e λ è la durata della fase lag.

Per quanto riguarda la temperatura, tutti i ceppi sono cresciuti tra 5 e 35°C, ma nessuno è stato in grado di crescere a 40°C. I valori di deviazioni standard sottolineano una grande variabilità nelle performance dei ceppi, specialmente alle temperature più basse. A 5°C il coefficiente di variazione (CV) osservato per A , μ_{max} e λ sono rispettivamente 61.4, 72.5 e 34.4%. Il CV era inferiore alle temperature più alte. Le migliori performance fermentative (cioè i maggiori valori di A e minori valori di λ) sono state osservate tra 25 e 35°C e senza sostanziali differenze in accordo con l'analisi ANOVA effettuata ($p > 0.05$). Anche il pH cala più velocemente a 30°C ma senza differenze significative tra i campioni a 35 e 25°C. In generale *L. sakei* DMSZ 20017 ha una capacità di acidificazione minore, che determina quindi un pH finale più alto, mentre il ceppo HJ-7 ha mostrato un'acidificazione maggiore, specialmente a 5°C.

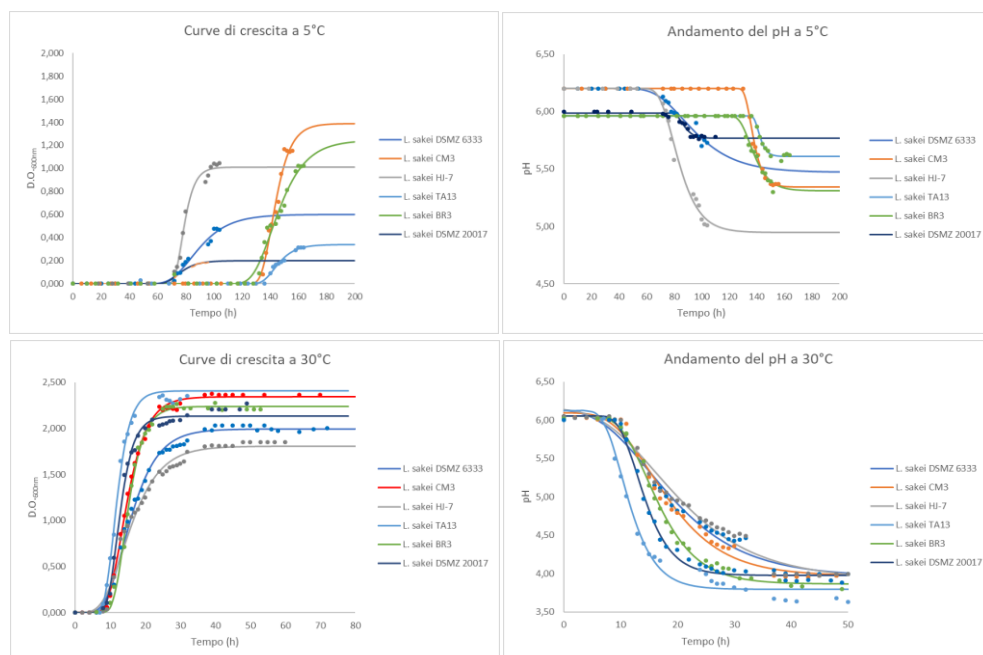


Figura 4.1 e 4.2: Curve di crescita e andamento del pH di ceppi di *L. sakei* a 5°C. Le linee descrivono il risultato ottenuto attraverso la modellazione dei dati con l'equazione di Gompertz, mentre i punti rappresentano i dati sperimentali ottenuti attraverso la misura della DO_{600nm} e del pH.

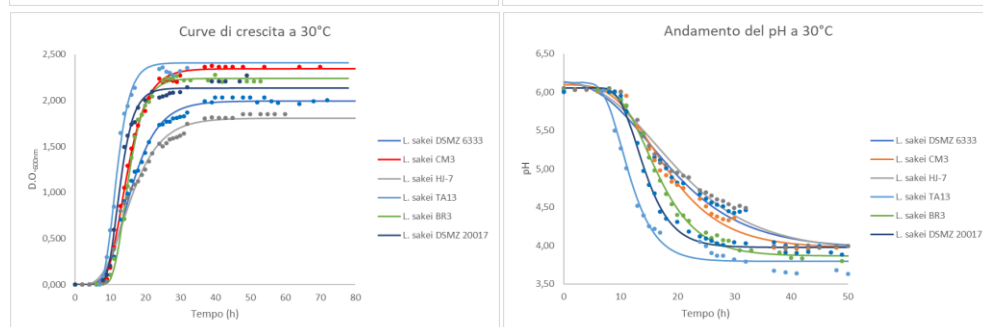


Figura 4.3 e 4.4: Curve di crescita e andamento del pH di ceppi di *L. sakei* a 30°C. Le linee descrivono il risultato ottenuto attraverso la modellazione dei dati con l'equazione di Gompertz, mentre i punti rappresentano i dati sperimentali ottenuti attraverso la misura della DO_{600nm} e del pH.

È stata riscontrata un'ampia variabilità tra le risposte fisiologiche dei ceppi anche in relazione alla concentrazione di NaCl. Tuttavia, tutti i ceppi sono stati in grado di crescere alla percentuale maggiore testata (8%) (Figura 4.5) anche se con una maggiore variabilità di performance, come testimoniato dai valori di A , μ_{max} e λ (21.5, 42.8 e 62.0 %). L'andamento del pH rispecchia i risultati ottenuti per il parametro A . Anche in presenza dell'8% di NaCl il pH cala di 1.0-1.5 unità (Figura 4.6).

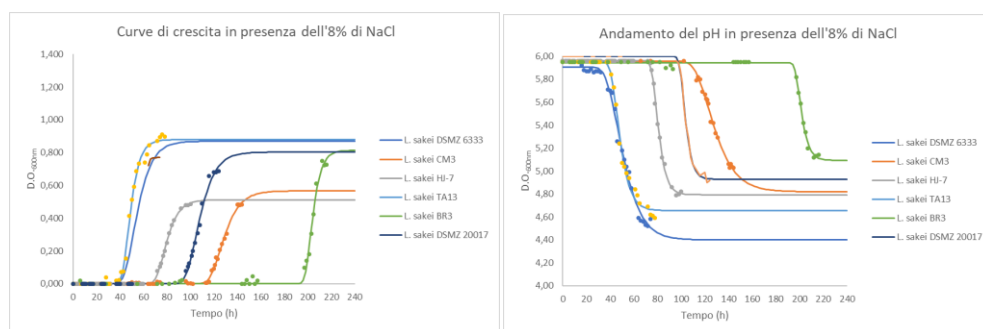


Figura 4.5 e 4.6: Curve di crescita e andamento del pH di ceppi di *L. sakei* a 30°C e all'8% di NaCl. Le linee descrivono il risultato ottenuto attraverso la modellazione dei dati con l'equazione di Gompertz, mentre i punti rappresentano i dati sperimentali ottenuti attraverso la misura della DO_{600nm} e del pH.

5. Elenco delle pubblicazioni prodotte nell'ambito dell'attività di dottorato

Magnani, M., Tabanelli, G., Montanari, C., Barbieri, F., Zamagna, I., Gardini, F. (2017). Study of sugar metabolism in synthetic media of *Lactobacillus sakei* strains isolated from different sources. 3rd International Symposium on Fermented Meat, Clermont-Ferrand (FRANCE), 27-29 September 2017, Book of abstract, P-10, 34.

Tabanelli, G., Montanari, C., Zamagna, I., Barbieri, F., Magnani, M., Gardini, F. (2017). Safety evaluation of an innovative fermented product. International Conference on Food Innovation, Food INNOVA 2017, 31 January-3 February 2017, Cesena (Italy). Book of abstract, pag. 209.

