

# **Gram positivi di interesse alimentare CNC & LAB**

**Cocchi Coagulasi Negativi**  
**(*Coagulase Negative Cocci*, CNC)**

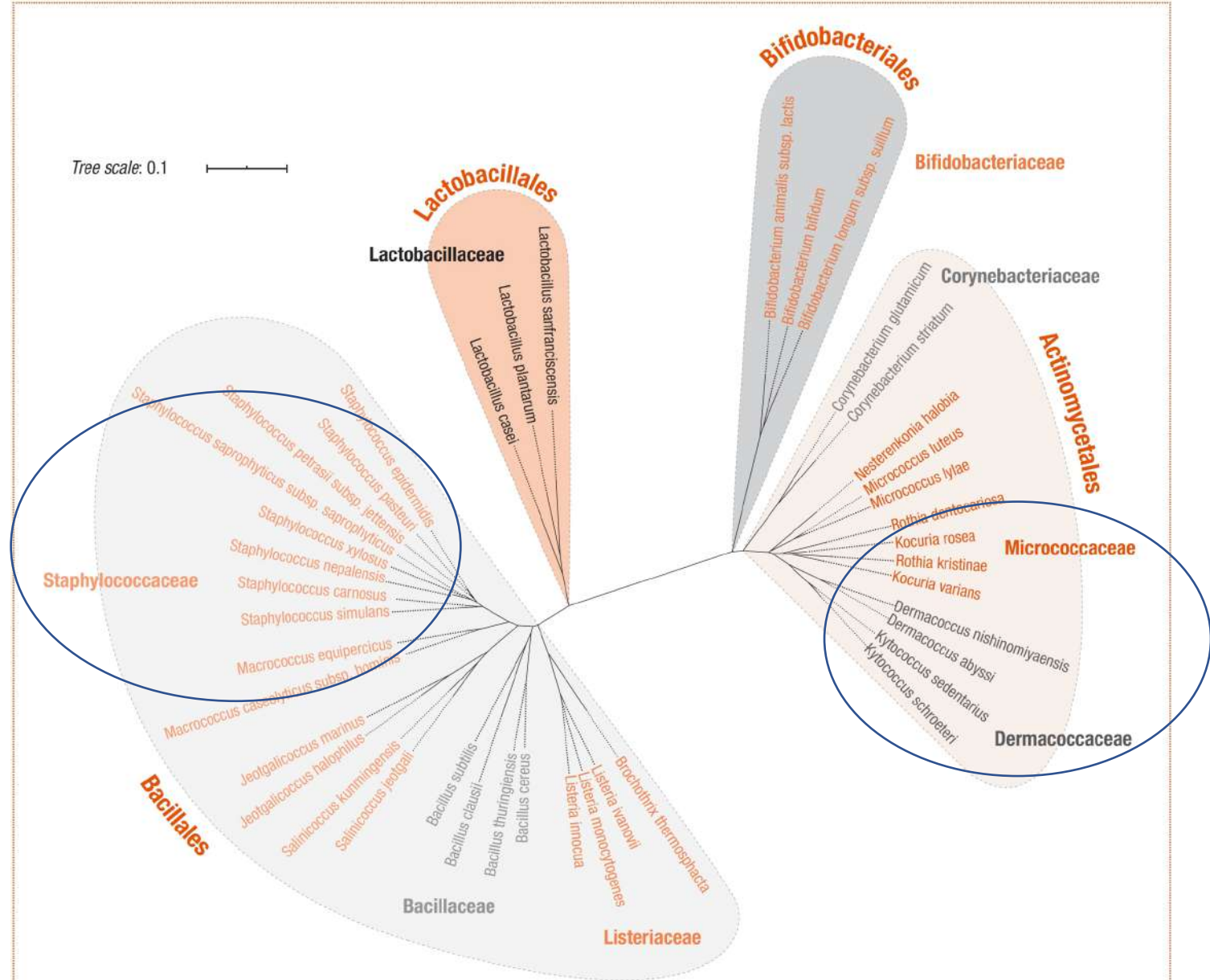
## Definizione e Caratteristiche

La denominazione "cocchi coagulasi negativi" si riferisce a popolazioni batteriche di forma coccica che condividono la presenza dell'enzima **catalasi** ma si distinguono per l'assenza dell'enzima **coagulasi**.

Questo criterio serviva a distinguere, all'interno dei cocchi catalasi positivi, i coagulasi positivi, considerati **solitamente patogeni**, da quelli negativi, generalmente ritenuti **benigni**.

# L'Elevata Biodiversità Tassonomica

Alcune specie rientrano nel *phylum* dei **Firmicutes**, mentre altre in quello degli **Actinobacteria**.



**Figura 6.1** Albero filogenetico basato sulla distanza tra sequenze complete della regione 16S rDNA di 40 specie batteriche. Nella parte destra i due ordini Actinomycetales e Bifidobacteriales appartenenti alla classe Actinobacteria (*phylum* Actinobacteria). I cocci coagulanti negativi riferibili alle famiglie Micrococcaceae e Dermacoccaceae sono all'interno dell'ordine Actinomycetales. Nella parte sinistra gli ordini Bacillales e Lactobacillales della classe Bacilli (*phylum* Firmicutes). I cocci coagulanti negativi sono annoverati nella famiglia delle Staphylococcaceae, all'interno dell'ordine Bacillales.

## Rivisitazione Tassonomica

La classificazione dei CNC è stata oggetto di radicali rivisitazioni. Storicamente distinti nei generi *Staphylococcus* e *Micrococcus* all'interno della famiglia Micrococcaceae, le moderne analisi filogenetiche hanno dimostrato che non sono strettamente correlati.

Gli **stafilococchi** risultano **anaerobi facoltativi**, mentre i **micrococchi** sono **aerobi obbligati**.

Phylum	Ordine	Famiglia	Generi Rappresentativi (CNC)	Contenuto G + C %
Firmicutes	Bacillales	Staphylococcaceae	Staphylococcus, Jeotgalicoccus, Micrococcus, Salinicoccus	Basso (30-45%)
Actinobacteria	Actinomycetales	Micrococcaceae	Micrococcus, Kokuria, Nesterenkonia	Elevato
Actinobacteria	Actinomycetales	Derma­coccaceae	Derma­coccus, Kytococcus, Luteipulveratus	Elevato

## *Staphylococcaceae*

Il termine **stafilococco** (dal greco *staphyle*, grappolo, e *kokkos*, granello) fu introdotto alla fine del 1800 per distinguere le cellule catalasi positive che si organizzano **a grappolo** da quelle disposte a catena (come gli streptococchi).

Generi di interesse alimentare

*Staphylococcus*

*Micrococcus*

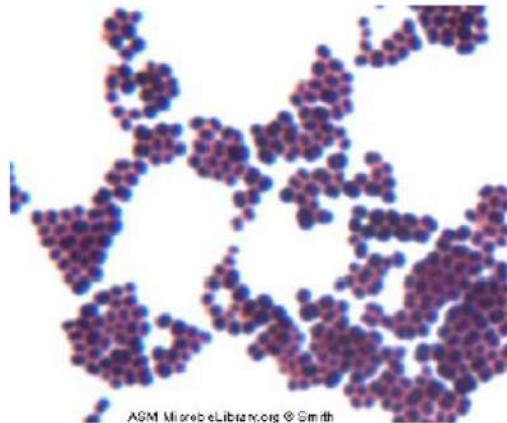
# *Staphylococcus*

Il genere *Staphylococcus* è il più studiato, specialmente per le specie patogene e coagulasi positive.

Il genere comprende sia specie saprofite (*S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. simulans*) che specie patogene come *S. aureus* (coagulasi positivo)

## Caratteristiche Fisiologiche e Strutturali

Tutti gli stafilococchi coagulasi negativi sono caratterizzati da cellule **non mobili, anaerobie facoltative**





# *Micrococcaceae*

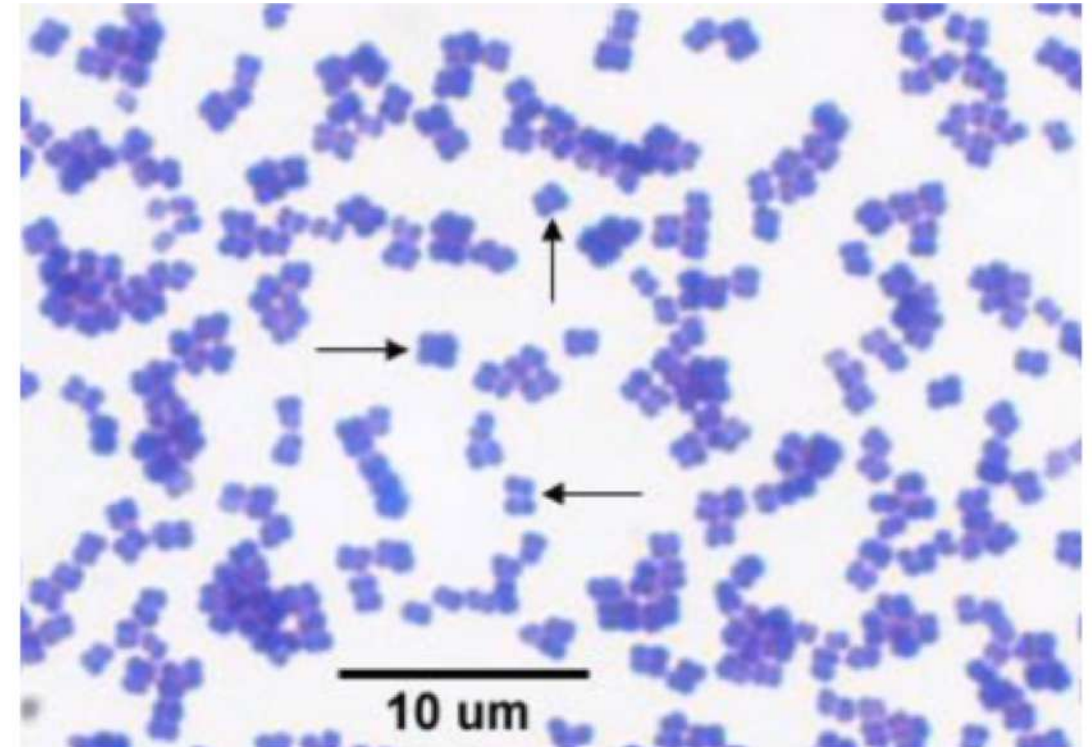
La ridefinizione tassonomica della famiglia *Micrococcaceae* ha rivisitato il genere *Micrococcus* e delineato nuovi generi.

Specie tradizionalmente in *Micrococcus* sono state riclassificate in *Kocuria* (es. *K. varians* e *K. rosea*).

## *Micrococcus*

Cocchi molto piccoli, disposti grappoli o tetradi

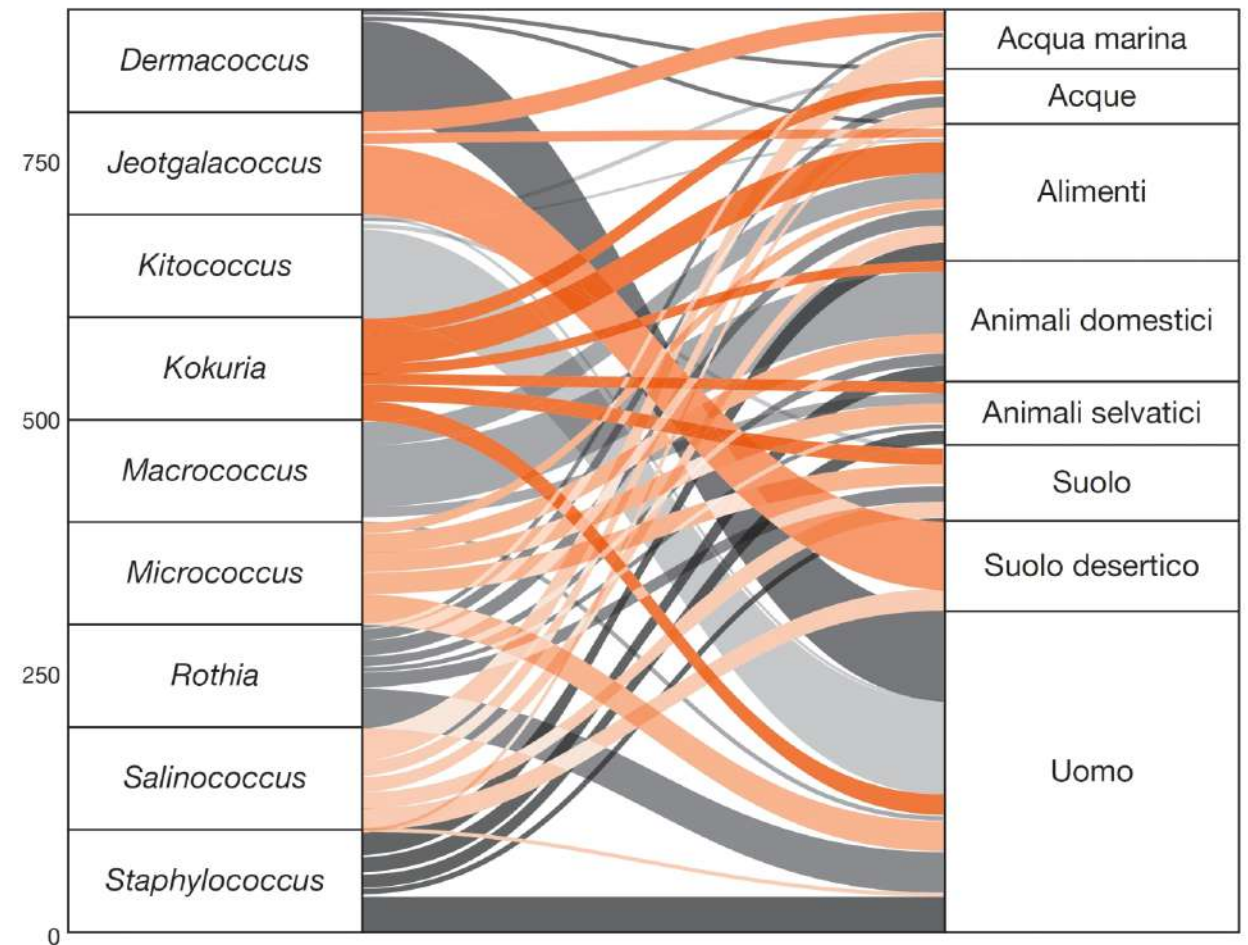
- Aerobi spesso obbligati (sono marginalmente anaerobi facoltativi ma prediligono aerobiosi)
- Saprofiti
- Sono alotolleranti e si trovano in salamoie per la salatura di formaggi (7.5-10 % di sale)
- Svolgono un ruolo fondamentale nelle fermentazioni dei salami dove producono lipasi



## I CNC negli Alimenti

Contaminanti abituali e ubiquitari.

L'ampia diffusione dei CNC nell'ambiente e, in particolare, la loro presenza abituale sulla pelle dei mammiferi, li rendono contaminanti molto comuni negli alimenti, specialmente in quelli di origine animale.



**Figura 6.5** Distribuzione dei cocci coagulasi negativi in funzione delle fonti di isolamento.

## Presenza nel Latte e nei Formaggi

costituiscono una porzione importante del microbiota del latte crudo. *Staphylococcus*, *Macrococcus*, e generi delle *Micrococcaceae* come *Kocuria*, *Rothia* e *Micrococcus*.

- Formaggi a pasta dura, semidura e morbida: *S. xylosus* e *S. saprophyticus*.
- Formaggi a maturazione superficiale: Sono riscontrati principalmente *Macrococcus caseolyticus* e ceppi di *Kocuria spp.*

## CNC negli Insaccati Fermentati

Negli insaccati fermentati, la specie dominante è *S. xylosus*. Le subdominanti *S. carnosus* e *S. saprophyticus*.

- *S. xylosus*: buon adattamento
- *S. carnosus*: resiste ad ambienti acidi e bassa *aw*.

### Il Ruolo degli Aerobi Obbligati

#### ***Kocuria*.**

Questi sono largamente isolati nella fase iniziale della maturazione, ma vengono progressivamente sostituiti dagli stafilococchi coagulasi negativi, poiché consumano l'ossigeno residuo nell'ambiente.

## CNC nelle Biotecnologie Alimentari

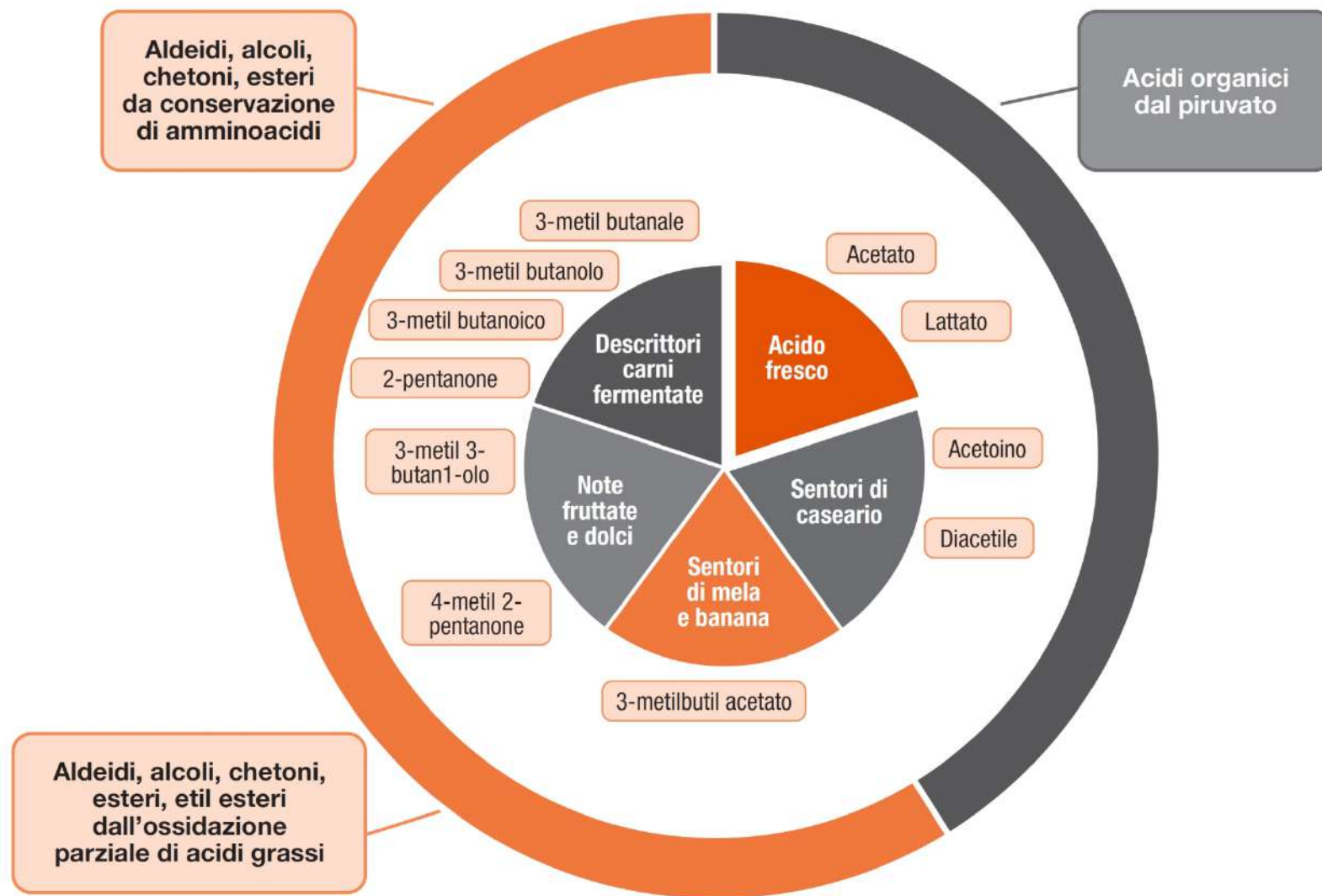
I CNC, grazie alle loro attività metaboliche e al ricco corredo enzimatico, sono pienamente compatibili con le biotecnologie alimentari. La loro capacità di produrre acidi organici, molecole inorganiche, composti aromatici e peptidi bioattivi è essenziale per garantire, innovare e diversificare la qualità dei prodotti alimentari.

Via dell'Acido Lattico

Via dell'Acido Acetico e Etanolo

Via dell'Acetoino e Butandiolo





**Figura 6.12** Attributi sensoriali definiti dai cocchi coagulanti negativi attraverso differenti vie enzimatiche: ossidazione dei carboidrati con produzione di diversi acidi organici; idrolisi delle proteine, ossidazione dei lipidi, conversione di amminoacidi liberi e acidi grassi liberi.

## Bioprotezione, Colore e Salubrità

### Controllo dell'Ossidazione (**Attività Antiossidante**)

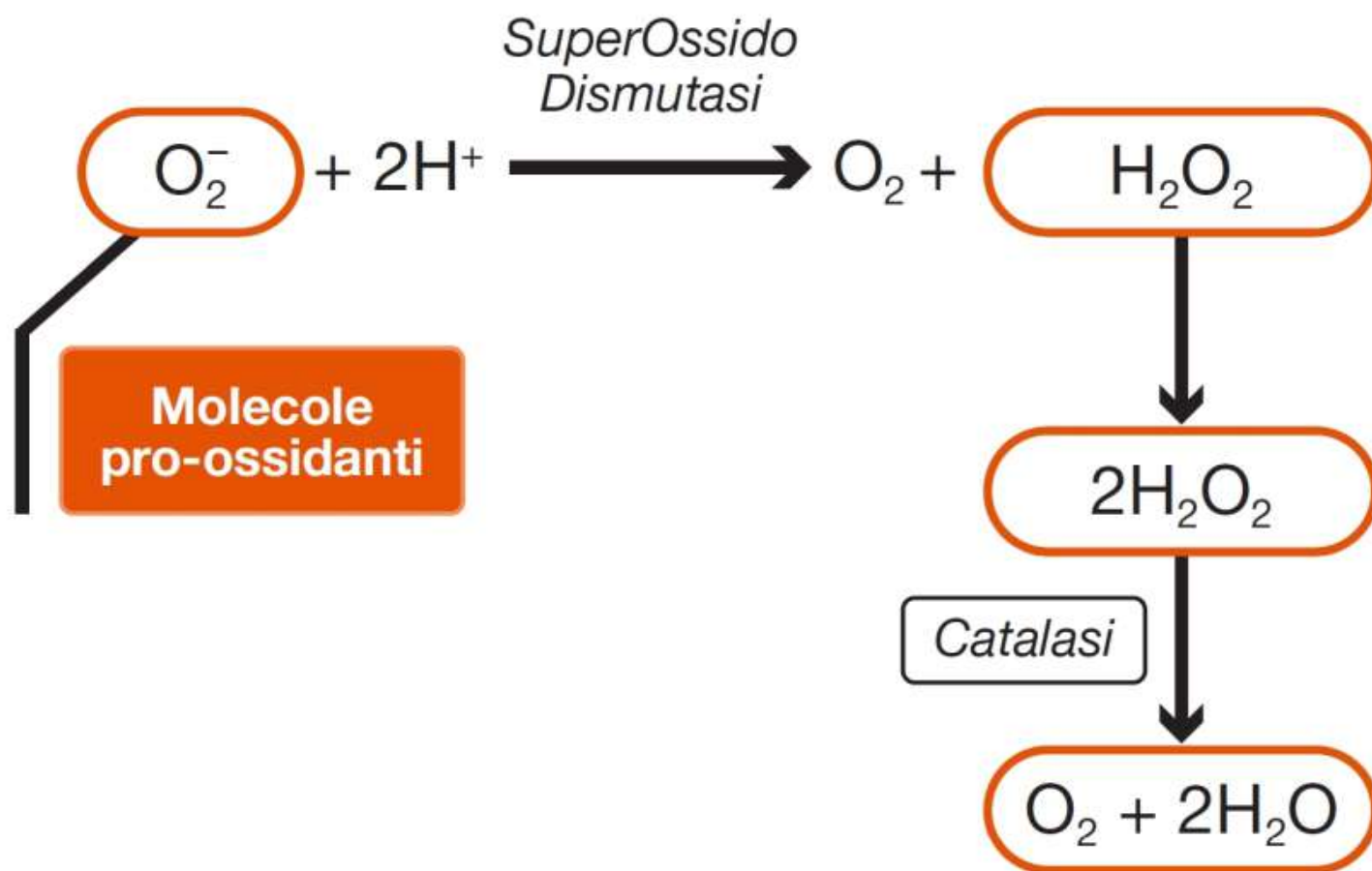
L'impiego crescente dei CNC è legato alla loro capacità di regolare i fenomeni di ossidazione delle componenti lipidiche, che causano rancidità.

Le specie di CNC intervengono con gli enzimi catalasi e superossido dismutasi (SOD) per "neutralizzare" le molecole pro-ossidanti: la SOD converte i radicali superossido in perossido di idrogeno, che a sua volta viene convertito dalla catalasi in acqua e ossigeno.

Alcune specie di stafilococchi (*S. carnosus*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*) possiedono fino a tre enzimi catalasi.



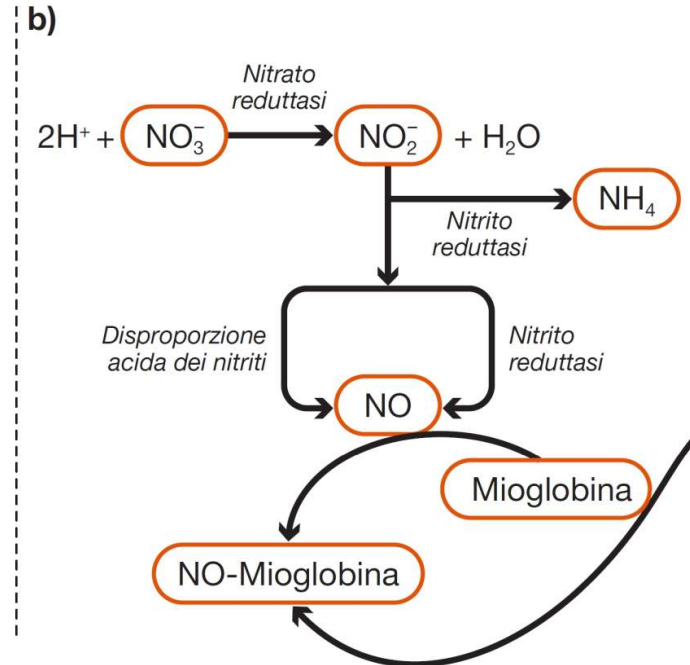
a)



## Fissazione del Colore (Azione Nitrato Reduttasica)

L'azione nitrato reduttasica dei CNC è cruciale per la qualità sensoriale dei prodotti carnei fermentati. Essa riduce i nitrati ( $\text{NO}_3$ ) a nitriti ( $\text{NO}_2$ ).

In condizioni acide, i nitriti formano ossido di azoto ( $\text{NO}$ ), che combinandosi con la mioglobina forma la nitrosomioglobina, responsabile del caratteristico colore rosso.



## Meccanismo di Bioprotezione

I nitriti e l'ossido di azoto accumulati grazie ai CNC fungono da importanti composti ad **azione inibente** nei confronti di microrganismi indesiderati (es. *Clostridi* e *Listeriaceae*), alterando enzimi essenziali nel loro metabolismo.

I CNC producono oltre venti **batteriocine** ad attività antimicrobica, principalmente appartenenti alla **classe I** e **classe II**

# **Sicurezza e Status (QPS/GRAS)**

I CNC sono soggetti a dubbi sulla sicurezza

- **Resistenza agli antibiotici:** Varia da specie a specie; i geni sono spesso riscontrati, ma la trasmissibilità è rara.
- **Produzione di ammine biogene:** Meccanismo diffuso in risposta a condizioni di stress.
- **Infezioni nosocomiali:** Capacità di indurre infezioni in ambiente clinico.

Questi fattori limitano il loro inserimento negli elenchi di microrganismi sicuri riconosciuti a livello internazionale, come GRAS (USA) o QPS (UE).

Nonostante i timori clinici, i CNC non sono mai stati registrati come causa di intossicazioni alimentari o patologie legate al consumo di alimenti.

Oltre ai requisiti di sicurezza da rispettare, un potenziale starter CNC deve presentare determinate caratteristiche tecnologiche

Starter	Caratteristiche di sicurezza	Caratteristiche tecnologiche
Stafilococchi e micrococchi	Coagulasi negativi ✓ Assenza di antibiotico-resistenza trasmissibile per via orizzontale ✓ Incapacità di produrre ammine biogene	Sviluppo a 15 °C Resistenza a NaCl (7,5%) ✓ Riduzione del nitrato a nitrito Detossificazione delle ammine biogene presenti (produzione di ammino ossidasi) ✓ Attività enzimatiche (proteolisi, lipolisi) Produzione di catalasi Metabolismo degli amminoacidi

**Batteri Lattici**  
**(Lactic Acid Bacteria; *LAB*)**

## **I Batteri Lattici (LAB)**

Il nome "batteri lattici" (o **LAB**, da *Lactic Acid Bacteria*) indica una categoria funzionale di microrganismi. La loro caratteristica principale è la capacità di produrre acido lattico come risultato dominante del metabolismo degli zuccheri.

I LAB hanno le seguenti caratteristiche:

- Forma: Cocchi e Bacilli.
- Gram positivi.
- Non sporigeni.
- Catalasi negativi.

Le cellule possono presentarsi al microscopio come cellule singole, coppie, catenelle o tetradi, a seconda della specie e del genere.

# Tassonomia dei Batteri Lattici (LAB) negli Alimenti

I LAB di interesse alimentare appartengono a quattro delle cinque famiglie dell'ordine Lactobacillales (la famiglia Aerococcaceae non è di interesse). Queste famiglie contengono complessivamente 58 generi e circa 600 specie, di cui solo una piccola parte è rilevante per la microbiologia degli alimenti:

- *Carnobacteriaceae*
- *Enterococcaceae*
- *Streptococcaceae*
- *Lactobacillaceae* (include gli ex membri di *Leuconostocaceae*)

Le variazioni tassonomiche, come la recente riclassificazione del genere *Lactobacillus*, hanno un impatto pratico, anche sull'etichettatura dei prodotti.



## *Carnobacteriaceae*

La famiglia *Carnobacteriaceae* contiene 16 generi e 50 specie. Il genere tipo e più numeroso è *Carnobacterium* (12 specie).

Batteri di forma bacillare, catalasi negativi e non sporigeni.

Sono psicrotrofi (crescono bene a basse temperature), a lenta acidificazione e capaci di crescere a pH elevati (fino a 9,5).

eterofermentanti e degradano gli amminoacidi a catena ramificata, contribuendo in modo sostanziale all'aroma dei prodotti finali.

*C. divergens*, *C. maltaromicum* e *C. mobile*.

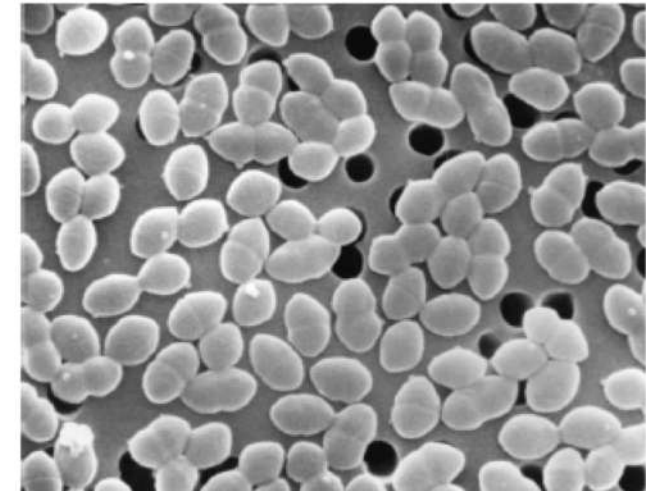
## Enterococcaceae Enterococcus

La famiglia Enterococcaceae contiene 7 generi e 84 specie. I generi di maggiore interesse alimentare sono *Enterococcus* (59 specie) e *Tetragenococcus* (5 specie).

*Enterococcus*: Può essere utilizzato come coltura starter e probiotico, ma può anche agire come organismo opportunista patogeno o alterante.

*E. faecalis*, *E. durans* ed *E. faecium* si ritrovano in alimenti di varia origine:

Producono principalmente acido L-lattico, (5-65°C) e pH (4,5-10), sia in presenza che in assenza di ossigeno.

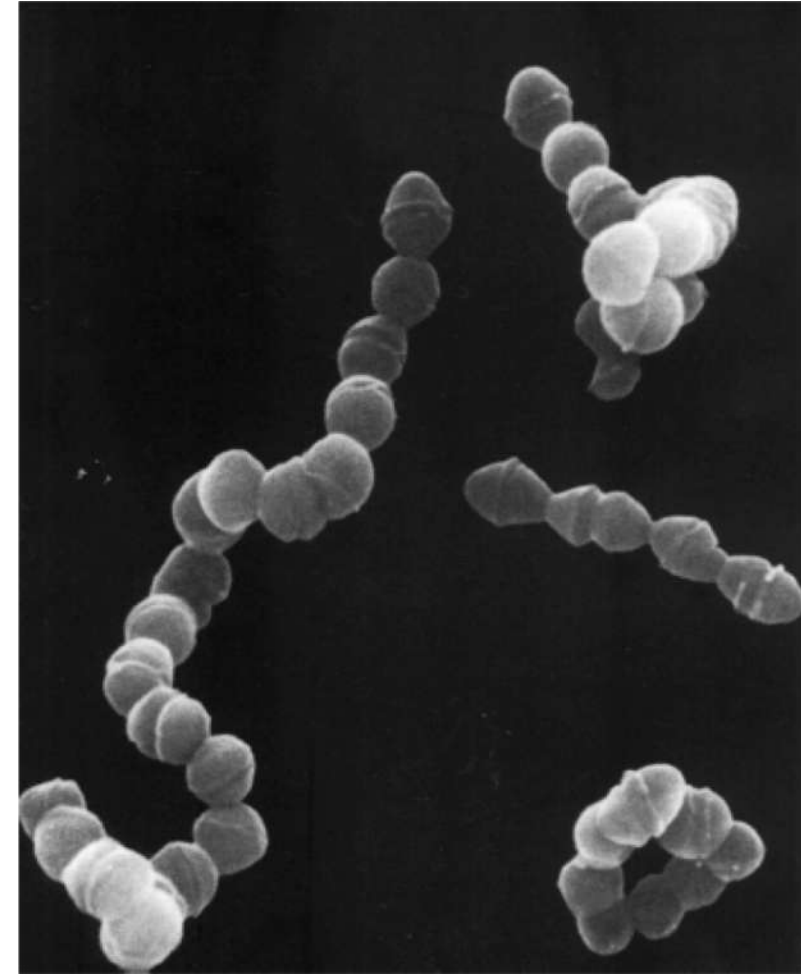


## *Streptococcus*

Il genere comprende principalmente specie patogene per l'uomo e gli animali (*S. pneumoniae*, *S. pyogenes*, specie di riferimento).

*S. thermophilus*: La specie di interesse alimentare è assolutamente sicura e utilizzata globalmente come coltura starter nella produzione di yogurt (insieme a *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*).

*S. gallolyticus subsp. macedonicus* è ritrovato in prodotti caseari.



## *Streptococcaceae* \_ *Lactococcus*

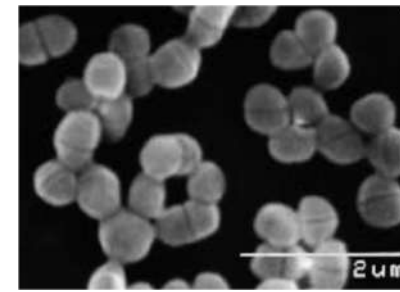
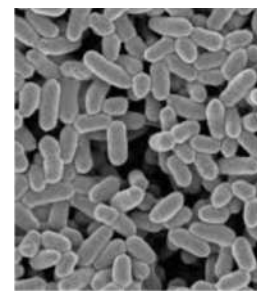
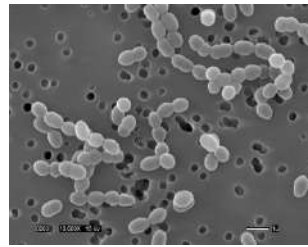
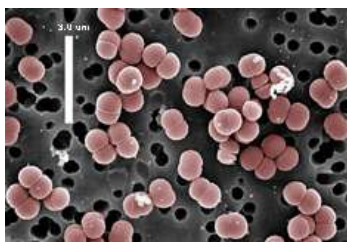
*Lc. lactis* è la specie più studiata, usata come starter  
produce acido L-lattico dal lattosio



Subspecie (*Lc. lactis*):

- *subsp. lactis*: Acidifica rapidamente il substrato.
- *subsp. cremoris*: Contribuisce a un gusto più rotondo e limita l'asprezza.
- *biovar diacetylactis* : Produce diacetile dalla fermentazione del citrato, conferendo sapore e aroma di burro.

*Lc. raffinolactis* è usato commercialmente; *Lc. piscium* è impiegato come coltura protettiva per prodotti ittici.



## *Pediococcus, Leuconostoc, Weissella e Oenococcus*

Filogeneticamente correlati ai lattobacilli, ma di forma coccica con divisione cellulare che porta a tetradi.

Sono omofermentanti (producono acido lattico dal glucosio senza rilascio di CO<sub>2</sub>)

Prevalentemente associati a prodotti fermentati di origine vegetale (cavoli, crauti, cetrioli, vino).

## *Lactobacillaceae*



La famiglia *Lactobacillaceae* è la più eterogenea (starter e probiotici).

La famiglia è stata rivista all'inizio del 2020 e ora include anche la famiglia *Leuconostocaceae*, comprendendo complessivamente 31 generi e 325 specie.

I membri della famiglia possono avere un metabolismo omofermentante o eterofermentante.

Sono generalmente acidofili, ma capaci di sopravvivere anche a pH più basici.

Applicazioni: Sono usati come starter in una vasta gamma di prodotti: lattiero-caseari, vegetali fermentati, carni fermentate, bevande (birra, vino), paste acide e insilati. Alcune specie possono anche causare deterioramento.

## *Lactobacillus*

Il genere *Lactobacillus* è stato oggetto di profonda riclassificazione; le specie sono ora distribuite in 25 nuovi generi per riflettere similarità filogenetiche, metaboliche ed ecologiche.

Le specie che hanno mantenuto il nome *Lactobacillus* (filogeneticamente correlate a *L. delbrueckii*, specie di riferimento) sono omofermentanti (es. *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. gasseri*).



Genus name before reclassification	Genus name after reclassification
<b>Probiotics</b>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosum</i>
<b>Starter cultures</b>	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus curvatus</i>	<i>Latilactobacillus curvatus</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>	<i>Lactobacillus helveticus</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Latilactobacillus sakei</i>

1. <i>Acetilactobacillus</i>	Ac.
2. <i>Agrilactobacillus</i>	Ag.
3. <i>Amylolactobacillus</i>	Am.
4. <i>Apilactobacillus</i>	Ap.
5. <i>Bombilactobacillus</i>	Bo.
6. <i>Companilactobacillus</i>	Co.
7. <i>Dellaglioia</i>	D.
8. <i>Fructilactobacillus</i>	Fr.
9. <i>Furfurilactobacillus</i>	Fu.
10. <i>Holzapfelia</i>	H.
11. <i>Lacticaseibacillus</i>	Lcb.
12. <i>Lactiplantibacillus</i>	Lpb.
13. <i>Lactobacillus</i>	Lb. o L.
14. <i>Lapidilactobacillus</i>	Lap.
15. <i>Latilactobacillus</i>	Lat.
16. <i>Lentilactobacillus</i>	Len.
17. <i>Levilactobacillus</i>	Lev.
18. <i>Ligilactobacillus</i>	Lig.
19. <i>Limosilactobacillus</i>	Lim.
20. <i>Liquorilactobacillus</i>	Liq.
21. <i>Loigolactobacillus</i>	Loi.
22. <i>Paralactobacillus</i>	Par.
23. <i>Paucilactobacillus</i>	Pau.



# Terreni di isolamento



M17 per cocci (lattococchi, streptococchi)



MRS per bastoncini (lattobacilli)



Kanamicina  
Esculina agar  
(enterococchi)



Rogosa agar  
(leuconostoc)

**Starter:** *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*.

**Non-Starter (NSLAB):** Contribuiscono all'aroma finale come microbiota secondario (es. con proteolisi e lipolisi). Possono essere impiegati come colture aggiuntive per aumentare la complessità aromatica.

**Probiotici:** Molti ceppi di lattobacilli (es. *L. acidophilus*, *L. gasseri*) e di altri generi riclassificati (es. *Lcb. rhamnosus*, *Lpb. plantarum*) sono riconosciuti come probiotici e sono commercializzati in integratori e alimenti funzionali.

Nome del genere e specie di riferimento	Significato del nome del genere	Caratteristiche principali del genere	Specie utilizzate per la produzione di alimenti fermentati (IDF Bulletin 495/2018)	
<i>Lapidilactobacillus</i> <i>Lap. concavus</i>	Lattobacilli associati alle rocce (dal latino <i>lapidis</i> , roccia/parete). Il nome si riferisce alla fonte di isolamento della <i>type species</i> <i>Lap. concavus</i> , isolato dalle pareti di una cantina per la distillazione di liquori in Cina	Omofermentanti con abilità ceppo- o specie-specifiche di metabolizzare i pentosi, ecologia sconosciuta		
<i>Latilactobacillus</i> <i>Lat. sakei</i>	Lattobacilli diffusi (dal latino <i>latus</i> , ampio)	Omofermentanti, mesofili, con uno stile di vita nomade. Molti ceppi sono psicrofili e crescono sotto gli 8 °C	<i>Lat. curvatus</i> , <i>Lat. sakei</i>	Salumi (sakè e fermentati vegetali)
<i>Lentilactobacillus</i> <i>Len. buchneri</i>	Lattobacilli che crescono lentamente (dal latino <i>lentus</i> , lento)	Eterofermentanti, mesofili, in grado di metabolizzare un ampio spettro di carboidrati. Alcuni lentilattobacilli sembrano in transizione verso uno stile di vita adattato all'ospite, ma la maggior parte di essi sono ambientali o associati ai vegetali. Molti di essi convertono l'acido lattico in dioli	<i>Len. buchneri</i> , <i>Len. diolivorans</i> , <i>Len. farraginis</i> , <i>Len. hilgardii</i> , <i>Len. kefir</i> , <i>Len. kisonensis</i> , <i>Len. otakiensis</i> , <i>Len. parabuchneri</i> , <i>Len. parafarraginis</i> , <i>Len. parakefiri</i> , <i>Len. rapi</i> , <i>Len. sunkii</i>	Latti fermentati acidi (kefir)
<i>Levilactobacillus</i> <i>Lev. brevis</i>	Lactobacilli che promuovono la lievitazione (dal latino <i>levare</i> , alzare)	Eterofermentanti, mesofili o psicrofili, ambientali o associati ai vegetali	<i>Lev. acidifarinae</i> , <i>Lev. brevis</i> , <i>Lev. hammesii</i> , <i>Lev. namurensis</i> , <i>Lev. parabrevis</i> , <i>Lev. senmaizukei</i> , <i>Lev. spicheri</i> , <i>Lev. zymae</i>	Vegetali fermentati (salumi)
<i>Ligilactobacillus</i> <i>Lig. salivarius</i>	Lattobacilli uniti all'ospite (dal latino <i>ligare</i> , legare)	Omofermentanti, la maggior parte di essi sono adattati all'ospite in cui sono stati ritrovati e sono mobili. Diverse specie esprimono l'ureasi per resistere all'acidità gastrica	<i>Lig. acidipiscis</i> , <i>Lig. pobuzihii</i> , <i>Lig. salivarius</i>	
<i>Limosilactobacillus</i> <i>Lim. fermentum</i>	Lattobacilli "collosi" (dal latino <i>limosus</i> , limaccioso)	Eterofermentanti (con due eccezioni). Sono associati ai vertebrati e generalmente producono esopolisaccaridi dal saccarosio (per questo quindi definiti "collosi")	<i>Lim. fermentum</i> , <i>Lim. frumenti</i> , <i>Lim. mucosae</i> , <i>Lim. panis</i> , <i>Lim. pontis</i> , <i>Lim. reuteri</i> , <i>Lim. secaliphilus</i>	Vegetali fermentati (tecnologici e probiotici*)
<i>Liquorilactobacillus</i> <i>Liq. mali</i>	Lattobacilli da liquidi (dal latino <i>liquor</i> , liquido)	Omofermentanti, mobili, in grado di crescere in bevande e presenti in habitat vegetali. Molti di essi producono esopolisaccaridi dal saccarosio e degradano i fruttani tramite fruttanasi extracellulari	<i>Liq. cacaonum</i> , <i>Liq. ghanensis</i> , <i>Liq. hordei</i> , <i>Liq. mali</i> , <i>Liq. nagelii</i> , <i>Liq. oeni</i> , <i>Liq. satsumensis</i>	
<i>Loigolactobacillus</i> <i>Loi. coryniformis</i>	Lattobacilli deterioranti (dal greco <i>loigos</i> , rovina o distruzione)	Omofermentanti, mesofili o psicrofili	<i>Loi. bifementans</i> , <i>Loi. coryniformis</i> , <i>Loi. rennini</i> (spoilage)	
<i>Paralactobacillus</i> <i>Par. selangorensis</i>	Lattobacilli simili al genere <i>Lactobacillus</i> (nome descritto in precedenza e riutilizzato nella riclassificazione)	Omofermentanti, mesofili		

In rosso -> principalmente o tendenzialmente omofermentanti

In blu-> principalmente eterofermentanti

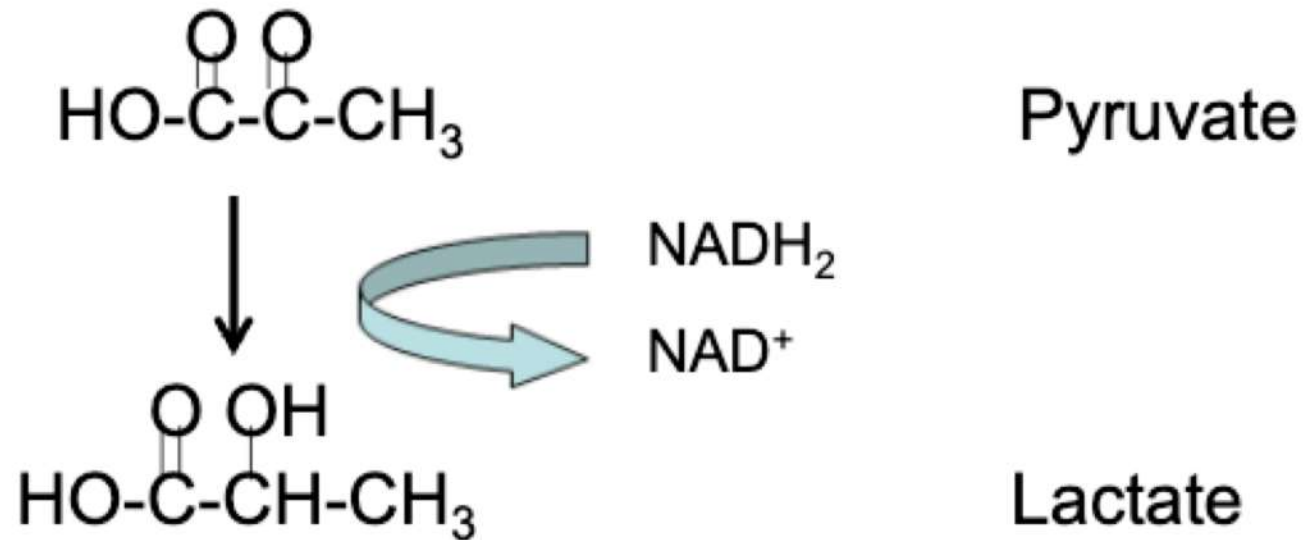


Nome del genere e specie di riferimento	Significato del nome del genere	Caratteristiche principali del genere	Specie utilizzate per la produzione di alimenti fermentati (IDF Bulletin 495/2018)	Presenti e utilizzati in:  Formaggi e yogurt (*probiotico)
<i>Lactobacillus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Bacilli che vivono nel latte (dal latino <i>lactis</i> , latte)	Omofermentanti, termofili, sensibili alla vancomicina	<i>L. acetotolerans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. amylolyticus</i> , <i>L. amylovorus</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. jensenii</i> , <i>L. kefirifaciens</i>	
<i>Acetilactobacillus</i> <i>Ac. jinshanensis</i>	Lattobacilli dell'aceto (dal latino <i>acetum</i> , aceto)	Eterofermentanti, metabolizzano disaccaridi alcolici ottenuti dagli zuccheri, alcuni esosi ma non pentosi		
<i>Agrilactobacillus</i> <i>Ag. composti</i>	Lattobacilli derivati da suolo (dal latino <i>ager</i> , suolo)	Omofermentanti, aerotolleranti. La dimensione del loro genoma, il contenuto in GC e la fonte di isolamento delle due specie del genere suggeriscono uno stile di vita cosiddetto "nomade"	<i>Ag. composti</i>	
<i>Amylactobacillus</i> <i>Am. amylophilus</i>	Lattobacilli che degradano l'amido (dal greco <i>amylon</i> , amido)	Omofermentanti, sensibili alla vancomicina, presentano amilasi extracellulari, probabilmente adattati agli insetti		Impasti acidi lievitati (sviluppo aroma)
<i>Apilactobacillus</i> <i>Ap. kunkeei</i>	Lattobacilli associati alle api (dal latino <i>apis</i> , api)	Eterofermentanti, caratterizzati da una ridotta dimensione del genoma, metabolizzano solo pochi carboidrati, adattati a vivere associati alle api e/o ai fiori		
<i>Bombilactobacillus</i> <i>Bo. mellifer</i>	Lattobacilli associati alle api e ai bombi (dal latino <i>bombus</i> , bombo)	Omofermentanti, termofili, sensibili alla vancomicina, caratterizzati da una ridotta dimensione del genoma, associati alle api e ai bombi		
<i>Companilactobacillus</i> <i>Co. alimentarius</i>	Lattobacilli associati ad altri lattobacilli nella fermentazione dei cereali e altri vegetali (dal latino medievale <i>companion</i> , amico, lett. "colui con cui si divide il pane")	Omofermentanti, capacità ceppo- o specie-specifica di metabolizzare i pentosi, stile di vita "nomade"	<i>Co. alimentarius</i> , <i>Co. crustorum</i> , <i>Co. farciminis</i> , <i>Co. mindensis</i> , <i>Co. nantensis</i> , <i>Co. nodensis</i> , <i>Co. paralimentarius</i> , <i>Co. tucetii</i> , <i>Co. versmoldensis</i>	
<i>Dellaglioia</i> <i>D. algida</i>	Lattobacilli dedicati al Prof. Franco Dellaglio, studioso italiano dei batteri lattici per oltre 50 anni dagli anni '70 del 1900 alla fine del 2010.	Omofermentanti, anaerobi facoltativi e psicrofili		Formaggi e yogurt (funzioni probiotiche)
<i>Fructilactobacillus</i> <i>Fr. fructivorans</i>	Lattobacilli che metabolizzano il fruttosio (dal latino <i>fructus</i> , fruit)	Eterofermentanti, aerotolleranti, caratterizzati da una ridotta dimensione del genoma. I fruttobacilli sono associati a nicchie ecologiche specifiche come insetti e/o fiori	<i>Fr. fructivorans</i> , <i>Fr. sanfranciscensis</i>	
<i>Furfurilactobacillus</i> <i>Fu. rossiae</i>	Lattobacilli derivati dalle fermentazioni dei cereali (dal latino <i>furfur</i> , crusca)	Eterofermentanti, caratterizzati da dimensione del genoma più grande e con potenziale metabolico esteso	<i>Fu. rossiae</i> , <i>Fu. siliginis</i>	
<i>Holzapfelia</i> <i>H. floricola</i>	Lattobacilli dedicati al Prof. Wilhelm Holzapfel, studioso sudafricano dei batteri lattici, attivo dagli anni '60 del 1900 a oggi	Omofermentanti, sensibili alla vancomicina, associati agli insetti		
<i>Lactocaseibacillus</i> <i>Lcb. casei</i>	Lattobacilli associati al formaggio (dal latino <i>casei</i> , formaggio)	Omofermentanti, molte specie utilizzano i pentosi e sono resistenti agli stress ossidativi. <i>Lcb. casei</i> e specie correlate hanno uno stile di vita nomade	<i>Lcb. casei</i> , <i>Lcb. manihotivorans</i> , <i>Lcb. paracasei</i> , <i>Lcb. rhamnosus</i>	Vegetali fermentati (salumi, formaggi, vino)
<i>Lactiplantibacillus</i> <i>Lpb. plantarum</i>	Lattobacilli associati alle matrici vegetali (dal latino <i>planta</i> , pianta)	Omofermentanti, caratterizzati da uno stile di vita nomade e dalla capacità di metabolizzare diversi carboidrati. La maggior parte delle specie degradano gli acidi fenolici tramite attività enzimatiche quali esterasi, decarbossilasi e riduttasi. <i>Lpb. plantarum</i> esprime la pseudocatalasi ed è caratterizzato dall'attività della nitrato riduttasi	<i>Lpb. plantarum</i> , <i>Lpb. fabifermentans</i> , <i>Lpb. paraplantarum</i> , <i>Lpb. pentosus</i>	

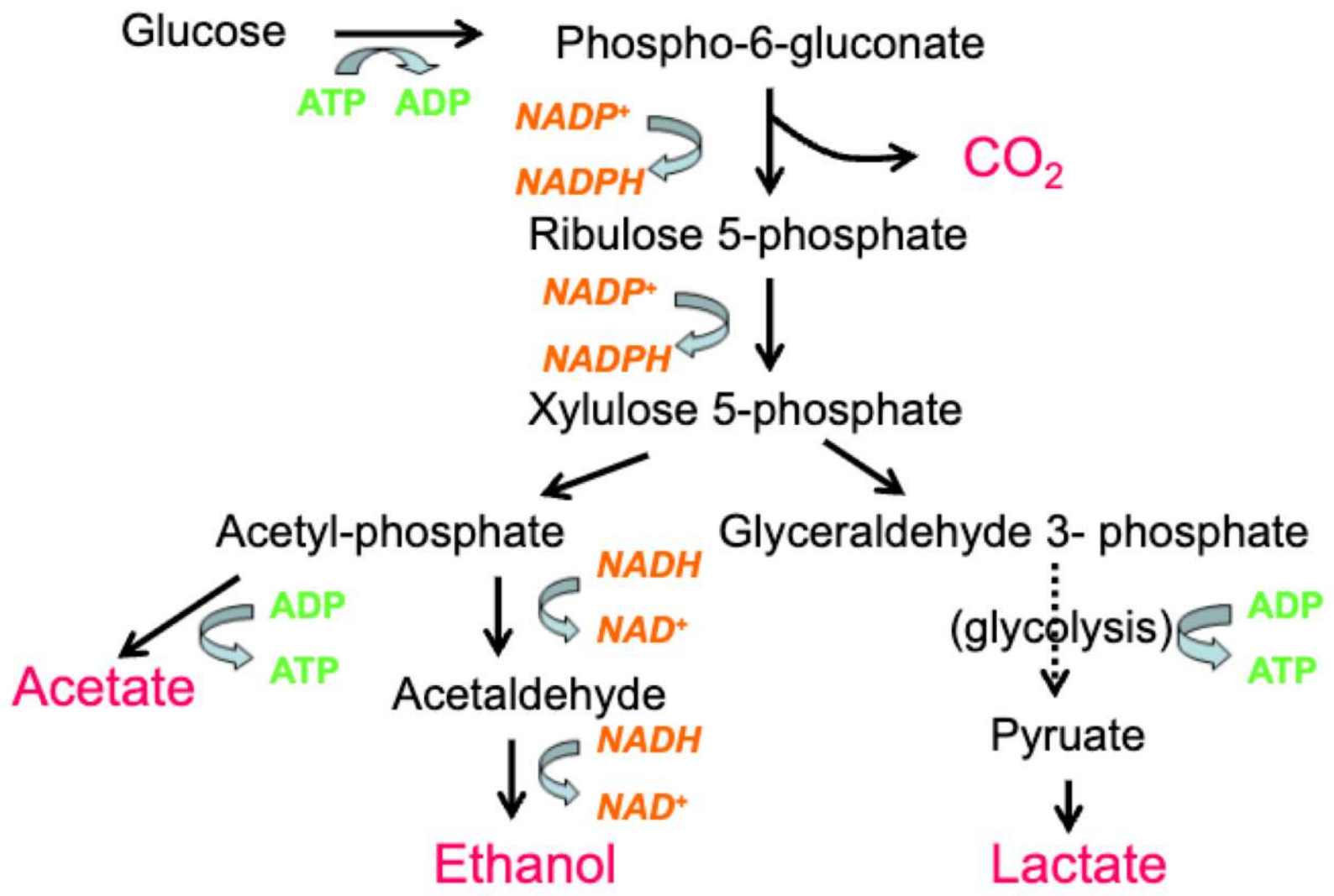
## Classificazione Metabolica (Fermentazione degli Esosi)

*Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, e alcuni lactobacilli sono omofermentativi

Glucose  $\longrightarrow$  Pyruvate via glycolytic pathway



*Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Weissella* *Leconostoc* and alcuni lattobacilli sono eterofermentativi



## Impatto della Fermentazione sugli Alimenti

Acido Lattico: È sempre il risultato finale della fermentazione.

- Negli omofermentanti è l'unico metabolita.
- Negli eterofermentanti è associato ad altri metaboliti.

Impatto della  $\text{CO}_2$  (Eterofermentazione):

La liberazione di  $\text{CO}_2$  ha un grande impatto sull'alimento:

- Causa formazione di schiuma se l'alimento è liquido.
- Crea cavità o occhiature se l'alimento è solido (es. formaggi).

## Impatto sull'Alimento

I LAB definiscono e modificano l'alimento in termini di:

- **Struttura** (texture)
- **Aroma e Sapore**
- **Effetti sulla salute** (es. probiotici)
- **Shelf-life** (durata di conservazione)

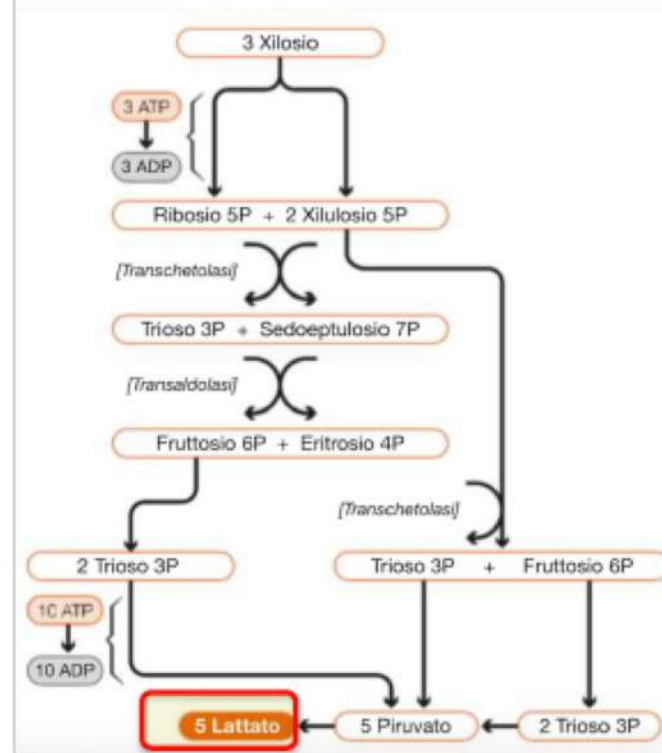
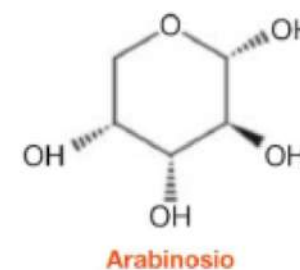


## Metabolismo dei Pentosi

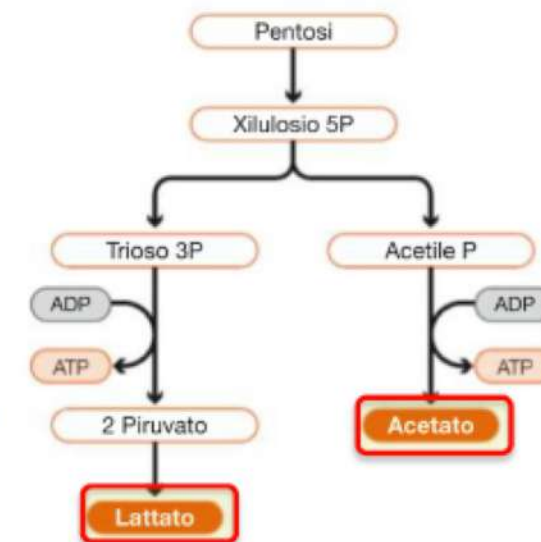
Alcuni LAB possono recuperare energia anche dalla fermentazione degli **zuccheri pentosi** (es. ribosio e arabinosio), che sono meno concentrati e meno frequenti negli alimenti (prevalentemente di origine vegetale).

Condotta da *Lpb pentosus*, *Lpb. plantarum*, *Lpb.paraplantarum*

•**Vie dei Pentosi:** Fermentazione **omofermentante** dei pentosi (via del pentoso fosfato) o **eterofermentante** della fosfochetolasi.



Via di fermentazione omofermentante dei monosaccaridi pentosi

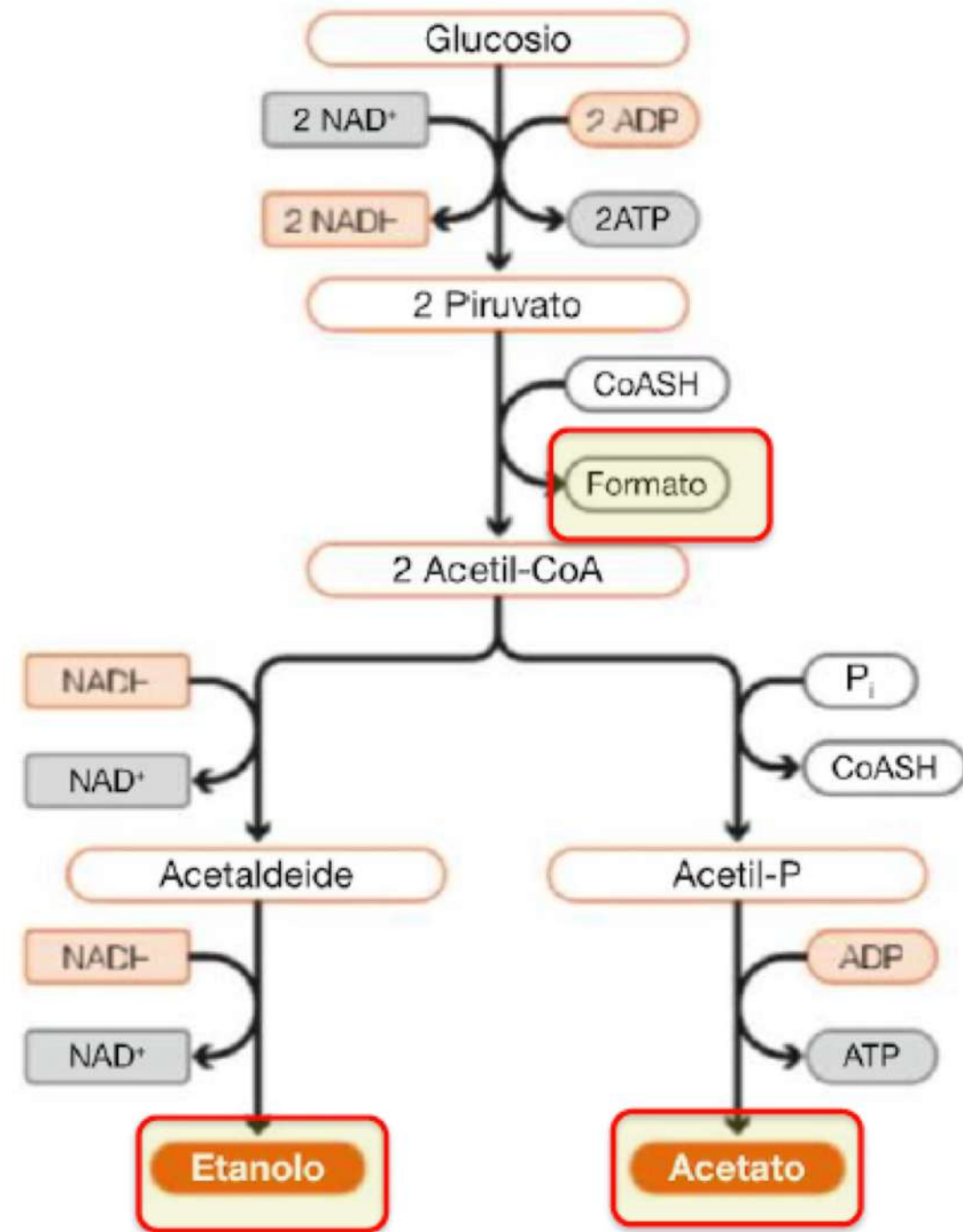


Via di fermentazione eterofermentante dei monosaccaridi pentosi

# Fermentazione acido mista

Avviene in condizioni di anaerobiosi con zucchero scarsamente disponibile (stress)

Oltre all'etanolo e all'acido acetico, viene prodotto anche dell'acido formico (odore pungente e penetrante)



# Metaboliti Secondari e Impatto Globale

Oltre alle vie primarie, i LAB possono seguire vie metaboliche secondarie (cataboliche) che coinvolgono la degradazione di:

- **Acidi organici**
- **Proteine**
- **Lipidi**

## **Desiderati**

**Esopolisaccaridi (EPS)**

**Sostanze aromatiche**

**Batteriocine**

## **Indesiderati**

**Ammine biogene**

# Degradazione di Acidi organici

Acido Organico	Degradazione	Prodotti Chiave	Impatto Organolettico
Acido Citrico	Trasformato in ossalacetato e acetato, poi in piruvato o succinato (specie-dipendente).	Diacetile, Acetoino, 2,3-butandiolo	Aroma di burro e mandorla.
Acido Malico	Convertito in acido lattico con liberazione di CO <sub>2</sub> .	Acido Lattico	Forte caratterizzazione aromatica nel vino (Fermentazione Malolattica).

I LAB possono degradare questi composti per recuperare energia in assenza di zuccheri fermentescibili.

# LAB Degradazione delle Proteine (Proteolisi)

I LAB sono auxotrofi (incapaci di sintetizzare da sé) per gli aminoacidi.

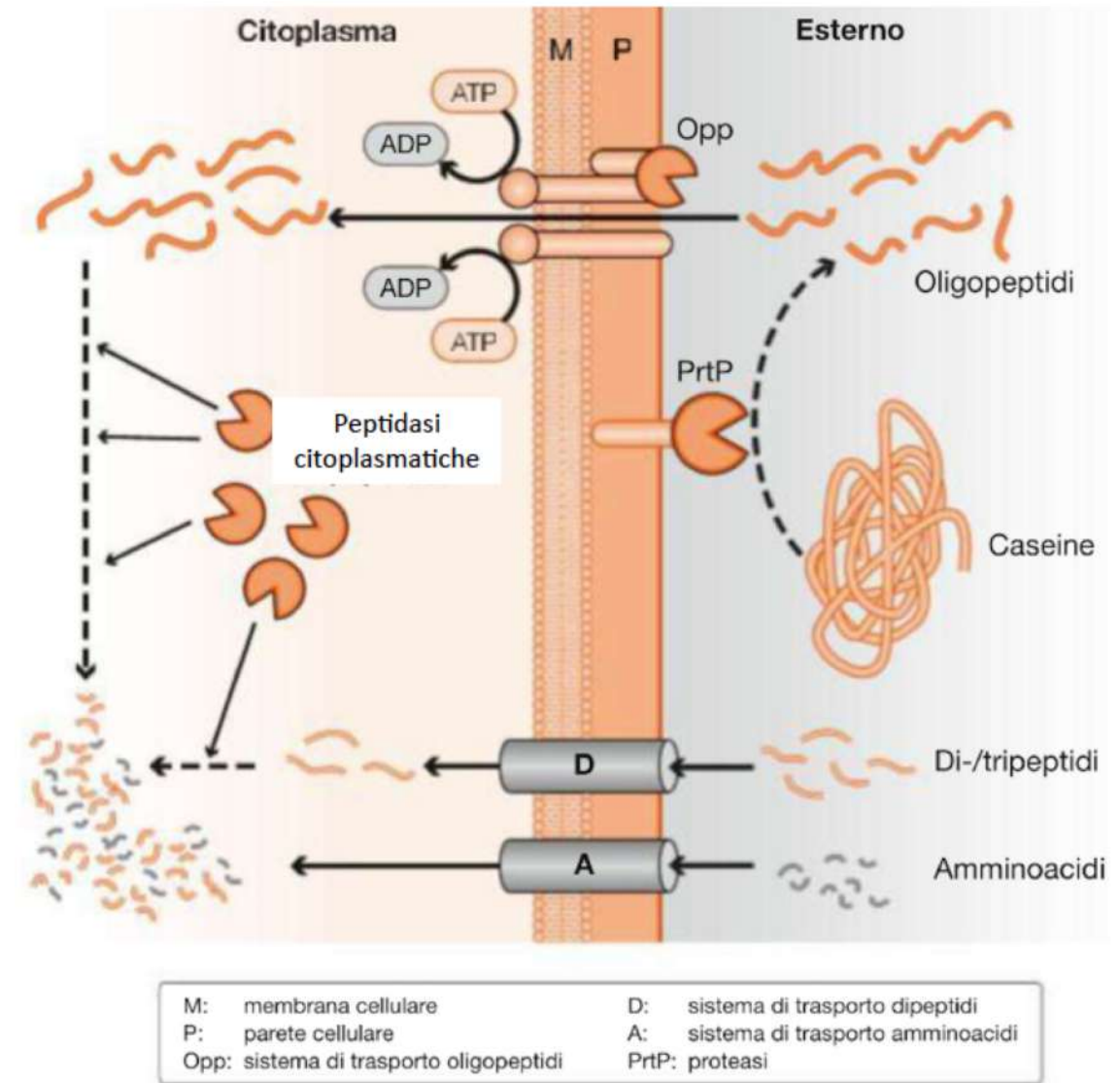
Sequenza del Processo Proteolitico

**Proteinasi**: Enzimi legati alla parete cellulare o rilasciati. Iniziano la degradazione delle proteine (intere o parzialmente degradate) per liberare oligopeptidi.

**Sistema di Trasporto**: permette il trasporto degli oligopeptidi all'interno della cellula.

**Peptidasi** (Citoplasmatiche): degradano in modo intracellulare i peptidi in peptidi più corti e aminoacidi.

Questo processo è cruciale per la nutrizione dei LAB e per il rilascio di precursori dell'aroma (amminoacidi) nell'alimento. Effetto tampone



## Degradazione dei Lipidi (Lipolisi)

I LAB sono generalmente considerati scarsamente lipolitici rispetto a microrganismi come *Penicillium* o *Pseudomonas*.

Sono in grado di idrolizzare di- e monogliceridi contenenti acidi grassi a corta catena.

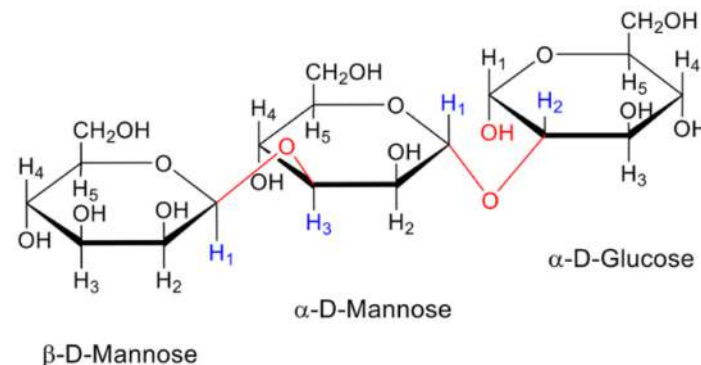
Una parziale attività esterasica suggerisce un limitato coinvolgimento dei LAB nella degradazione della frazione lipidica negli alimenti a lunga stagionatura.

# Produzione di Esopolisaccaridi (EPS)

Gli EPS sono polimeri (subunità ripetuta di mono- o oligosaccaridi)

Funzione Tecnologica: Legano l'acqua, aumentando la viscosità, migliorando la texture e diminuendo la sineresi (separazione di fase liquida).

Funzioni biologiche: riserva energetica, interazione tra cellule batteriche, interazione tra cellula ed ambiente (adesione, biofilm)





Tipo di EPS	Composizione	Sintesi e Adesione	Esempi
<b>Omopolisaccaridi (O-EPS)</b>	Formati da un solo monosaccaride (glucosio, fruttosio, galattosio).	Sintetizzati da glicosil-trasferasi extracellulari e rilasciati nell'alimento.	Destrano, Inulina.
<b>Eteropolisaccaridi (E-EPS)</b>	Costituiti da unità ripetute di zuccheri diversi.	Sintetizzati all'interno della cellula, polimerizzati all'esterno e spesso rimangono adesi alla parete.	Kefirano, Xantano, Gellano.



## Funzioni Fisiologiche degli EPS

La sintesi degli EPS è spesso indotta da condizioni di stress

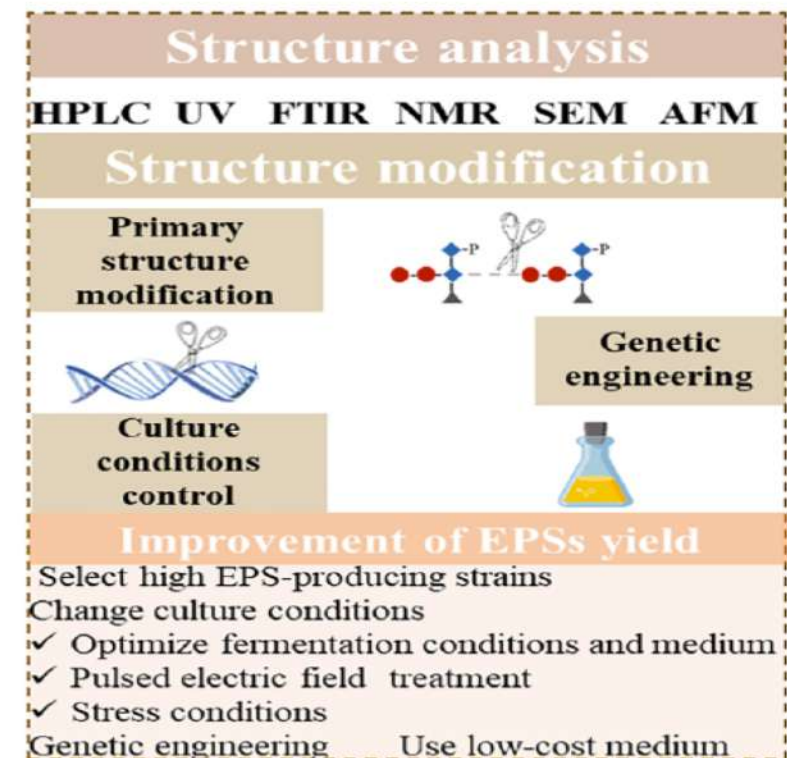
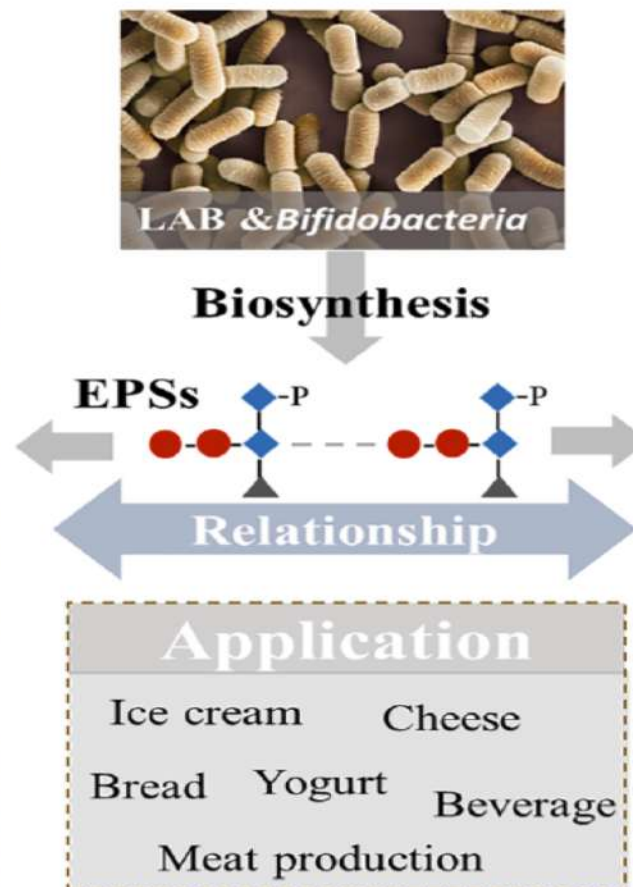
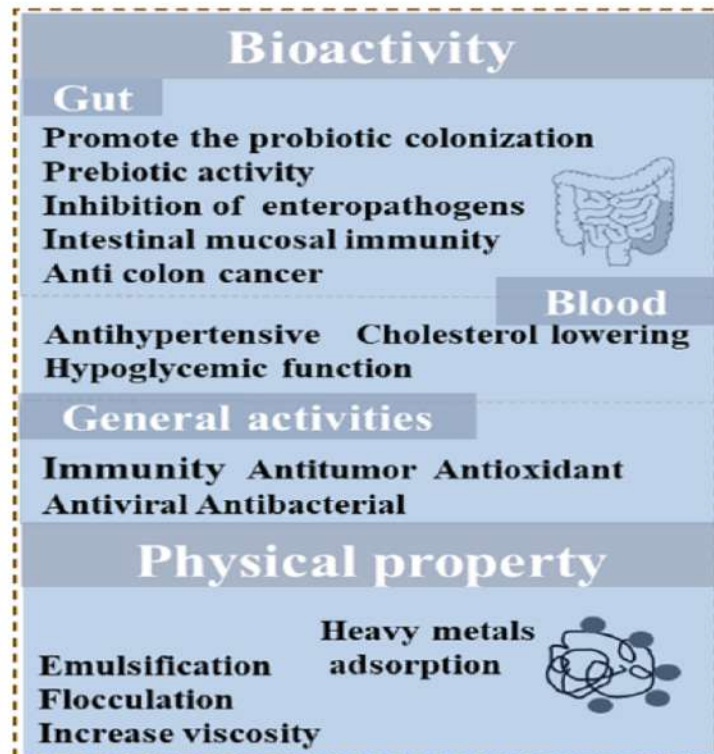
- Protezione Cellulare
- Riserva Energetica
- Interazione Cellulare

Principali Produttori di E-EPS:

*Lactobacillus kefiranofaciens*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. acidophilus*.

Principali Produttori di O-EPS:

*Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Weissella*.



cardioprotettivi,  
antiulcera, antiossidanti,  
inibiscono la proliferazione  
delle cellule tumorali



Figure 1: Congo red agar media for testing Exopolysaccharide production.

## Produzione di Sostanze Aromatiche

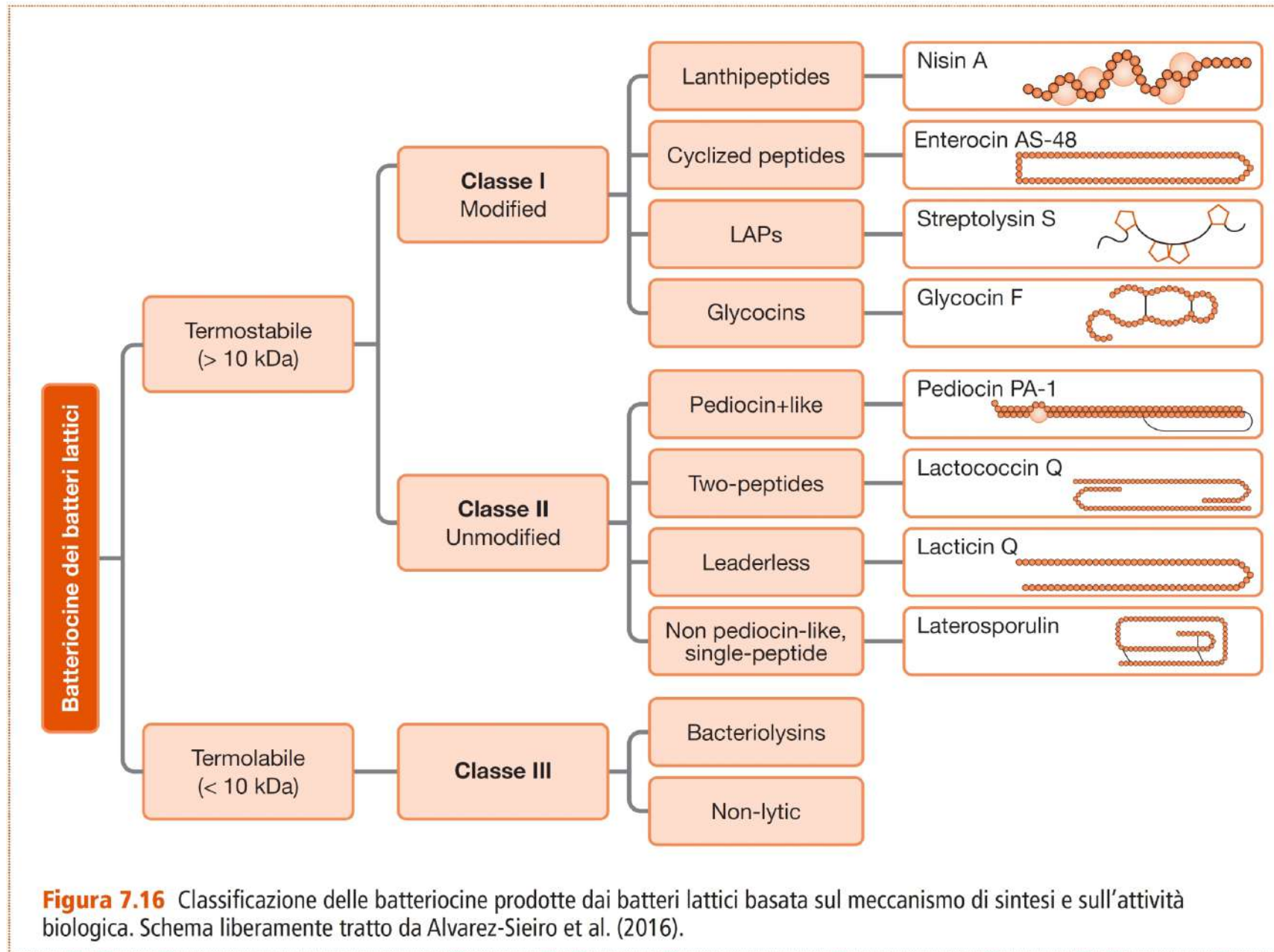
Sono molecole volatili o non volatili (alcoli, aldeidi, chetoni, acidi grassi, esteri, solforati) che influenzano i gusti base: amaro, dolce, acido, salato e umami.

derivano dalla degradazione dei componenti principali degli alimenti (carboidrati, proteine, grassi) in composti più semplici (zuccheri, peptidi, amminoacidi).

- Il gusto dolce e l'umami derivano dalla degradazione degli amminoacidi, il gusto amaro dalla liberazione di oligopeptidi, e l'acido dalla produzione di acidi organici (precursori di altri aromi).



# Produzione di Sostanze Antimicrobiche



## Produzione di Ammine Biogene

Le ammine biogene sono composti azotati a basso peso molecolare prodotti dalla decarbossilazione microbica degli amminoacidi.

Specifici enzimi decarbossilasici sono necessari per catalizzare la rimozione del gruppo carbossilico dall'amminoacido, che viene liberato come  $\text{CO}_2$

Difesa Cellulare: La reazione di decarbossilazione è in grado di contrastare l'acidificazione intracellulare. L'accumulo di ammine biogene aiuta la cellula a resistere allo stress acido.

## **Rischio per la Salute Umana**

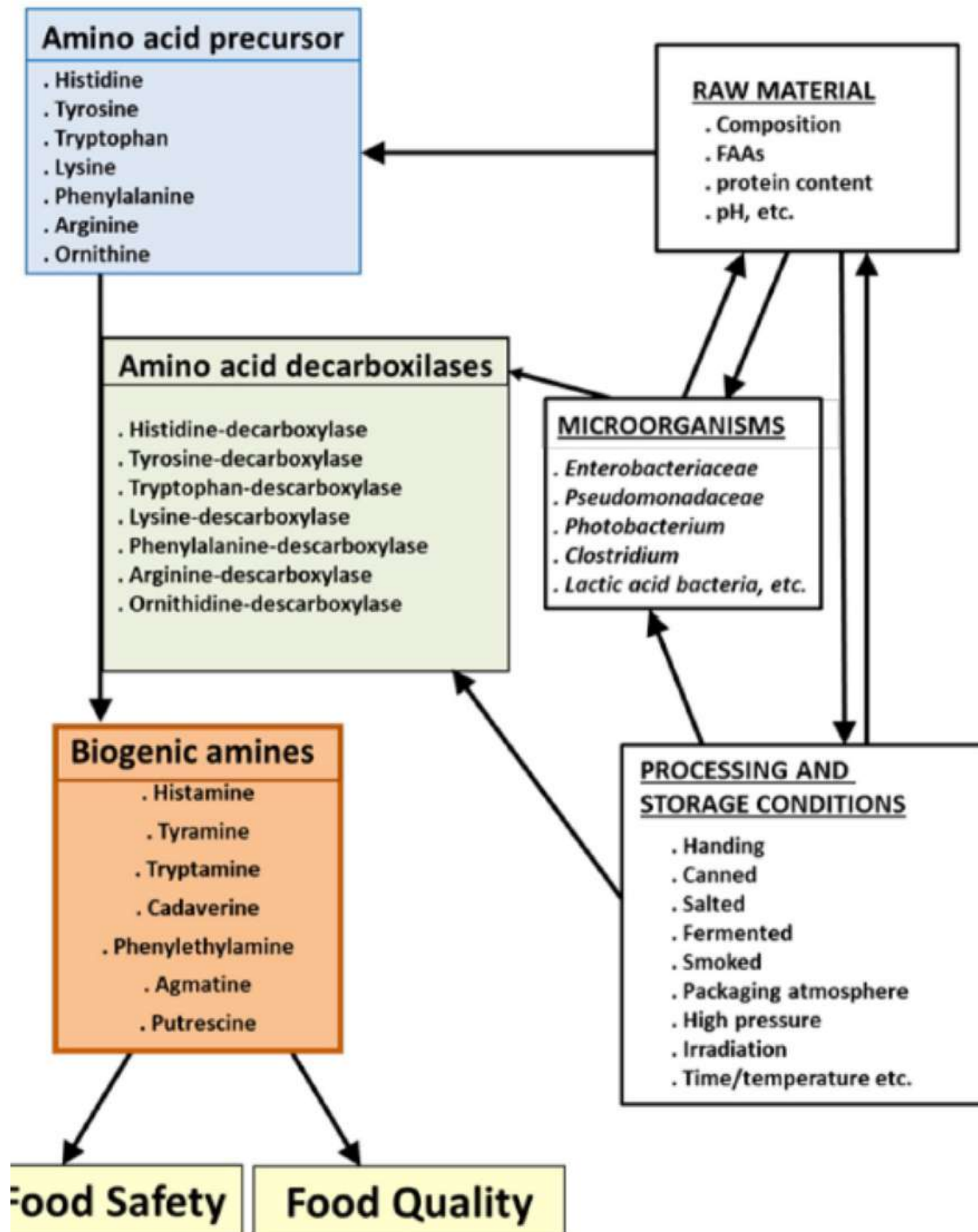
L'ingestione di ammine biogene in quantità eccessive può causare  
Mal di testa, palpitazioni cardiache, vomito e diarrea, shock anafilattico (istamina)

Fattori che Influenzano la presenza e la quantità di ammine biogene

Quantità del Precursore

Gli enzimi decarbossilasici possono catalizzare la reazione anche dopo la morte e la lisi cellulare dei LAB

Tempo di Conservazione/Stagionatura: È più probabile ritrovare ammine biogene in alimenti lungamente stagionati o conservati, poiché c'è più tempo per la degradazione del precursore e per l'azione degli enzimi liberi.





## Antibiotico resistenza

Capacità di alcuni batteri di sopravvivere e moltiplicarsi in presenza di antibiotici (fenotipo)

La resistenza agli antibiotici può variare da ceppo a ceppo all'interno della medesima specie  
Le determinati genetiche della resistenza, possono essere contenuti in plasmidi: DNA extra-cromosomico che può essere scambiato tra cellule batteriche

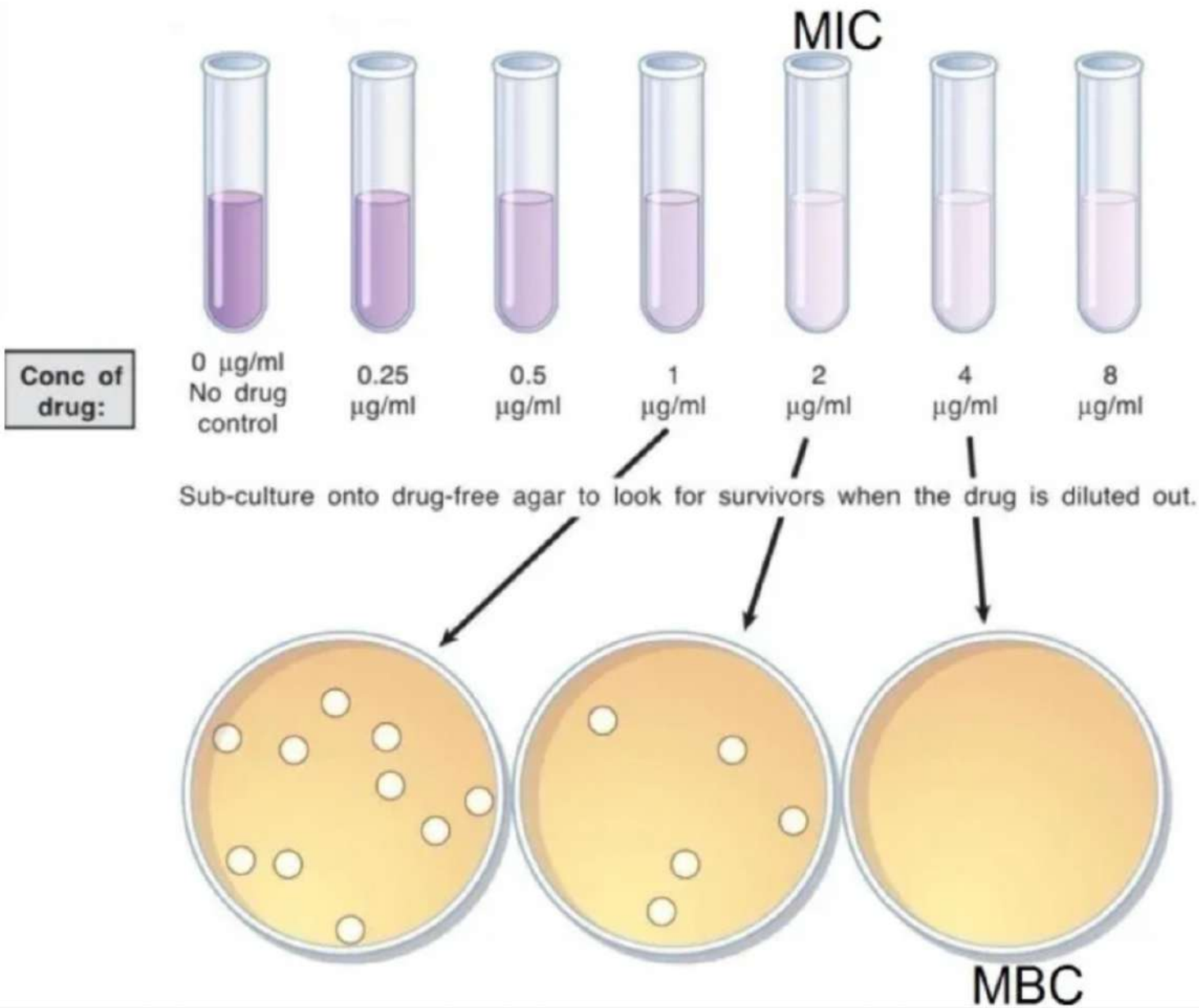
Si valuta:

1. Suscettibilità (Test di Kirby-Bauer)
2. La concentrazione inibente minima (*Minimal Inhibitory Concentration*; MIC) con metodo per diluizione
3. La concentrazione battericida minima (*Minimal Bactericidal Concentration*; MBC) a seguito del metodo per diluizione

## **Prima analisi: verificare la suscettibilità agli antibiotici con Antibiogramma o test di Kirby-Bauer:**

1. Seminare con tampone sterile un ceppo su una piastra
2. Aggiungere sul terreno dei dischetti sterili imbevuti di antibiotico
3. Incubare a tempi e temperature ottimali per il ceppo batterico
4. Valutare la formazione di aloni di inibizione intorno a ciascun dischetto





**MIC:** definita come la concentrazione (mg/L) di un antibiotico che inibisce visivamente la crescita *in vitro* di un microorganismo

**MBC:** la concentrazione di antibiotico che uccide il microorganismo; valutabile con semina ed incubazione su terreno colturale privo di antibiotico, a seguito del metodo per diluizione

**Table 1.** Bacterial cut-off values (mg/L)

	ampicillin	vancomycin	gentamicin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative <sup>a</sup>	1	2 <sup>b</sup>	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative <sup>c</sup>	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei /paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4
<i>Bacillus spp</i>	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
Other Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2

n.r. not required.

<sup>a</sup> including *L. delbrueckii*, *L. helveticus*

<sup>b</sup> not required for *L. salivarius*

<sup>c</sup> including *L. fermentum*