

Batteri Sporigeni, Lieviti e funghi filamentosi

I batteri sporigeni

La resistenza straordinaria delle spore deriva dalla loro architettura multistrato, unica tra gli organismi viventi. E' un fenomeno strutturale, non biochimico.

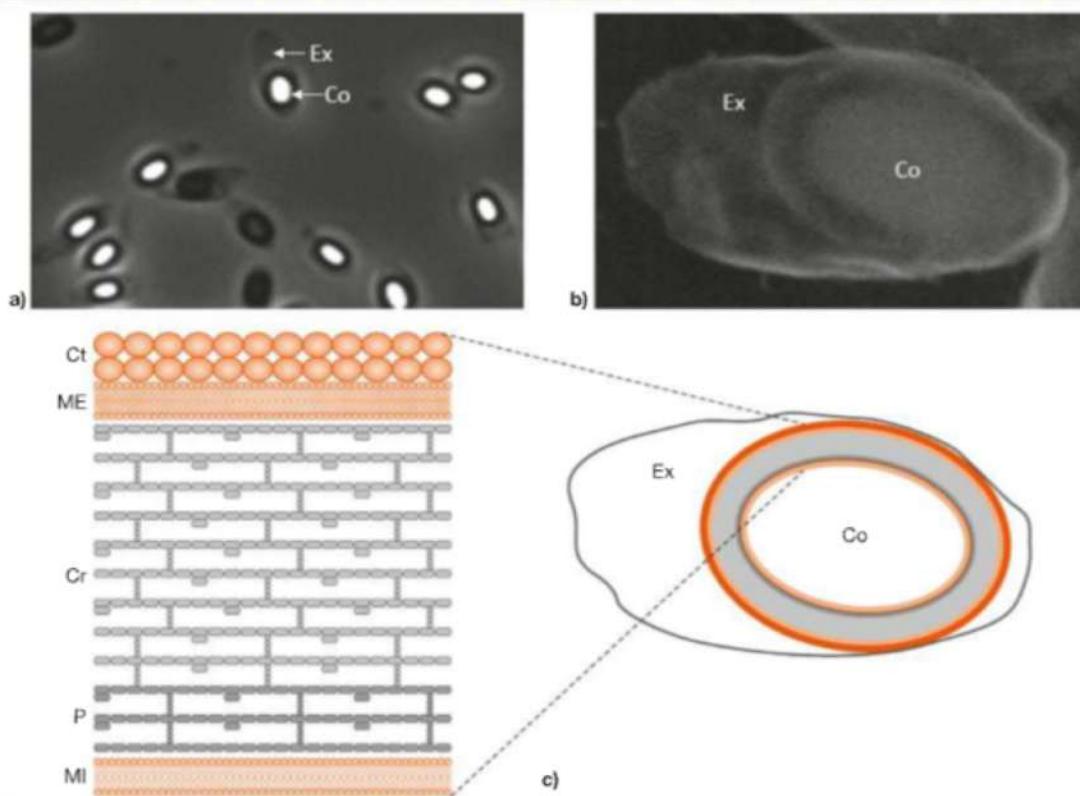


Figura 9.1 Endospora di *Bacillus* e *Clostridium*. a) Osservazione al microscopio ottico a contrasto di fase. Il core delle spore appare rifrangente (Co) ed è visibile l'esosporio (Ex). b) Spora osservata al microscopio elettronico a scansione. Sono evidenti il core (Co) con il citoplasma ricco di calcio dipicolinato, la struttura a strati della parete e l'esosporio (Ex). c) Rappresentazione schematica della parete delle spore. MI: membrana interna; P: peptidoglycano derivato dalla cellula madre; Cr: cortex, uno strato di peptidoglycano modificato, dove circa il 50% delle catene di acido N-acetil muramico sono state convertite in anelli muramici delta lattamici; ME: membrana esterna; Ct: coat proteico; Ex: esosporio. Modificata da Williamson et al., *BMC Genomics* (2016) 17:180 <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-016-2502-z>.

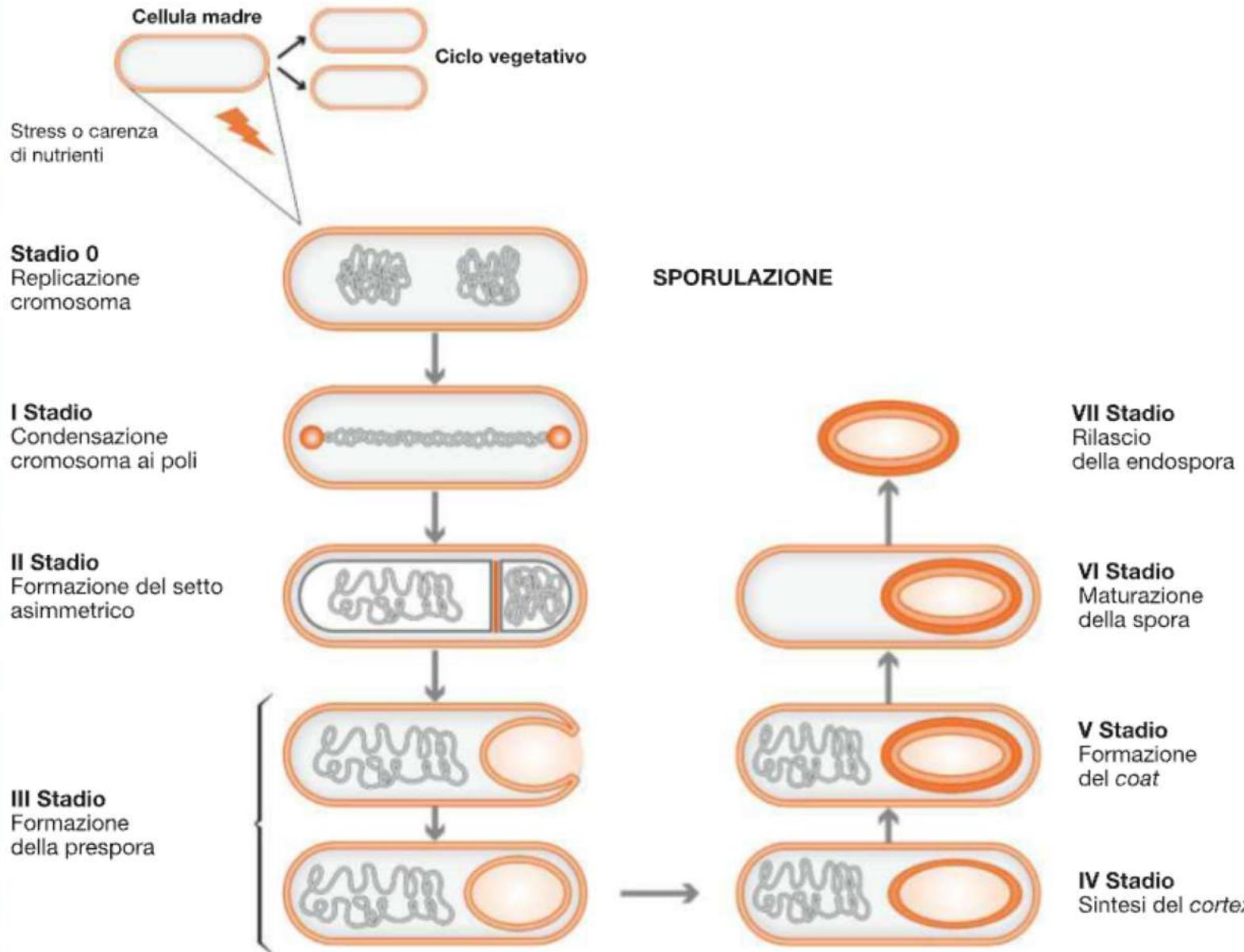
Fattori principali di resistenza

Coat proteico

Basso contenuto d'acqua del core

Alti livelli di Ca-dipicolinato (CaDPA) → stabilizza la struttura, contribuisce alla resistenza al calore

Presenza di cationi divalenti (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+})



Sporulazione: come si forma una spora?

- scarsità di nutrienti
- segnali di quorum sensing

I valori di pH e temperatura sono in genere gli stessi della crescita.

Germinazione: come “si sveglia” la spora?

La spora resta dormiente ma “sente” l’ambiente alla ricerca di germinanti:

- amminoacidi specifici
- zuccheri
- nucleotidi purinici
- combinazioni nutrienti-segnale

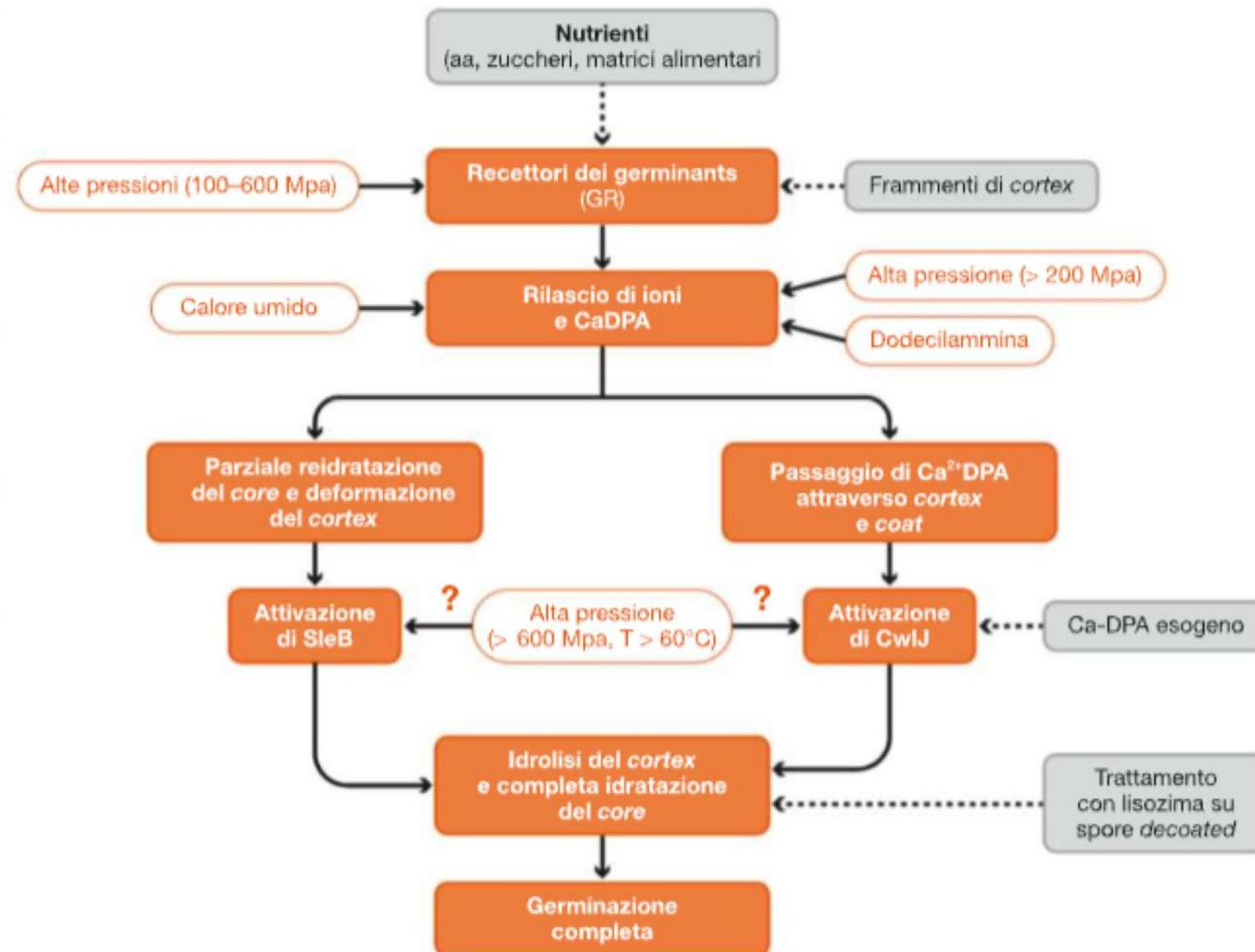


Figura 9.4 Stimoli e possibili *pathway* del processo di germinazione in spore di *Bacillus subtilis*; in grigio tratteggiato sono evidenziati gli stimoli che portano alla germinazione, mentre in rosso su fondo bianco sono mostrati gli stimoli che portano alla germinazione ma anche a una possibile inattivazione del processo con conseguente entrata in stato di superdormienza.

Spore Superdormant (SD):

Sono spore che non germinano o germinano con estremo ritardo, anche dopo l'applicazione di stimoli intensi che sarebbero sufficienti a innescare la germinazione nella maggior parte della popolazione.

Richiedono una quantità maggiore di *germinants* (amminoacidi, zuccheri) o condizioni ambientali differenti per attivarsi.

Rischio per sicurezza alimentare e shelf-life

Possono rimanere latenti per mesi o anni.

Possono germinare tardivamente nel prodotto → alterazioni, deterioramento, produzione di gas, tossine.

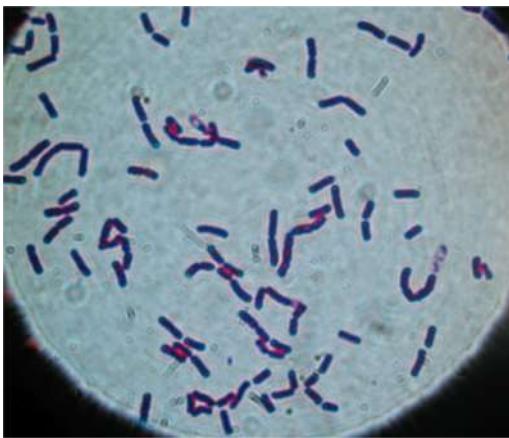
• Rischio soprattutto in:

- prodotti a lunga shelf-life (UHT, polveri, conserve)
- alimenti refrigerati dove le spore germinano lentamente.

sporigeni

Bacillus

Aerobi facoltativi



Metabolismo: Respirazione (O_2); Respirazione Anaerobica: (riducendo i nitrati a nitriti); fermentazione

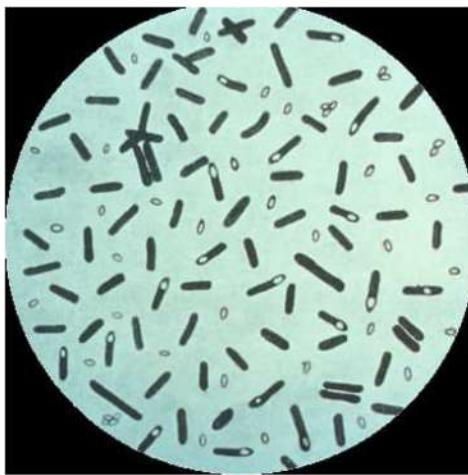
Enzimi Extracellulari: Producono comunemente proteasi, lipasi e amilasi.

Bacillus cereus è un patogeno e alterante alimentare con metabolismo aerobio facoltativo. Le sue amilasi e lipasi portano al deterioramento del riso e dei prodotti lattiero-caseari, anche se confezionati sottovuoto o in atmosfera modificata, poiché può passare alla fermentazione.

sporigeni

Clostridium

anaerobi obbligati



Metabolismo Saccarolitico (Fermentazione degli Zuccheri) > Butirrato, Acetato e H₂

Metabolismo Proteolitico (Via di Stickland) > butirrato, isobutirrato, isovalerato e mercaptani.

Agenti di Alterazione negli Alimenti

I batteri sporigeni rappresentano una sfida nella stabilità degli alimenti processati, specialmente quelli sottoposti a trattamenti termici.

Bacillales (*Bacillus, Geobacillus, Alicyclobacillus*)

Clostridiales (*Clostridium, Desulfutomaculum*)

Thermoanaerobacterales

I più resistenti sono spesso termofili isolati da alimenti in scatola a bassa acidità (es. *Geobacillus*).

Meccanismo del deterioramento

Il danno è causato da:

- germinazione delle spore
- esocrescita (moltiplicazione delle cellule vegetative)

modifiche di consistenza

variazioni di pH

produzione di gas (CO_2 , H_2)

odori e aromi sgradevoli

La natura del difetto dipende dalla matrice alimentare e dalla specie microbica.

Alimento / Categoria	Batteri coinvolti	Difetti principali	Tecniche di controllo / rimozione
Prodotti da forno (pane, panificati)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>B. amyloliquefaciens</i>	Alterazioni aromatiche/strutturali	pH
Latte UHT / latte in polvere	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. sporothermodurans</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i>	Proteolisi, amaro	rimozione dei biofilm. insilamento. Uso di colture protettive.
Succhi di frutta / bevande acide (pH < 4,6)	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i> , <i>A. pomorum</i>	Off-flavours	Trattamenti termici e fisici
prodotti moderatamente acidi (pH 3,8–4,5)	<i>Bacillus coagulans</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Clostridium spp.</i>	Gas, Acidificazioni anomale, Off-flavours organici	pH (< 4,2) Sanificazione attrezzature
Prodotti in scatola a bassa acidità (pH > 4,6)	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>C. sporogenes</i> , <i>C. putrefaciens</i> , <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Rigonfiamenti, proteolisi, Gas e rottura contenitori	• Sterilizzazione, HPP, PEF)
sporogeni			

Nuove Tecniche di Inattivazione e Controllo

- "Germinazione-Inattivazione": Uso di *germinants* per attivare la spore, seguita da un trattamento blando.
- Campi Elettrici Pulsati (PEF): per danneggiare le membrane cellulari.
- Alte Pressioni Idrostatiche (HHP)
- Ultrasuoni e Microonde: con il calore o sanificanti

Lieviti

Cellule singole oppure catene o filamenti (pseudoife).

Ubiquitari

ruoli positivi (fermentazioni) ma anche contaminanti

Saccharomyces, Candida,
Brettanomyces/Dekkera, Pichia,
Debaryomyces, Kluyveromyces,
Zygosaccharomyces.

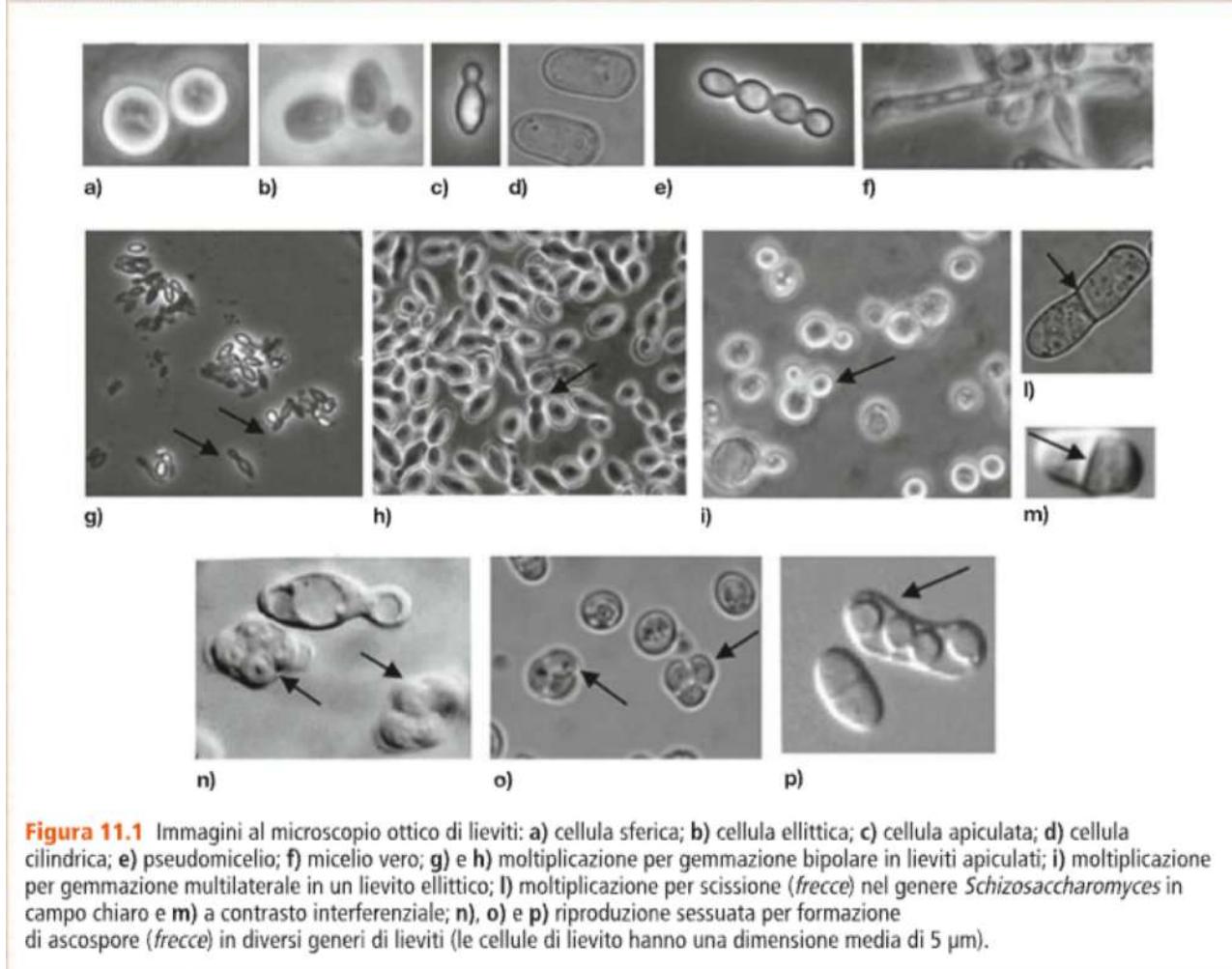


Figura 11.1 Immagini al microscopio ottico di lieviti: a) cellula sferica; b) cellula ellittica; c) cellula apiculata; d) cellula cilindrica; e) pseudomicelio; f) micelio vero; g) e h) moltiplicazione per gemmazione bipolare in lieviti apiculati; i) moltiplicazione per gemmazione multilaterale in un lievito ellittico; l) moltiplicazione per scissione (frecce) nel genere *Schizosaccharomyces* in campo chiaro e m) a contrasto interferenziale; n), o) e p) riproduzione sessuata per formazione di ascospore (frecce) in diversi generi di lieviti (le cellule di lievito hanno una dimensione media di 5 µm).

Metabolismo

- Anaerobi facoltativi
- Fermentazione degli zuccheri → **etanolo + CO₂**
- Respirazione aerobica → H₂O + CO₂
- Alcuni resistono ad alte concentrazioni di:
 - zuccheri (osmotolleranza)
 - sale
 - acidi
 - solfiti

Fattore

Ossigeno

pH

Temperatura

aw

Intervalli/Valori tipici

Aerobi obbligati e anaerobi facoltativi.

Ottimale: 5. Range: 3–8.

Attivi: 10–35 °C.
Inattivazione: 60–65 °C

aw 0,65–0,95

Meccanismi di adattamento

Uso alternato di respirazione e fermentazione.

Attivazione pompa protonica per espellere H⁺.

↑ acidi grassi insaturi, ↑ ergosterolo, proteine da stress, ↑ trealosio.

Accumulo di soluti compatibili (glicerolo).

Interazioni microbiche

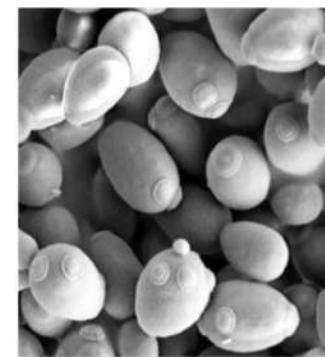
tossine per eliminare altri lieviti,
etanolo che inibisce batteri,
QS che regolano la crescita della colonia.

Numero specie: 1500 ufficiali, aggiornamento recente ~2300 specie (database theyeast.org).

Tabella 11.1 Classificazione dei lieviti di interesse alimentare.

Phylum	Subphylum	Classe	Ordine	Famiglia
Ascomycota	Saccharomycotina	Saccharomycetes	Saccharomycetales	Saccharomycetaceae Saccharomycodaceae Debaryomycetaceae Metschnikowiaceae Phaffomycetaceae Pichiaceae Dipodascaceae
	Taphrinomycotina	Schizosaccharomycetes	Schizosaccharomycetales	Schizosaccharomycetaceae
Basidiomycota	Pucciniomycotina	Microbotryomycetes	Sporidiobolales	Sporidiobolaceae
		Tremellomycetes	Cystofilobasidiales	Mrakiaceae

Lieviti d'interesse tecnologico



Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae utilizza zuccheri semplici presenti negli alimenti per produrre etanolo e anidride carbonica.

Vino: fermenta il glucosio presente nel mosto (~200 g/L).

Birra: sfrutta enzimi endogeni per liberare zuccheri semplici durante la maltazione e la germinazione dell'orzo.

Altri *Saccharomyces* d'interesse tecnologico:

S. pastorianus (precedentemente *S. carlsbergensis*) → birra Lager

S. bayanus → vino e sidro

Generi	Specie	Caratteristiche principali
<i>Torulaspora</i>	<i>T. delbrueckii</i>	Produzione vino e impasti dolci
<i>Kluyveromyces</i>	<i>K. lactis, K. marxianus</i>	Prodotti lattiero-caseari
<i>Hanseniaspora</i>	<i>H. uvarum, H. guilliermondii</i>	produzione composti volatili; aroma
<i>Debaryomyces</i>	<i>D. hansenii</i>	Lattiero-caseari, prodotti carne
<i>Pichia</i>	<i>P. membranifaciens, P. fermentans</i>	Alterazioni vino e frutta
<i>Brettanomyces</i>	<i>B. bruxellensis, B. anomalus</i>	Fenoli volatili; birre Lambic; alterazioni vino e latticini
<i>Yarrowia</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Latticini, prodotti carne; proteasi/lipasi
<i>Starmerella</i>	<i>S. bacillaris (C. zemplinina)</i>	Co-coltura con <i>S. cerevisiae</i> ; fermentazioni spontanee
lieviti		

Alimento**Generi/Specie principali****Ruolo****Note/Caratteristiche**

Kefir

Kluyveromyces lactis, K. marxianus, Torulaspora, Candida, Pichia,

Tecnologico

Fermentano lattosio in etanolo e CO₂. *K. marxianus* anche probiotico con attività antinfiammatoria

Formaggi molli/semi-molli

Debaryomyces hansenii, K. marxianus, K. lactis, S. cerevisiae, Yarrowia lipolytica,

Tecnologico / Alterante

Fermentazione lattosio/galattosio, attività proteolitica/lipolitica, formazione aromi. Possibili difetti: gonfiore precoce

Alimento	Generi/Specie principali	Ruolo	Note/Caratteristiche
Carni fresche	<i>Candida</i> , <i>Debaryomyces</i>	Alterante	Proteolisi, lipolisi
Carni stagionate/salate	<i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> ,	Tecnologico / Alterante	<i>D. hansenii</i> ; protegge dall'ossidazione, attività lipolitica per aroma, disacidificazione tramite degradazione acido lattico

Muffe e funghi filamentosi

Muffe e funghi filamentosi: Caratteristiche Fondamentali

- Eucarioti: Hanno una struttura cellulare complessa.
- Eterotrofi: si nutrono secernendo enzimi e assorbendo le molecole organiche degradate.
- Organizzazione: Mancano di veri tessuti e organi (sono principalmente unicellulari o formano strutture filamentose come le ife).

Caratteristica

Ubiquità

Colonizzano tutte le matrici ambientali: suolo, acqua e aria.

Biodiversità

Stima attuale: > 144.000 specie classificate.

Successo Evolutivo

varietà di nicchie ecologiche occupate e capacità di sopravvivere in condizioni restrittive

Possono essere sia **alteranti** che **pro-tecnologici**



Botrytis cinerea
(parassita uve e pro-
tecnologico in vini
passiti)

Penicillium spp.

Fermentazione

Beneficio

Produzione di formaggi (*Penicillium*), vegetali fermentati

Contaminazione

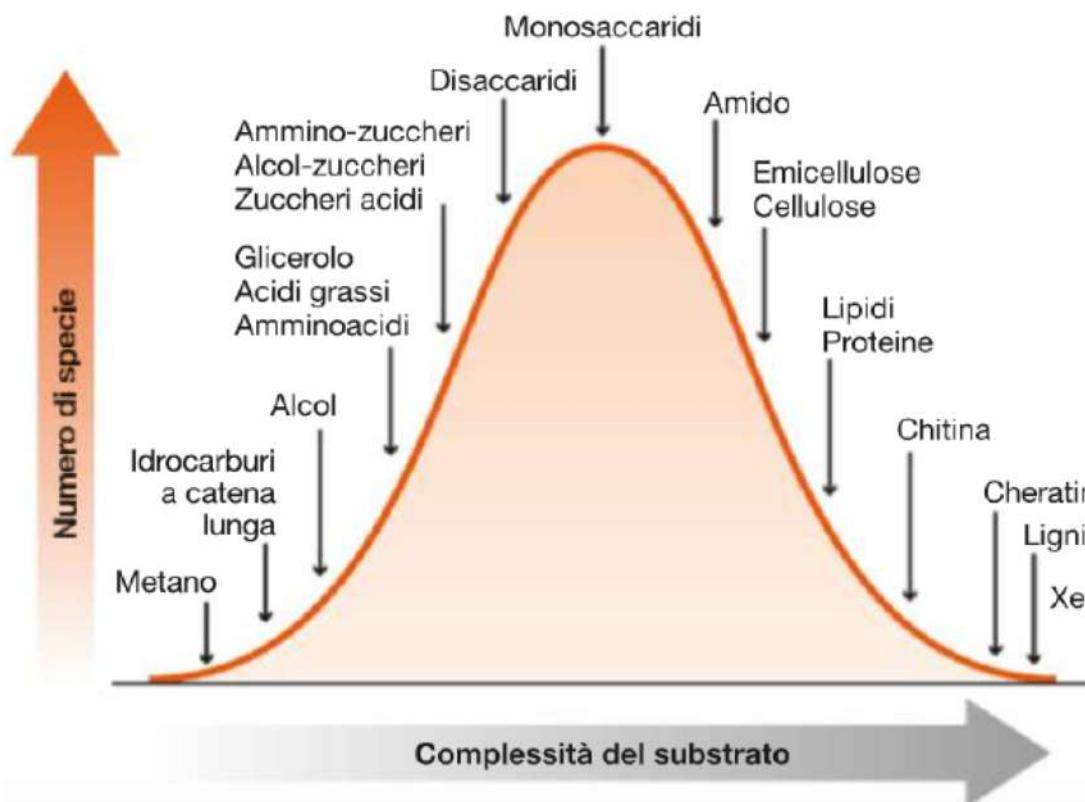
Danno

Muffe su vegetali, micotossine, deterioramento di prodotti dolciari ad alto zucchero

Bioteecnologia

Beneficio

utilizzati per degradare plastica, trattamento acque reflue, produzione enzimi e farmaci



- Utilizzo principalmente di glucosio (glicolisi, Krebs, Fosforilazione ossidativa)
- **Richiedono grandi quantità di azoto per la crescita (metabolismo dell'azoto molto flessibile)**
- **Assimilano facilmente amminoacidi**
- Capacità di degradare fonti di carbonio **molto complesse**

Categoria	Caratteristiche	alimenti	funghi
Xerofili / Osmofili	bassa <i>aw</i>	Cereali, frutta secca, dolciumi	<i>Xeromyces, Wallemia, Bettsia</i>
Termoresistenti	Resistono a cottura / pasteurizzazione	Prodotti da forno, conserve	<i>Paecilomyces variotii, Aspergillus spp.</i>
Psicrofili/ Psicotolleranti	Crescono a basse temperature	Frutta, verdura, formaggi refrigerati	<i>Penicillium, Cladosporium, Mucor</i>
Resistenti ai conservanti	Sorbiti, benzoati	Dolci, succhi, conserve	<i>Penicillium roqueforti, Paecilomyces</i>
Microaerofili/ Anaerobi	Prodotti confezionati in atmosfera protettiva	Salumi, prodotti sottovuoto	<i>Penicillium, Paecilomyces</i>

Funghi produttori di micotossine

Micotossine: metaboliti secondari di funghi filamentosi, termoresistenti, inodori e insapori, peso <1500 Da.

Origini della contaminazione:

- Deterioramento del prodotto da funghi
- Materie prime già contaminate
- Stagionatura di alimenti con funghi produttori
- Mangimi contaminati → passaggio al latte e carne (es. aflatossina M1)

Aspergillus, Penicillium, Stachybotrys, Alternaria, Fusarium

Effetti sulla salute: intossicazioni croniche, cancro, danni a fegato, reni e sistema immunitario

Tabella 12.4 Principali micotossine, matrici alimentari suscettibili e specie fungine produttrici.

Micotossina	Matrice alimentare	Principali produttori
Aflatossina M1	Latte e prodotti derivati	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i>
Aflatossine B1, B2, G1, G2	Frutta secca ed essicidata, frutta con guscio, cereali, spezie	<i>Aspergillus arachidicola</i> , <i>A. flavus</i> , <i>A. nomiae</i> , <i>A. parasiticus</i>
Citrinina	Integratori a base di riso rosso fermentato, insilati	<i>Monascus ruber</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. verrucosum</i>
Deossinivalenolo (DON)	Cereali e prodotti derivati (pane, pasta, prodotti da forno ecc.)	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. cerealis</i> , <i>F. culmorum</i>
Fumonisina B1 e B2	Mais e prodotti trasformati	<i>A. niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. subglutinans</i> , <i>F. verticilloides</i>
Ocratossina A	Cereali, uva secca, vino, caffè, spezie	<i>Aspergillus carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> , <i>A. steynii</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>Penicillium nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i> , <i>Petromyces alliaceus</i>
Patulina	Succhi e purea di frutta, sidro e bevande fermentate derivate dalle mele	<i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Byssochlamys nivea</i> , <i>Penicillium carneum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i> , <i>P. paneum</i> , <i>P. sclerotigenum</i>
Zearalenone	Cereali e prodotti trasformati	<i>F. cerealis</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. equiseti</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. incarnatum</i>

Utilizzo industriale dei funghi filamentosi

Formaggi erborinati (Blue cheese):

- *Penicillium roqueforti*
- Attività proteolitica e lipolitica
- Gradiente di pH e CO₂ controlla crescita e maturazione

Salumi stagionati:

- *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum*, *P. olsonii*
- Biofilm protettivo, regolazione evaporazione e ossidazione
- Fattori conservativi: basso pH e attività acqua ridotta

Metabolita

Enzimi

Vitamine

Pigmenti

Aromi

Funzione / Uso

Produzione formaggi,
chiarificazione vini, idrolisi
carboidrati e proteine

Produzione industriale

Coloranti alimentari

Vanillina, benzaldeide,
chetoni fruttati

Esempi di specie

A. niger, A. oryzae,
Trichoderma, R. oryzae

Riboflavina: *Eremothecium gossypii*, β-carotene:
Blakeslea trispora

Monascus spp.
(arancioni/rossi), *Penicillium oxalicum* (antrachinoni)

A. niger, P. cinnabarinus,
Bjerkandera adusta, Nidula niveotomentosa