



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di
AGRONOMIA ANIMALI ALIMENTI RISORSE
NATURALI E AMBIENTE

Corso di laurea triennale in Scienze e Tecnologie Alimentari

*Uso di colture protettive per il controllo microbiologico nel
settore lattiero-caseario*

Relatore
Prof. Alessio Giacomini

Laureando
Fausto Cortese
Matricola n.1201729

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

Riassunto – Abstract

1	La tecnologia di produzione del formaggio e della ricotta	7
2	Le fonti di contaminazione e i relativi agenti	13
2.1	Raccolta del latte	14
2.2	Biofilm negli impianti	16
2.3	Igiene nel lavoro	19
3	Le colture protettive	23
3.1	Descrizione	23
3.2	Metaboliti ad azione antimicrobica	25
3.3	Normativa	29
4	Casi studio	31
4.1	Inibizione di <i>Bacillus cereus</i> tramite <i>Enterococcus</i> sp. produttore di enterocina AS-48	31
4.2	Inibizione di <i>Clostridium tyrobutyricum</i> in formaggio tramite aggiunta di <i>Lactobacillus gasseri</i>	33
4.3	Utilizzo di batteri lattici per il controllo di <i>Penicillium commune</i> in ricotta	36
5	Conclusioni	39
6	Bibliografia	41

Riassunto

La sicurezza microbiologica in campo alimentare è di fondamentale importanza.

I prodotti alimentari devono rispettare condizioni igienico-sanitarie in modo tale da non compromettere e garantire la salute del consumatore. Il latte e i suoi derivati sono substrati favorevoli allo sviluppo dei microrganismi, perciò è necessario applicare dei metodi di controllo e di identificazione microbiologica per garantirne la trasformazione o il diretto utilizzo. Ciò non esclude l'attività preventiva per la gestione della qualità e l'assicurazione della stessa. Vi sono varie fonti di contaminazione microbica nella filiera lattiero-casearia, pertanto è opportuno conoscere le dinamiche di contaminazione che vi si presentano. Altrettanto importante è sapere quali sono i microrganismi coinvolti nel deterioramento in questo settore. Seguire le richieste del mercato adattando gli alimenti alle necessità dei consumatori è fondamentale per garantire una continuità lavorativa. Prodotti naturali senza o con una ridotta aggiunta di conservanti sono sempre più richiesti. I conservanti vengono impiegati sia per mantenere le caratteristiche organolettico-sensoriali del prodotto sia per il suo controllo microbiologico, ma si cerca di prediligere vie alternative. In particolare, in questo lavoro, si presenta una soluzione al controllo microbiologico attraverso l'utilizzo di colture – per appunto chiamate “protettive” – che mediano il progredire di muffe e batteri nei formaggi e latticini, causa di deterioramento dei prodotti alimentari e di patologie per l'uomo. Inoltre, al fine di valorizzare i sottoprodotti della lavorazione del formaggio, in primo luogo il siero, si è voluto presentare l'utilizzo di queste colture batteriocinogeniche nel biocontrollo della ricotta. Queste colture protettive sono principalmente appartenenti al gruppo dei batteri lattici e producono delle sostanze chimiche quali acidi organici e altre sostanze ad azione antibiotica simile nei confronti di batteri antagonisti sia dal punto di vista tecnologico che salutistico. Per le industrie e le aziende operanti nel settore lattiero-caseario queste problematiche portano a ingenti perdite economiche e a rischi di carattere legale e penale.

Abstract

Microbiological safety in food is of paramount importance. Food products must comply with sanitary conditions in such a way that the health of the consumer is not compromised and guaranteed. Milk and its derivatives are favorable substrates for the development of microorganisms, so microbiological control and identification methods must be applied to ensure their processing or direct use. This does not exclude preventive activities for quality management and quality assurance. There are various sources of microbial contamination in the dairy supply chain, so it is appropriate to know the dynamics of contamination there. Equally important is to know which microorganisms are involved in spoilage in this sector. Following market demands by adapting foods to the needs of consumers is essential to ensure business continuity.

Natural products without or with reduced addition of preservatives are increasingly in demand. Preservatives are used both to maintain the organoleptic-sensory characteristics of the product and for its microbiological control, but alternative ways are being sought. In particular, in this paper, a solution to microbiological control is presented through the use of cultures - precisely called "protective" cultures - that mediate the progression of molds and bacteria in cheeses and dairy products, which are the cause of deterioration of food products and human disease. Furthermore, in order to enhance the value of cheese processing by-products, primarily whey, the use of these bacteriocinogenic cultures in the biocontrol of cottage cheese was presented.

These protective cultures are mainly belonging to the lactic acid bacteria group and produce chemicals such as organic acids and other substances with similar antibiotic action against antagonistic bacteria both from the technological and health point of view. For dairy industries and companies operating in the dairy sector, these issues lead to large economic losses and legal and criminal risks.

1 LA TECNOLOGIA DI PRODUZIONE DEL FORMAGGIO E DELLA RICOTTA

La denominazione merceologica di formaggio è destinata al prodotto caseario ottenuto dalla coagulazione acida o presamica del latte intero, parzialmente o totalmente scremato per coagulazione delle caseine e per l'utilizzo di fermenti e sale da cucina.

La ricotta, diversamente, non può essere considerata un vero e proprio formaggio, in quanto non è ottenuta dalla coagulazione proteica del latte, ma viene ricavata riscaldando, con o senza aggiunta di acidificanti, il siero residuo dalla lavorazione del formaggio.

Il latte è un liquido di colore biancastro, opalescente e di sapore dolciastro. Esso viene secreto dalle ghiandole mammarie delle femmine dei mammiferi.

Non tutti i tipi di latte sono conformi per la produzione di formaggio, in quanto la composizione chimica è molto variabile in base alla razza, all'età dell'animale, alla stagione, al periodo di lattazione, alle malattie e alla genetica dell'animale.

Durante la raccolta e il trasporto verso il caseificio, il latte deve mantenere una temperatura controllata inferiore ai 6°C, necessaria per bloccare e limitare lo sviluppo microbico, così da garantire il suo impiego ottimale nelle successive fasi di trasformazione.

Il latte crudo deve rispettare dei requisiti sanitari. Il regolamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio sancisce i criteri microbiologici da osservare quali la carica batterica totale (CBT) e il contenuto di cellule somatiche (CS), i quali devono essere rispettivamente inferiori o uguali a 100.000 UFC/ml e 400.000 cell/ml (latte bovino crudo).

Non può essere riscontrabile la presenza di antibiotici e inibenti nel latte. Il regolamento (CE) 2073/2005 della Commissione impone il rispetto dei criteri microbiologici nei confronti di *Escherichia coli* e degli stafilococchi coagulasi positivi.

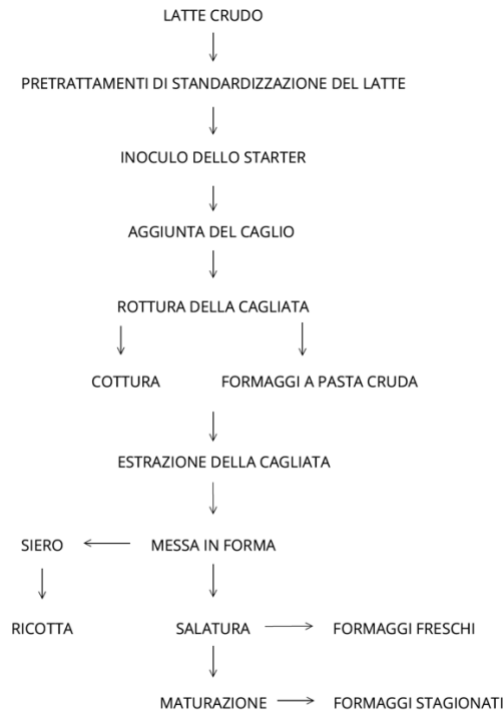


Figura 1.1 – Diagramma di flusso della produzione del formaggio

Come mostra la Figura 1.1, il latte viene sottoposto a dei pretrattamenti di standardizzazione: la correzione del tenore di grasso, il trattamento preliminare di termizzazione o pastorizzazione e l'aggiunta di conservanti alimentari conformano il latte per la sua trasformazione.

La correzione del tenore di grasso viene condotta mediante affioramento spontaneo della massa lipidica o tramite centrifugazione del latte. Le particelle di grasso possiedono densità inferiori a quelle degli altri costituenti, perciò tendono ad affiorare sovrastando la massa di latte sottostante.

La differenza tra le due tecniche consiste nella tempistica di lavoro, la quale viene ridotta attraverso l'impiego della pratica di centrifugazione.

I trattamenti termici che si applicano al latte sono necessari per la riduzione del contenuto di microrganismi (pastorizzazione) o per la selezione di ceppi funzionali alla lavorazione (termizzazione).

Tramite la pastorizzazione si contrasta lo sviluppo di batteri alteranti e deterioranti che causano non conformità durante la produzione e lo stoccaggio del formaggio.

Il processo di termizzazione, invece, permette di selezionare ceppi batterici presenti naturalmente nel latte, in base alle tempistiche e alle temperature di esercizio, che

conferiscono caratteristiche sensoriali tipiche della zona di lavorazione. Il profilo aromatico è condizionato dalla presenza di batteri non starter, quindi non intenzionalmente aggiunti tramite l'innesto, ma già presenti nel latte.

Il regolamento (CE) 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio dichiara che il latte è conforme alla trasformazione se, a fine trattamento termico, la carica batterica è inferiore a 100.000 UFC/ml.

Ulteriormente a queste pratiche, la direttiva 95/2/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio consente l'aggiunta di lisozima (E1105) nel latte per la produzione di formaggio a una concentrazione di "quanto basta".

Inoltre, al fine di conferire un migliore profilo aromatico, e quindi di ottenere un prodotto standardizzato e ripetibile nel tempo, viene aggiunto l'innesto.

È necessario che le condizioni ecologiche siano ottimali per lo sviluppo delle colture batteriche, pertanto regolare la temperatura risulta essenziale per il loro metabolismo. Le temperature adoperate sono funzionali alla capacità dei batteri scelti di svilupparsi ad uno certo *range* termico e si attestano tra i 20°C e i 50°C. Per quei formaggi che lo richiedono è possibile aggiungere un innesto fungino (Camembert, Gorgonzola).

I caseifici prediligono l'utilizzo di colture starter naturali o selezionate/commerciali.

Tipiche colture naturali sono il lattoinnesto termofilo, utilizzato tradizionalmente nella produzione di alcune mozzarelle e della crescenza, e il sieroinnesto, impiegato nella fabbricazione di importanti formaggi a pasta dura, come il Grana Padano e il Parmigiano Reggiano. Queste colture vengono preparate in azienda e la loro gestione dev'essere continuativa, così da garantirne il corretto utilizzo.

Le colture selezionate sono colture preparate con ceppi di batteri lattici isolati, caratterizzati e riprodotti da laboratori specializzati.

Gli starter commerciali sono disponibili sottoforma liquida, congelati o liofilizzati. Questi ultimi vengono privilegiati per praticità d'uso, per una migliore conservazione e riattivazione cellulare.

Le funzioni principali dello starter consistono nel portare il latte ad una corretta acidificazione e nel generare aromi e profumi che caratterizzano il formaggio. Le colture starter possiedono una certa azione inibente nei confronti di microrganismi antagonisti, in quanto sono in grado di prendere il sopravvento a causa del loro alto numero di inoculo. Il pH che si raggiunge in seguito all'operazione di aggiunta dell'innesto si attesta tra 6.0 e 6.5, il cui conseguimento di valore dipende dal tipo di formaggio.

Oltre allo starter possono essere aggiunte le colture protettive, le quali possiedono funzioni sinergiche nei confronti dello starter e hanno dei riscontri positivi durante le successive fasi produttive.

Il caglio, estratto dal quarto stomaco del vitello, del capretto o dell'agnello sotto forma di un liquido ricco in chimosina e successivamente purificato, costituisce il principale agente di coagulazione.

Il titolo del caglio è espresso dagli ml di latte coagulati da 1 ml o da 1 g di caglio, alla temperatura di 35°C in 40 minuti e nei formulati commerciali si attesta tra 1:10000 e 1:20000.

La Figura 1.2 evidenzia la struttura della micella caseinica. La K-caseina, costituente della micella, possiede una catena amminoacidica polare che conferisce alla struttura un certo grado di idrofilia. La chimosina idrolizza i legami peptidici presenti nella K-caseina a livello della catena polare.

Le micelle che si trovano in uno stato idrofilo passano a uno stato idrofobico grazie all'azione del caglio, si riuniscono tra loro, precipitano e determinano la formazione della cagliata. L'attività del caglio è pH dipendente e aumenta al diminuire delle condizioni di pH. L'attività acidificante dell'innesto influisce sulla resa in cagliata.

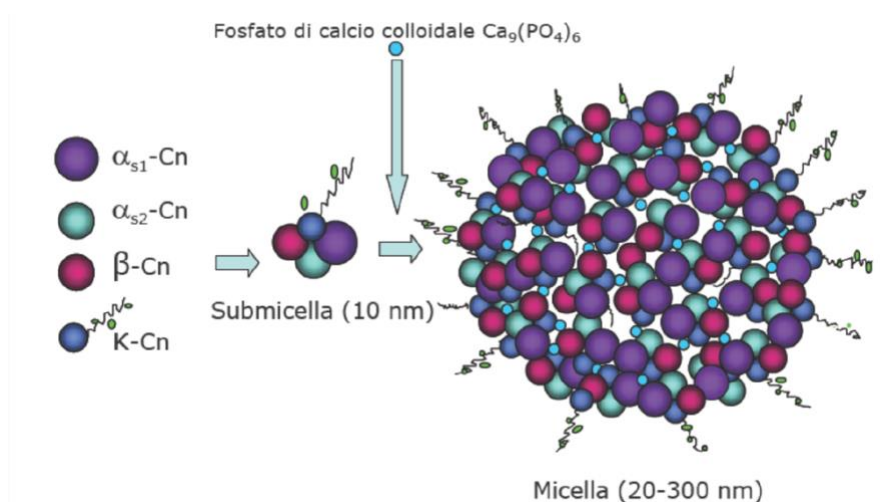


Figura 1.2 – Micella caseinica e relative subunità, Cn: caseina (Martin, 1999)

Sono necessari 30-40 minuti per far sì che il caglio espliciti totalmente la sua azione. La cagliata viene in seguito rotta in granuli di grandi dimensioni (diametro di una noce) per l'ottenimento di formaggi a pasta molle o in granuli di dimensioni inferiori (diametri di pisello o chicco di riso) per formaggi a pasta semidura e dura. A questo segue un periodo di sosta della cagliata, con l'obiettivo di consentire ai grani di depositarsi e separarsi efficacemente dal siero (fase iniziale di spurgo).

A seguito della fase di coagulazione e di taglio della cagliata, essa viene cotta o scaldata per espellere il siero (sineresi), durante il quale le temperature ricercate e adoperate si attestano intorno ai 45-55°C. Altri formaggi possono evitare l'operazione di cottura ottenendo formaggi a pasta cruda (Figura 1.1).

La cagliata viene quindi estratta e posta in fascere di legno, plastica o metallo. La massa spurga ancora il siero e viene favorita dall'esercitazione di una pressione sul piatto superiore. La salatura è un processo grazie al quale si rende più efficace la fase di spurgo del siero, al fine di migliorare il controllo microbiologico e di esaltare la sapidità del formaggio. Questo processo viene eseguito a secco, mediante lo sfregamento del cloruro di sodio (NaCl, sale da cucina) sulla superficie esterna del formaggio o in salamoia, modalità nella quale ci si serve di vasche di acqua con una concentrazione salina del 10-25%.

In alternativa è possibile inserire il sale direttamente nel latte o nella cagliata così da ottenere una migliore distribuzione salina all'interno della forma.

Infine, a seconda della destinazione, la forma viene posta a maturazione e stagionatura fino a quando non saranno raggiunte le caratteristiche organolettiche e sensoriali desiderate. Per i formaggi freschi, invece, questo ultimo *step* viene evitato e si procede con il *packaging* e la messa in commercio.

Per i formaggi stagionati, la maturazione avviene in magazzini a temperatura e umidità controllate. La regolazione della temperatura e dell'umidità permette di moderare la velocità delle reazioni enzimatiche, la crescita microbica e il contenuto di acqua del formaggio. Per i formaggi a lunga stagionatura si adottano temperature che si attestano tra 15-20°C e umidità relative del 70-80%.

A seconda del formaggio si verificano diversi sviluppi della curva della temperatura. In genere nel primo periodo di maturazione (circa due settimane) la temperatura viene mantenuta inferiore agli 8°C, al fine di evitare il sopravvento di microrganismi indesiderati, quali ad esempio i clostridi, causa di gonfiori precoci e anche tardivi. Con queste condizioni i ceppi selezionati sono in grado di svilupparsi.

Durante questo periodo di durata variabile (6-9 mesi, fino ai 40 mesi) avvengono diversi processi biochimici e metabolici come la glicolisi, la lipolisi e la proteolisi. La fase di stagionatura è caratterizzata dall'avvicendamento dei 3 processi, il cui rapporto determina le caratteristiche organolettiche e sensoriali del formaggio. A fine stagionatura il pH risulta diminuito ed è strettamente dipendente alla tipologia di formaggio (Grana Padano: 5-5.5).

La stagionatura può avvenire in ambienti naturali dove la microflora autoctona determina sapori e profumi caratteristici.

Il trasporto presso i punti vendita viene eseguito a temperatura controllata.

La resa del latte in formaggio si attesta intorno all'8%.

Lo scarto principale della lavorazione del formaggio è il siero. Come mostra la Figura 1.1, il siero può essere riutilizzato per la produzione di altri alimenti, come la ricotta.

La ricotta non è legalmente classificata come formaggio, ma come latticino. Il siero possiede proteine che non sono state coinvolte nel processo di coagulazione delle caseine durante la fase di cagliata del processo di produzione del formaggio. Esso possiede anche altre componenti come carboidrati, vitamine, sali minerali e qualche grasso. Per la produzione della ricotta è possibile utilizzare unicamente il siero o aggiungere un 5-10% del totale di latte scremato, parzialmente scremato o intero.

Come per il formaggio, la parte interessata alla creazione del prodotto caseario tramite utilizzo del siero sono le proteine. Le sieroproteine sono, in ordine di concentrazione, la β -lactoglobulina, l' α -lactoglobulina, le immunoglobuline, le albumine e la lactoferrina. Mediante riscaldamento del siero a 80-90°C esse coagulano grazie alla denaturazione dovuta alle alte temperature di esercizio.

Inizialmente il siero viene acidificato tramite inserimento dello starter che porta la massa a un pH di 5.6-6. Il siero viene sottoposto ad un processo di concentrazione (30% parte solida).

Le sieroproteine, al contrario delle caseine, affiorano. La combinazione del trattamento termico e dell'ambiente acido porta all'ottimizzazione della fase di coagulazione. La denaturazione proteica data dalle alte temperature espone maggiormente le cariche degli amminoacidi, i quali in ambiente acido si neutralizzano e interagiscono tra loro formando così la massa che costituirà la ricotta. Dopo un breve periodo di sosta sul siero, la massa solida viene allontanata con una schiumarola e viene posta in dei cestelli forati che permettono lo sgocciolamento. In seguito, viene data la forma che la caratterizza.

La ricotta è un prodotto caseario fresco, con un contenuto di acqua libera (a_w) maggiore di 0.955 e va conservato in condizioni di refrigerazione, anche durante il trasporto.

2 LE FONTI DI CONTAMINAZIONE E I RELATIVI AGENTI

Le matrici alimentari sono substrati favorevoli allo sviluppo microbico e, a seconda del contenuto di acqua libera (a_w) e delle condizioni di pH, diversi gruppi di microrganismi, quali batteri e muffe, possono danneggiarle.

Solitamente le muffe sono in grado di svilupparsi in condizioni di a_w inferiori rispetto a quelle dei batteri. Il latte e i suoi derivati presentano condizioni favorevoli per lo sviluppo microbico, dovute alla loro composizione chimica, la quale è a sua volta completa dal punto di vista nutrizionale, rendendo così possibile un *habitat* ottimale per lo sviluppo di svariati generi di microrganismi. Nel latte si possono riscontrare batteri lattici indigeni, batteri alteranti e deterioranti (e.g. *Pseudomonas*, *Clostridium*), batteri patogeni (e.g. *Listeria*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*) e funghi di cui alcuni produttori di micotossine.

Nella maggior parte dei casi vengono rilevati ceppi afferenti alle famiglie delle *Enterobacteriaceae*, delle *Streptococcaceae*, delle *Bacillaceae* e delle *Clostridiaceae*.

Nella filiera lattiero-casearia gli ambienti di lavorazione che si riscontrano sono tra i più diversi.

Muffe e lieviti sono microrganismi ubiquitari e possono contaminare il latte durante la sua raccolta, oppure possono contaminare il formaggio durante lo stoccaggio, sviluppandosi nel prodotto finito.

I microrganismi possono indurre patologie all'uomo o possono creare disagi, sia economici che tempistici, alle aziende che si occupano della produzione, della trasformazione e dell'immagazzinamento di questi prodotti.

È fondamentale, dunque, valutare e tenere in considerazione con costanza e professionalità le aree di lavoro e i comportamenti da adottare quando si entra in contatto con matrici deperibili.

Nella filiera lattiero-casearia le circostanze che possono compromettere la qualità del latte e del formaggio sono: le scarse precauzioni adottate durante la raccolta del latte in stalla; la mancata o ridotta igienizzazione degli impianti; la non corretta igiene del personale operante in zona bianca.

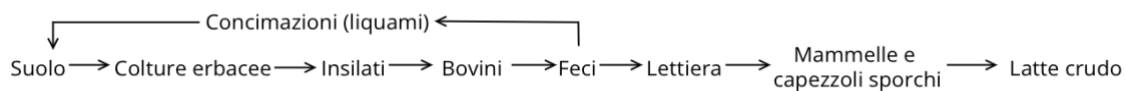
Ogni azienda è tenuta ad avvalersi di metodi e pratiche funzionali al contenimento di questi microrganismi.

2.1 Raccolta del latte

L'ambiente stalla presenta condizioni igieniche e di controllo microbiologico molto critiche. Gli animali vivono insieme e condividono lo spazio che hanno a disposizione. Per quanto siano presenti strumenti e impianti per la gestione del foraggio e lo smaltimento delle deiezioni, questo ambiente è, per sua stessa natura, sempre caratterizzato da un'alta contaminazione microbica.

La lettiera e il foraggio sono ricchi di microrganismi e sono il *reservoir* di molti batteri anti-caseari e patogeni.

La principale fonte di contaminazione è il suolo, il quale trasferisce al latte un alto corredo microbico mediante il raccolto. Come mostra la Figura 2.1 gli insilati, la lettiera e le feci contribuiscono significativamente alla contaminazione del latte se non vengono seguite le corrette pratiche di lavoro.



Figura

2.1 – Processo di contaminazione del latte

È necessario adottare degli accorgimenti onde evitare o ridurre la probabilità di riscontrare situazioni favorevoli alla contaminazione microbica del latte.

Di nota importanza è l'igienizzazione con soluzioni alcoliche, cloriche, con acido lattico o con clorexidina dei capezzoli della mammella di ogni bovina.

Tra i microrganismi prima evidenziati, quelli maggiormente riscontrati durante la raccolta del latte sono appartenenti alle specie *C. butyricum*, *C. sporogenes*, *C. beijerinckii* e *C. tyrobutyricum*.

Il genere *Clostridium* è classificato nella famiglia delle *Clostridiaceae*, ordine *Clostridiales*, classe *Clostridia* e phylum *Firmicutes*. Si tratta di batteri ubiquitari, quindi sono presenti dalle acque, al suolo, all'intestino umano. La loro struttura cellulare ci permette di identificarli come Gram-positivi. Essi sono in grado di differenziarsi in spora in condizioni ambientali sfavorevoli, ad esempio con trattamenti termici a elevate temperature o alla mancanza di nutrienti. Il suolo rappresenta un ottimo *habitat* per il loro sviluppo. Sono batteri anaerobi

obbligati, quindi si sviluppano sottoforma vegetativa in ambienti privi di ossigeno. Sono di forma bastoncellare e nella maggior parte presentano flagelli disposti in posizione peritrica. In questo grande gruppo vi afferiscono batteri che possono provocare patologie all'uomo, come problemi di carattere tecnologico e gestionale. Essi si sviluppano in condizioni di temperatura variabili a seconda della specie e possono essere psicrotrofi, mesofili e termofili.

Tra questi, il *Clostridium tyrobutyricum* determina il gonfiore tardivo nei formaggi sottoposti a stagionatura. Un progetto di genomica effettuato su forme di Grana Padano, sostenuto presso l'istituto di microbiologia dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, evidenzia come la presenza di *C. tyrobutyricum* nel formaggio sia direttamente correlata alla fornitura alimentare bovina di insilati e generi il difetto del gonfiore. Formaggi a pasta dura e semidura sono altamente suscettibili ai processi fermentativi alteranti dati da questa specie. Il gas generato è l'acido butirrico, un acido grasso volatile, il quale induce la formazione di occhiature di dimensioni diametrali eccessive e sapori sgradevoli. La produzione di idrogeno gassoso e anidride carbonica contribuisce al difetto del gonfiore. Le fermentazioni anomale determinano perdite di prodotto il quale deve intraprendere vie alternative rispetto al fine imposto (fusione, svendita, distruzione). Il danno per l'azienda è essenzialmente di carattere economico.

2.2 Biofilm negli impianti

I batteri sono in grado di generare delle sostanze esterne alla loro struttura cellulare. Il ristagno di batteri, indice di una non corretta pulizia e igiene, determina l'incrementarsi del biofilm.

Il biofilm è una comunità microbica adesa a una superficie solida, come una tubazione, grazie a una matrice che include sostanze polimeriche extracellulari di natura polissaccaridica (EPS), come mostra la Figura 2.2.

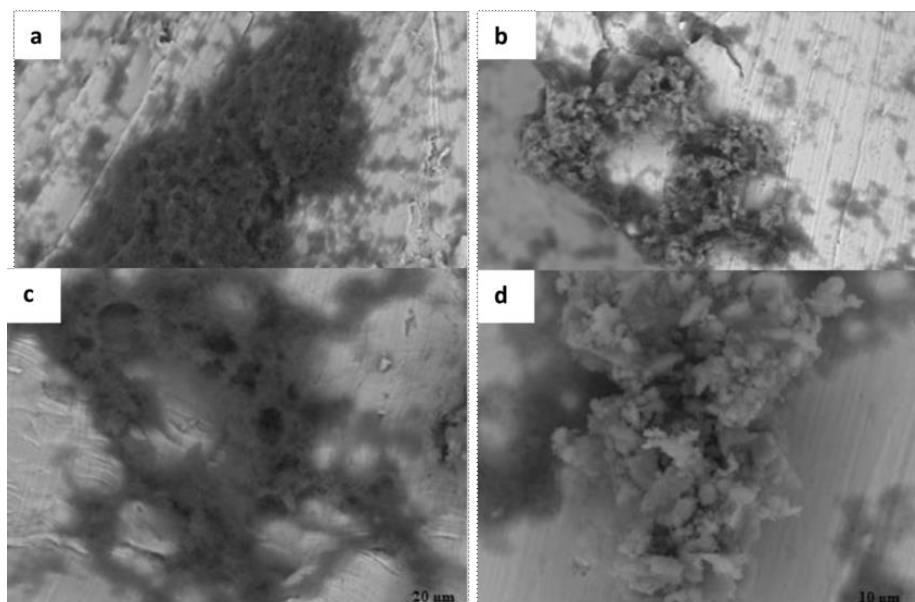


Figura 2.2 – Biofilm *in situ* su tubazioni in ambiente caseario (Malek F., 2016)

Il biofilm si comporta come uno scudo nei confronti degli igienizzanti, in quanto è costituito da cunicoli all'interno dei quali i batteri si annidano e proseguono il loro sviluppo e incremento, passando da uno stato planctonico a uno bentonico. Data la forma e la struttura di questi biofilm, il conferimento di nutrienti è garantito in modo continuo, grazie alla costante e continua funzionalità degli impianti.

La formazione di biofilm è agevolata dalle incomplete manovre di pulizia che si riscontrano in tubazioni e raccordi difficili da raggiungere.

I biofilm sono una fonte continua di contaminazione microbica nei vari processi che implicano l'utilizzo di macchine e trasferimento di latte all'interno di impianti.

Inoltre i biofilm generano problematiche legate a blocchi di tipo meccanico su attrezzature, riduzione della capacità di trasferire calore negli impianti e comportano la rottura di componenti metallici causanti l'aggravarsi del problema con il passare del tempo.

La produzione, da un punto di vista quantitativo di biofilm, dipende dal tipo di specie batterica. In ambiente caseario i batteri maggiormente riscontrati sono afferenti ai generi *Enterobacter*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* (Salo et al., 2006).

Tra questi, il genere *Bacillus* è di comune rilevanza data la sua ottima capacità di aderire a superfici. Esso è classificato nella famiglia delle *Bacillaceae*, ordine *Bacillales*, classe *Bacilli* e phylum *Firmicutes*.

Si tratta di microrganismi ubiquitari. La principale fonte di contaminazione del latte deriva dal suolo, con lo stesso meccanismo dei clostridi prima descritti. La Figura 2.3 è stata realizzata tramite microscopia elettronica a scansione e mostra la forma bacillare di questi microrganismi, nonché l'assenza di flagelli.

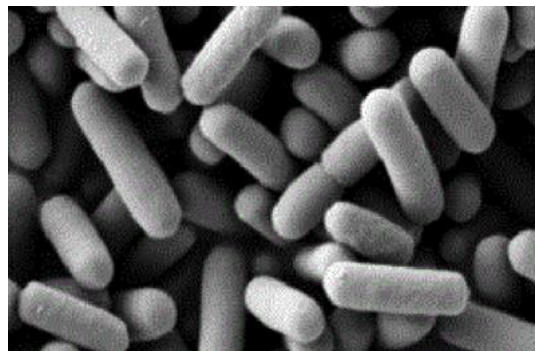


Figura 2.3 – *Bacillus cereus* (Jalil M. T. M. et al., 2020)

Si tratta di batteri Gram-positivi in grado di sporificare in condizioni avverse, mantenendo il loro potenziale contaminante per lunghi periodi. Essi sono anaerobi facoltativi, ma preferibilmente aerobi. Per l'appunto questi batteri sono capaci di detossificare l'ossigeno, in quanto sono catalasi positivi e sono poco competitivi, quindi una ridotta contaminazione della materia in fase di raccolta e una corretta gestione del latte con lo starter e le colture integrative annesse permettono una condizione di sicurezza durante la produzione e l'immagazzinamento del formaggio.

All'interno del genere *Bacillus* è presente il *Bacillus cereus*, un patogeno che in Europa, dal 2010 al 2012, ha causato numerosi *outbreaks* dovuti al consumo di prodotti lattiero-caseari (99 *outbreaks* nel 2010; 220 *outbreaks* nel 2011; 259 *outbreaks* nel 2012).

Il *B. cereus* è un patogeno mesofilo, si adatta a temperature di crescita tra i 15°C e i 50°C, con un *optimum* tra i 28°C e i 35°C. La dose infettante è di 10^5 - 10^7 cellule, ma già formaggi con 10^2 UFC/ml possono non essere sicuri.

La patologia indotta da questo batterio può essere un'intossicazione, dovuta alla tossina "cereulide" che viene prodotta nell'alimento, o può essere una tossinfezione, quindi dovuta dalla produzione della tossina previa ingestione e attecchimento del batterio nell'apparato gastro-intestinale, a livello di intestino tenue.

La prima genera la cosiddetta sindrome emetica, mentre la seconda la sindrome diarroica. Il *B. cereus* è un ottimo produttore di biofilm ed è molto abile nell'aderire a superfici e utensili comportando una nota difficoltà della sua rimozione. Nella filiera lattiero-casearia la formazione di biofilm batterici all'interno degli impianti di lavorazione è fonte di grande preoccupazione, in quanto i batteri al loro interno sono molto più difficili da eliminare rispetto a quelli presenti in uno stato planctonico. Gli impianti e strumenti che presentano biofilm sono una fonte continua di contaminazione, sia per gli impianti stessi sia per il latte che viene veicolato all'interno di essi. Il biofilm rende i suoi colonizzatori resistenti agli igienizzanti e agli agenti antimicrobici, agli antisettici e ai disinfettanti.

Come mostra la Figura 2.4 la produzione di biofilm è mediata da un comportamento di *quorum sensing* tra i partecipanti. Mantenere sotto controllo la contaminazione del latte, prima e dopo le varie operazioni unitarie, permette di comprendere se l'incremento microbico è dovuto alla materia prima latte o alla contaminazione dell'impianto.

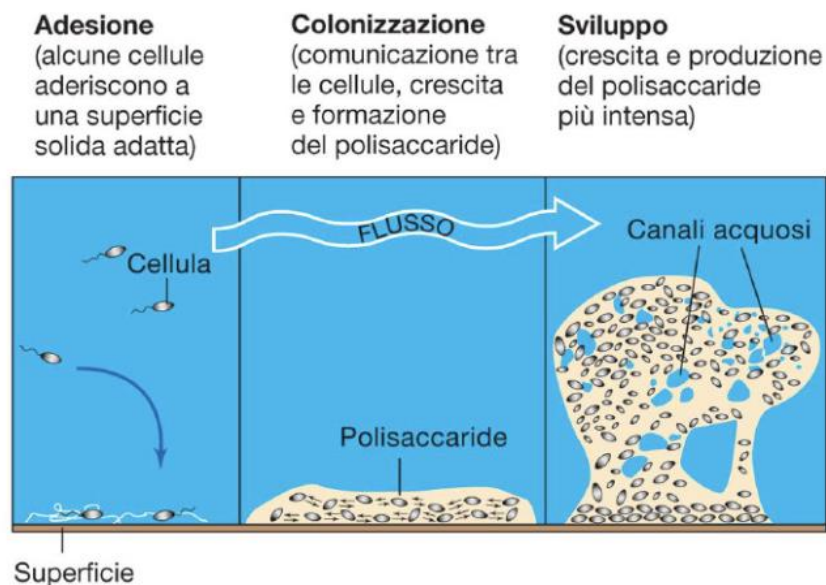


Figura 2.4 – Rappresentazione schematica del processo di formazione del biofilm batterico (<https://www.microbiologiaitalia.it/batteriologia/anche-i-batteri-parlano-tra-loro-attraverso-il-quorum-sensing/>)

2.3 Igiene nel lavoro

L'uomo è una fonte di contaminazione microbica. I microrganismi che potenzialmente possono contaminare l'ambiente di lavoro e il prodotto vivono principalmente sulla cute, sui capelli e nel cavo orale dell'uomo. Di fondamentale importanza è il rispetto delle buone pratiche di igiene e delle buone prassi di lavoro (GHP e GMP). L'utilizzo di DPI è preliminare all'accesso alle zone bianche di produzione del caseificio e tutti gli operatori devono prestare molta attenzione alle modalità di lavoro.

Viste le molteplici azioni da effettuare manualmente durante la produzione casearia, è obbligatorio pulirsi mani e braccia con sapone e acqua calda prima dell'accesso alle aree produttive. Asciugare accuratamente le mani con carta monouso, indossare abiti puliti e prepararsi negli appositi spazi prima di accedere in zone a rischio di contaminazione, anche in sala mungitura.

Tutte queste azioni preventive sono riportate nel manuale HACCP di ogni azienda e ogni operatore è tenuto a esserne informato e a visionarle a ogni aggiornamento.

Oltre a porre attenzione nella corretta prevenzione della contaminazione mediata dal personale o da chi è presente in azienda, è necessario che nel sistema HACCP si tengano in considerazione le contaminazioni mediate da insetti e aria. L'ambiente di lavorazione

dev'essere conforme per il mantenimento di condizioni igienico-sanitarie atte alla riduzione e al controllo dei germi. Il ricircolo dell'aria procede da zone pulite a zone sporche, così da evitare contaminazioni tramite masse d'aria. Gli insetti presentano sull'esoscheletro e nelle ghiandole salivari, a volte, agenti microbici; pertanto, è opportuno predisporre dei sistemi di protezione dei vari ambienti lavorativi per il contenimento esterno degli insetti.

Le contaminazioni spesso sono mediate da microrganismi di origine fungina.

Il genere *Penicillium* è quello più rappresentativo (Pitt e Hocking, 1999), infatti si tratta di uno tra i generi fungini più diffusi in natura e le sue molte specie riescono a svilupparsi negli *habitat* più diversi. Considerate nel loro complesso ubiquitarie, queste specie generalmente si comportano in modo saprofitario.

La tassonomia è piuttosto difficoltosa da determinare, a causa della notevole variabilità morfologica che caratterizza gli appartenenti alla stessa specie e dei pochi caratteri sui quali si basa la differenziazione tra le specie.

Il genere è classificato nella famiglia delle *Trichocomaceae*, ordine *Eurotiales*, classe *Eurotiomycetes* e phylum *Ascomycota*.

Phylum	Genera	Species	Product Types
	<i>Penicillium</i> section <i>Biverticillium</i>	<i>Penicillium spinulosum</i> <i>Penicillium funiculosum</i> <i>Penicillium minioluteum</i> <i>Penicillium purpureogenum</i> <i>Penicillium rugulosum</i>	Hard or semi-hard cheese Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Hard or semi-hard cheese Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Brevicompecta</i>	<i>Penicillium bialowiezense</i> <i>Penicillium brevicompactum</i>	Hard or semi-hard cheese Yoghurt Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Sclerotiora</i>	<i>Penicillium adametzoides</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Fresh unripened cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Canescentia</i>	<i>Penicillium antarcticum</i> <i>Penicillium arenicola</i> <i>Penicillium canescens</i> <i>Penicillium novae-zeelandiae</i>	Hard or semi-hard cheese Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Hard or semi-hard cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Charlesii</i>	<i>Penicillium charlesii</i>	Fresh unripened cheese Heat-treated milk
	<i>Penicillium</i> section <i>Chrysogena</i>	<i>Penicillium dierckxii</i> <i>Penicillium chrysogenum</i>	Fresh unripened cheese Butter and margarine Blue-veined cheese Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese Buffalo, goat, or sheep cheese Fresh unripened cheese Yoghurt
		<i>Penicillium griseofulvum</i> <i>Penicillium nalgiovense</i>	Hard or semi-hard cheese Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Citrina</i>	<i>Penicillium steckii</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Exilicaulis</i>	<i>Penicillium corylophitum</i>	Hard or semi-hard cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Fasciculata</i>	<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	Hard or semi-hard cheese Buffalo, goat, or sheep cheese Yoghurt
		<i>Penicillium camembertii</i> <i>Penicillium commune</i>	Hard or semi-hard cheese Other dairy products Hard or semi-hard cheese Mold ripened cheese Semi-soft cheese Buffalo, goat, or sheep cheese Fresh unripened cheese
		<i>Penicillium crustosum</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese
		<i>Penicillium discolor</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese
		<i>Penicillium echinulatum</i>	Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese
		<i>Penicillium hirsutum</i> <i>Penicillium nordicum</i> <i>Penicillium palitans</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Fresh unripened cheese Hard or semi-hard cheese
		<i>Penicillium solitum</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Other dairy products Semi-soft cheese Yoghurt
		<i>Penicillium verrucosum</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Mold ripened cheese Semi-soft cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Paradoxa</i>	<i>Penicillium viridicatum</i> <i>Penicillium atramentosum</i>	Hard or semi-hard cheese Blue-veined cheese Hard or semi-hard cheese Semi-soft cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Penicillium</i>	<i>Penicillium expansum</i>	Butter and margarine Hard or semi-hard cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Lanata-Divariata</i>	<i>Penicillium oxalicum</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese
	<i>Penicillium</i> section <i>Roquefortum</i>	<i>Penicillium simplicissimum</i> <i>Penicillium roquefortii</i>	Buffalo, goat, or sheep cheese Hard or semi-hard cheese Mold ripened cheese Semi-soft cheese
	<i>Penicillium</i>	Nd *	Buffalo, goat, or sheep cheese

Figura 2.5 – Principali specie di *Penicillium* riscontrate in formaggi duri e semiduri (Garnier L. et al., 2017).

Le muffe sono microrganismi aerobi obbligati, dunque necessitano di ossigeno per esplicare le loro funzioni vitali. Nella Figura 2.5 sono riportate le principali specie afferenti al genere *Penicillium*, le quali causano deterioramenti e alterazioni nella filiera lattiero-casearia.

Molte delle specie riportate si adattano a basse temperature e sono considerate xerofitiche. Le condizioni ecologiche del formaggio sono ottimali per il loro sviluppo.

Come mostra la Figura 2.5, molte specie di *Penicillium* possono impattare negativamente durante la maturazione e la conservazione del formaggio, rendendo non più conforme il prodotto. I funghi contaminanti comportano un'intensa attività proteolitica, con il favoreggiamento della produzione di ammine biogene. Essi producono anche micotossine, sostanze che possono fare insorgere patologie al consumatore se ne vengono introdotte ingenti quantità nel lungo periodo.

I metodi di prevenzione prevedono tecniche atte a evitare contaminazioni o contaminazioni crociate durante la produzione alimentare e includono: il *packaging* in condizioni asettiche, sottovuoto; l'utilizzo di sistemi di filtrazione dell'aria nei vari ambienti di lavoro; buone prassi di lavoro e buone pratiche di igiene (GMP e GHP) implementate nel sistema HACCP; il controllo periodico delle strutture lavorative (finestre, fessure, pavimenti, posizionamento impianti, *etc.*).

I metodi di controllo, invece, hanno come obiettivo la riduzione o l'inibizione della crescita fungina, come l'aggiunta di colture protettive, l'utilizzo di conservanti, l'utilizzo di atmosfere modificate (ATM), di basse temperature di conservazione e trattamenti termici o ad alta pressione.

3 LE COLTURE PROTETTIVE

Le colture protettive sono colture microbiche che possono essere aggiunte ai prodotti alimentari al fine di inibire microorganismi indesiderati, senza modificare le caratteristiche organolettiche e sensoriali del prodotto. Esse possono essere introdotte in molti prodotti fermentati grazie alla loro capacità di apportare sostanze chimiche positive con funzione batteriostatica, probiotica e battericida.

Queste colture batteriche possono essere introdotte durante la produzione e la trasformazione degli alimenti o in ultima analisi a prodotto finito. Alternativa valida è l'immissione diretta dei prodotti finali isolati preliminarmente nei vari alimenti.

3.1 Descrizione

Le colture protettive sono costituite da microrganismi appartenenti al phylum *Firmicutes*, alla classe dei *Bacilli* e all'ordine dei *Lactobacillales*. All'interno di quest'ordine vi sono molte famiglie e la maggior parte costituiscono i batteri lattici (LAB).

Trattasi di batteri Gram-positivi di forma bacillare o coccica, i quali non possono muoversi in quanto non possiedono flagelli e non sono in grado di differenziarsi in spora. Tali batteri sono ubiquitari e la maggior parte non presenta forme di patogenicità.

Essi sono acido-tolleranti e a volte anche acidofili. La loro temperatura di crescita ricopre un ampio *range* e a seconda della specie possono essere classificati come psicrotrofi, mesofili e termofili. I batteri lattici non riducono i nitrati in nitriti e producono gas da fermentazione.

La loro scarsa capacità biosintetica li rende esigenti dal punto di vista nutrizionale. I batteri lattici non possedendo il ciclo di Krebs, sono anaerobi, con diversi gradi di aerotolleranza a seconda della specie, e non sono capaci di detossificare le forme reattive dell'ossigeno (ROS) in quanto sono catalasi e ossidasi negativi.

La fermentazione è di tipo omo- ed etero-lattica e permette di classificare i LAB in due gruppi:

- Fermentazione omolattica: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Carnobacterium* e alcune specie di *Lactobacillus*;
- Fermentazione eterolattica (obbligata o facoltativa): *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella* e alcune specie *Lactobacillus*.

Il prodotto finale ricercato, per cui vengono utilizzate queste colture batteriche nelle varie trasformazioni tecnologiche in ambito caseario, è l'acido lattico.

Esso viene prodotto nelle due forme enantiomeriche D o L (D ed L in alcune specie). L'acido lattico è il principale acido prodotto e abbassa il pH dell'alimento creando un ambiente non favorevole allo sviluppo microbico.

I LAB sono in grado di produrre sostanze chimiche ad azione antimicrobica come acidi organici e batteriocine.

Nella Tabella 3.1 vengono riportate alcune colture disponibili in commercio.

Commercial name	Involved microorganisms	Target food for use	Benefits	Manufacturer
FreshQ [®]	<i>Lact. rhamnosus</i> and <i>Lact. paracasei</i>	Yogurt and cheese	Reduction of yeast and mold	Chr. Hansen (Denmark)
Bactoferm [™]	Pediocin- and sakacin-producing strains	Fermented sausages and dry-cured meat	Inhibition of spoilers and pathogens	Chr. Hansen (Denmark)
Viniflora [®]	Citrate-negative <i>Oenococcus oeni</i>	Wine	Prevention of undesirable flora and protection the flavor of the wine	Chr. Hansen (Denmark)
SAFEPRO [®]	Not reported	Meat, salmon, and ready-to-eat salad	Prevention of spoilage and extension of shelf life	Chr. Hansen (Denmark)
Lyofast LPR A	<i>Lact. rhamnosus</i> and <i>Lact. plantarum</i>	Dairy products	Inhibition of spoilers and pathogens	Sacco (Italy)
HOLDBAC [®]	A mix of bacteriocin-producing strains	Different type of food	Inhibition of spoilers (i.e., mold and yeasts) and <i>Listeria</i>	Du Pont Nutrition & Biosciences (USA)
Dairy Safe [™]	Nisin-producing and nisin-resistant <i>L. lactis</i> strains	Dairy products	Inhibition of late-blowing	CSK (Netherlands)
Delvo [®] Pro	Probiotic strains like <i>Bifidobacterium</i> , <i>Lact. casei</i> , <i>Lact. acidophilus</i> , <i>Lact. rhamnosus</i> GG, and <i>Lact. johnsonii</i>	Dairy products	Increase the shelf life and stability of dairy products	DSM (Netherlands)
Befresh [™]	A group of bacterial strains including <i>Lactobacillus</i> spp. and <i>Propionibacterium freudenreichii</i> subsp. <i>shermanii</i>	Fresh and fermented dairy and fruits	Offer a strong protection against yeast, mold, <i>Listeria</i> and <i>Clostridium</i>	HANDARY Natural Shelf Life Specialist (Belgium)

Tabella 3.1 – Colture commerciali (Moradi M. et al., 2020)

3.2 Metaboliti ad azione antimicrobica

Dalla loro scoperta, i LAB sono stati studiati e testati secondo varie prospettive. Contribuiscono in modo significativo alle caratteristiche nutrizionali e organolettiche dei prodotti ove sono inoculati. I batteri lattici sono impiegati nel settore lattiero-caseario per il miglioramento della *shelf-life* dei prodotti fermentati e per il controllo microbiologico durante le fasi di lavorazione, grazie alla produzione di composti chimici come acidi organici, acqua ossigenata e batteriocine.

L'acido lattico contribuisce al decremento del pH del formaggio. Rende l'ambiente inadatto allo sviluppo e alla crescita di batteri deterioranti e patogeni.

Tramite la glicolisi il glucosio viene trasformato in acido piruvico, il quale, grazie all'ossidazione del NADH in NAD⁺, è convertito in acido lattico (acido piruvico ridotto ad acido lattico).

L'acqua ossigenata (H₂O₂), o perossido di diidrogeno, è una forma reattiva dell'ossigeno, quindi tossica per le cellule. Rientra nel sistema della lattoperossidasi e del tiocianato. La lattoperossidasi (LPO) è una proteina presente naturalmente nel latte e il tiocianato (SCN⁻) deriva dalla dieta dell'animale, quindi è presente nel latte in quantità variabili. La lattoperossidasi in presenza di acqua ossigenata ossida il tiocianato ad ipotiocianato, il quale ha attività inibente in quanto ossida i gruppi -SH delle proteine di membrana.

Il termine "batteriocina" fu utilizzato per la prima volta negli anni '50 da Francois Jacob (Jacob et al., 1953) per indicare composti proteici di origine batterica, prodotti indifferentemente da batteri Gram-positivi e Gram-negativi, dotati di attività inibitoria nei confronti di ceppi batterici differenti dal ceppo produttore, ma ad esso strettamente correlati. Queste sostanze chimiche vengono inattivate dal tratto gastrointestinale dell'uomo grazie all'azione enzimatica della tripsina, della pancreatina e della chimotripsina. Esse non hanno effetti nocivi o indesiderati se introdotte con la dieta.

Spesso queste sostanze sono confuse con gli antibiotici, in quanto hanno un effetto simile.

Le batteriocine, invece, mostrano specifiche caratteristiche (Drider e Rebuffat, 2011):

- sono sintetizzate a livello ribosomiale, mentre gli antibiotici sono sintetizzati da sistemi multi-enzimatici la cui biosintesi non è bloccata da inibitori della sintesi proteica, al contrario delle batteriocine;
- hanno uno spettro d'azione limitato e generalmente hanno attività battericida solo nei confronti di quei batteri strettamente correlati al ceppo che le produce, mentre gli antibiotici hanno uno spettro d'azione più ampio;
- hanno la capacità di uccidere i batteri a concentrazioni nanomolari, mentre gli antibiotici sono efficaci a concentrazioni maggiori.

Le batteriocine prodotte dai Gram-positivi vengono classificate in 4 classi:

- Classe I: piccoli peptidi contenenti aminoacidi “inusuali” (b-metil-lantionina e deidroalanina), i quali conferiscono la resistenza alla degradazione enzimatica. Rientrano in questa classe le nisine, le lacticine e i lantibiotici. Questi hanno un ampio spettro di attività e possiedono stabilità termica molto elevata. Sono suddivisi in tipo A e tipo B, in rispetto alle loro caratteristiche strutturali e funzionali.
- Classe II: si tratta della classe più ampia, in cui sono presenti piccoli peptidi non lantibiotici composti circa da 20-60 aminoacidi e sono di media ed elevata termostabilità. Ne fanno parte le pediocine, sakacine ed enterocine. Questa classe è suddivisa a sua volta in 5 sottoclassi.
- Classe III: grosse proteine, sensibili al calore e con spettro di attività ristretto (e.g. helveticina J, batteriolisine). Questa classe è suddivisa in altre 2 sottoclassi.
- Classe IV: batteriocine complesse associate a porzioni lipidiche o glucidiche indispensabili per la loro attività (e.g. plantaricina S).

Più di 230 batteriocine prodotte dai LAB sono state isolate, mentre nel settore lattiero-caseario sono state testate in un numero limitato. Le batteriocine della classe I sono anche chiamate “lantibiotici” in quanto nella loro catena amminoacidica è presente un amminoacido non comune, la lantionina.

La nisina è la più importante batteriocina ed è disponibile in formulato commerciale. È autorizzata come conservante (E234) ed è riconosciuta come *safe* dalla FAO e OMS.

Si tratta di un peptide costituito da 34 amminoacidi, dei quali taluni sono inusuali, ed essa rientra nella classe IA, tra i lantibiotici. Sono 8 le varianti di nisina ad oggi conosciute e caratterizzate. Nisine A, Z, F e Q sono prodotte dalla specie *Lactococcus lactis*, mentre le nisine U, U2, P e H sono prodotte da alcuni ceppi di *Streptococcus*.

La nisina è commercialmente disponibile con il nominativo Nisaplin™, il quale possiede il 2,5% di nisina A e altri componenti come NaCl e latte scremato in polvere. Essa possiede una forte attività antimicrobica contro i batteri sporigeni Gram-positivi, come il genere *Clostridium* e il genere *Bacillus*. È completamente stabile a 115.6°C se pH 2.0, mentre alla stessa temperatura perde il 40% di attività a pH 5,0 e più del 90% a pH 6,8.

Le pediocine rientrano nella classe II e vengono prodotte da specie afferenti al genere *Pediococcus*.

Esse sono disponibili commercialmente con il nome di Alta 2341™ e Microgard™ e sono utilizzate prevalentemente per il controllo nei confronti di *Listeria monocytogenes*, di *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* ed *Escherichia coli*.

La loro applicazione ai prodotti lattiero-caseari è motivata dalla loro stabilità in soluzioni acquose, dall'ampio range di pH a cui possono esplicarsi e dalla loro resistenza alle alte e basse temperature.

Le lacticine sono prodotte da certi ceppi di *Lc. lactis* e appartengono alla classe I. Queste batteriocine, principalmente la lacticina 481 e la lacticina 3147, hanno una buona capacità nel contrastare lo sviluppo di *Bacillus* e *Clostridium*.

Le enterocine sono prodotte dalle specie appartenenti a *Enterococcus*. L'Enterocina AS-48, prodotta da *Enterococcus faecalis*, è classificata nella classe II ed è attiva contro specie di *Bacillus* e *Clostridium*. Essa possiede una buona termostabilità e pH resistenza.

La modalità di azione delle batteriocine opera direttamente a livello della membrana plasmatica e della parete cellulare, portando alla formazione di pori o alterando la capacità della cellula nella formazione della parete, andando a distruggere le funzioni enzimatiche associate.

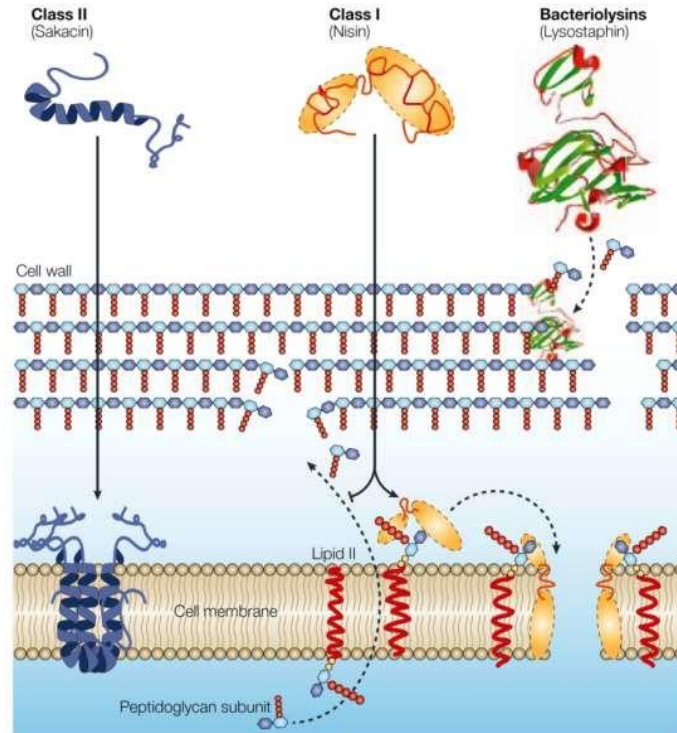


Figura 3.1 – Meccanismo di azione delle batteriocine (Cotter P. D. et al., 2005)

La Figura 3.1 mostra la modalità di azione delle batteriocine.

I lantibiotici possono legarsi al lipide II, trasportatore delle subunità di peptidoglicani dal citoplasma alla parete cellulare, e alterare la corretta sintesi della parete. Inoltre, i lantibiotici possono sfruttare il lipide II come strumento per iniziare il processo di inserzione nella membrana, per poi determinare la formazione del poro, portando così alla morte la cellula bersaglio. Le batteriocine di classe II sono costituite da un'elica anfifilica che permette l'inserzione nella membrana la quale genera depolarizzazione e quindi la conseguente morte della cellula. Nella classe III e IV rientrano batteriocine che catalizzano l'idrolisi della parete cellulare, portando alla morte la cellula.

A seconda della coltura batteriocinogenica utilizzata possono esserci anche altre batteriocine, come la helveticina, la plantaricina e la sakacina.

3.3 Normativa

L'utilizzo di colture protettive o dei loro prodotti metabolici è normato a livello internazionale. In Unione Europea le colture batteriche e le sostanze chimiche utilizzabili in campo alimentare devono possedere lo *status* di QPS (*Quality Presumption of Safety, European Food Safety Authority*) o GRAS (*Generally Recognized as Safe, Food and Drug Administration*).

Questi due *status* appena citati sono metodiche per la formulazione di ipotesi circa di una sostanza o un ceppo batterico sulla base di ragionevoli prove. Se a una valutazione mirata non emergono problematiche di sicurezza, allora verrà conferito lo stato di QPS o di GRAS, a seconda che sia stata effettuata rispettivamente da EFSA o da FDA.

Le colture commerciali ad oggi disponibili per le trasformazioni alimentari in Unione Europea sono state tutte testate e rese conformi attraverso la valutazione del panel BIOHAZ di EFSA, il quale rivisita la lista e la aggiorna annualmente.

Per ottenere lo stato di QPS un microrganismo deve soddisfare i seguenti criteri:

- la sua identità tassonomica deve essere ben definita;
- l'insieme delle conoscenze disponibili in materia deve essere sufficiente a stabilirne la sicurezza;
- l'assenza di proprietà patogene deve essere accertata e giustificata;
- la sua destinazione d'uso deve essere chiaramente descritta.

I microrganismi che non sono ben definiti, per i quali siano stati individuati problemi di sicurezza o per i quali non sia possibile concludere se danno adito o meno a problemi di sicurezza per l'uomo, gli animali o l'ambiente non sono considerati idonei allo stato di QPS e devono essere quindi sottoposti a una valutazione completa in termini di sicurezza. Non tutti i ceppi appartenenti a queste specie sono in grado di produrre batteriocine e per questo risulta necessario eseguire delle valutazioni caso specifiche o, in situazioni pratiche aziendali, acquistare formulati già classificati come produttori di batteriocine. I batteri afferenti al genere *Enterococcus* sono la causa principale delle infezioni a livello nosocomiale e l'*Enterococcus faecalis* è spesso riscontrato in questi casi. Questi batteri possiedono fattori di virulenza, potenziali fattori di patogenicità (emolisine, gelatinasi, adesine) e antibiotico resistenza, l'insieme dei quali compromette l'attribuzione dello *status* di QPS o GRAS.

In caso di scelta dell'utilizzo di un ceppo di *Enterococcus* è necessario valutare caso per caso.

Allo scopo di distinguere ceppi che contengono una resistenza acquisita da una resistenza intrinseca, l'EFSA ha definito dei valori *breakpoint* di MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) per 10 antimicrobici. Ceppi con valori di MIC per un dato antibiotico superiori al valore di *breakpoint* sono considerati resistenti a quell'antibiotico. I dati utilizzati per la definizione dei *breakpoint* sono stati desunti da pubblicazioni scientifiche, nonché da programmi di monitoraggio e di ricerca nazionali ed europei. La determinazione della MIC al di sopra dei livelli di *breakpoint* identificati dall'EFSA per uno o più antimicrobici richiede ulteriori indagini: se la resistenza è stata acquisita da un ceppo batterico appartenente a un gruppo tassonomico naturalmente sensibile a un composto antimicrobico, il rischio di trasferimento è ritenuto sostanzialmente maggiore rispetto a quello associato a resistenze intrinseche. L'EFSA ritiene che i ceppi di batteri vettori di una resistenza acquisita ad antimicrobici non debbano essere utilizzati come additivo alimentare, a meno che non si dimostri che sia il risultato di mutazioni cromosomiche. È possibile consultare EFSA per il singolo caso.

Il regolamento (CE) 1333/2008 del Parlamento Europeo e del Consiglio consente l'utilizzo degli additivi alimentari. In questa norma è riportato che la nisina (E234) può essere utilizzata come conservante alimentare in prodotti specifici elencati nell'allegato II del rispettivo regolamento.

La direttiva 2010/69/CE della Commissione aggiorna e rettifica in quali prodotti e in quale quantità è possibile aggiungere la nisina.

4 CASI STUDIO

Applicazioni dirette e valutazioni analitiche sono di fondamentale importanza per sostenere quanto presentato. In questo elaborato vengono presentati tre studi relativi a tre situazioni di contaminazione microbica, le quali possono avere delle conseguenze disparate. È stata valutata l'azione delle colture protettive nei confronti di ceppi patogeni, come il *Bacillus cereus*, in ceppi anti-caseari – quindi verso il principale microrganismo causante gonfiore tardivo nelle forme in stagionatura, il *Clostridium tyrobutyricum* – e infine verso le muffe, specificamente verso la specie *Penicillium commune*, le quali possono ridurre la *shelf-life* del prodotto e comprometterne la disponibilità nel tempo.

4.1 Inibizione di *B. cereus* tramite *Enterococcus sp.* produttore di enterocina AS-48

In questo lavoro viene presentata l'efficacia del controllo microbiologico nei confronti del *Bacillus cereus LWL1* da parte del ceppo *Enterococcus faecalis A-48-32 (Bac⁺)* produttore della relativa enterocina AS-48 in un formaggio duro ottenuto da latte scremato vaccino.

Il test prevede la produzione di un formaggio di controllo, quindi senza l'aggiunta della coltura protettiva e di un altro, sperimentale, che preveda l'inserimento di quest'ultima.

Il latte viene inizialmente pastorizzato con modalità HTST (72°C x 15s) e successivamente raffreddato a 32°C. Viene in seguito posto in due tini separati, a temperatura costante e controllata, i quali vengono entrambi inoculati con una coltura starter commerciale (SLAB) (EZAL MA 4001; Rhodia Food, Dange Saint Romain, Francia) a una concentrazione pari a 10⁷CFU/ml e con 10⁵CFU/ml del ceppo patogeno *B. cereus LWL1*. Nel tino sperimentale vengono aggiunte 2x10⁵CFU/ml del ceppo Bac⁺. Quindi ci si trova in una condizione di ratio di 1/2 rispettivamente di *B. cereus LWL1* ed *E. faecalis A-48-32 (Bac⁺)*. In entrambi i casi, dopo 45 minuti si aggiunge il caglio animale (titolo 1:10000) e si attende per 72 minuti la coagulazione presamica a 32°C. La cagliata infine viene allontanata dal suo siero, permettendo così uno spurgo più efficiente. Viene quindi posta in delle fascere e pressata per 1,5h con una pressione di 1,5 Kg/cm², lasciata in salina per 5h e infine messa a maturare a temperatura controllata di 12°C per un mese.

L'analisi consta nell'eseguire campionature di entrambe le prove a 5, 10, 15 e 30 giorni di maturazione, al fine di valutare lo sviluppo sia di *B. cereus* sia di *E. faecalis*.

Le analisi eseguite in questo lavoro dimostrano che durante la cagliata e lo spurgo la concentrazione di *B. cereus* si riduce di 1 logaritmo circa, ottenendo così una ratio di 15 enterococchi a 1 bacillo.

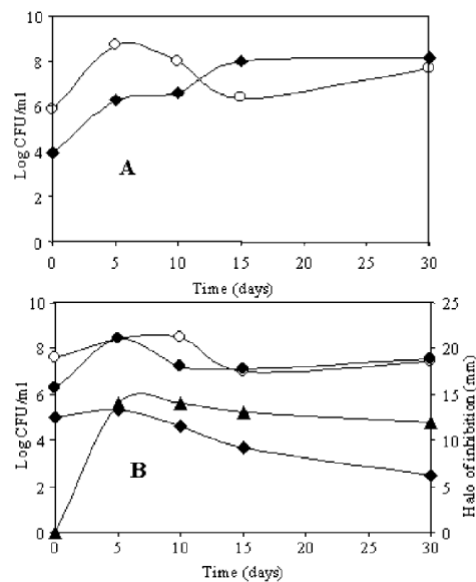


Figura 4.1 – Grafico A: Curve di crescita della coltura starter e del ceppo patogeno. ○ coltura starter, ◆ ceppo patogeno *B. cereus* LWL1. Grafico B: In aggiunta alle curve di crescita del grafico A vi sono anche la curva di crescita del ceppo batteriocinogenico e il relativo alone di inibizione. ● ceppo batteriocinogenico, ▲ alone di inibizione (Muñoz A. et al., 2004).

Il grafico A riportato nella Figura 4.1 mostra l'andamento dello sviluppo del ceppo patogeno *B. cereus* LWL1 e della coltura starter in condizioni di assenza della coltura protettiva. Si nota che la crescita di *B. cereus* non è compromessa o ridotta in tale situazione.

Nel grafico B, sempre nella Figura 4.1, vengono rappresentati anche lo sviluppo del ceppo batteriocinogenico e il relativo alone di inibizione espresso in millimetri di diametro su piastra mediante analisi sull'estratto di formaggio. In coincidenza del rilevamento massimo dell'enterocina AS-48, lo sviluppo di *B. cereus* è in calo e prosegue fino al giorno 30. Al giorno 5 la conta di *B. cereus* nel formaggio sperimentale è di 4,62log CFU/g, contro i 6.56log CFU/g nel formaggio di controllo.

La differenza tra le due prove è statisticamente significativa al giorno 15 (3.69log CFU/g nel caso sperimentale, contro gli 8log CFU/g nel formaggio di controllo) e al giorno 30 di maturazione (2.5log CFU/g nel caso sperimentale, contro gli 8log CFU/g nel controllo).

C'è un collegamento tra causa ed effetto nell'aggiunta di questa coltura protettiva.

4.2 Inibizione di *Clostridium tyrobutyricum* in formaggio tramite aggiunta di *Lactobacillus gasseri*

Con questo lavoro è stata valutata la capacità del ceppo *Lactobacillus gasseri* K7 (Rif^r), produttore di batteriocina (gassericina K7), di contrastare lo sviluppo di *Clostridium tyrobutyricum* in un formaggio semi duro. I risultati sono promettenti e validi come prova a sostegno della mia tesi.

Sono state eseguite dieci prove in totale e in ognuna di esse sono state prodotte due forme di formaggio utilizzando 80L di latte. In cinque prove sono stati aggiunti la coltura starter e il ceppo di clostridio, mentre nelle altre cinque oltre ad aver aggiunto le due colture appena citate è stata aggiunta la coltura protettiva oggetto di valutazione.

Dopo aver trattato il latte a 65°C per 30 minuti e raffreddato a 32°C, esso è stato addizionato con la coltura commerciale starter di *Str. thermophilus* TH4 DVS (Christian Hansen, DK-2970 H rsholm, Denmark) a un livello di 1.6g per 80L di latte. Allo stesso momento sono state aggiunte le cellule di *Lb. gasseri* K7 (Rif^r) e le spore di *C. tyrobutyricum*, rispettivamente con una concentrazione pari a 10⁷ CFU/ml e di 2,5x10³ spore/ml. Al fine di aumentare la probabilità di indurre il gonfiore tardivo, la concentrazione di spore è elevata. Le spore di *C. tyrobutyricum* sono state isolate da formaggi recanti gonfiore tardivo. Successivamente è stato aggiunto il caglio e, mezz'ora dopo questa aggiunta, la cagliata è stata rotta in particelle di dimensioni di 0.5cm e infine scaldata a 42°C. In seguito, la cagliata è stata trasferita nelle forme e pressata a temperatura ambiente. Quando è stato raggiunto un pH di 5.3, i formaggi sono stati spostati in salina per 18h. Infine sono stati fatti maturare per 8 settimane a temperatura controllata tra i 15°C e i 17°C.

Ogni due settimane i campioni vengono analizzati e confrontati.

Durante il periodo di maturazione il numero di spore aumenta gradualmente in tutti i casi, come mostra la Figura 4.2, ma il formaggio prodotto con l'aggiunta della coltura batteriocinogenica mostra che lo sviluppo di *Clostridium tyrobutyricum* è ridotto rispetto al formaggio senza la coltura (Bac⁺).

Come mostra la Figura 4.2, le barre bianche e i triangoli indicano rispettivamente il numero di spore e la quantità di acido butirrico nei formaggi senza l'aggiunta del ceppo K7 (Rif^r). Invece le barre grigie e i cerchi indicano rispettivamente il numero di spore e la quantità di acido butirrico nei formaggi ove è stata aggiunta la coltura batteriocinogenica.

Per la quantificazione del numero di spore i campioni sono stati trattati a 80°C per 15 minuti prima dell'impiastramento con agar RCM (*reinforced clostridium agar*). La coltura

gassericinogenica è stata fatta sviluppare in terreno di coltura MRS agar e, per confermare il ceppo specifico, si è ricorsi all'analisi RAPD PCR tramite utilizzo di *primer* specifici.

La concentrazione di acido butirrico rilevato tramite gas cromatografia è legata allo sviluppo delle spore di *C. tyrobutyricum*. La Figura 4.2 mette in evidenza la riduzione della concentrazione dell'acido butirrico durante le settimane di maturazione dei formaggi nei quali è stata aggiunta la coltura batteriocinogenica.

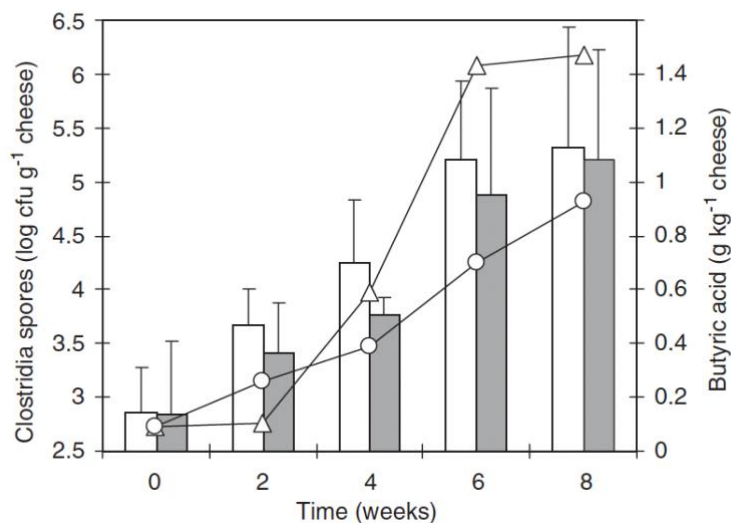


Figura 4.2 – Numero medio di spore di clostridi e concentrazione media dell'acido butirrico in formaggi con coltura protettiva e in assenza di essa a confronto per una durata di 8 settimane. Le barre bianche e i triangoli indicano rispettivamente la conta delle spore di clostridi e l'acido butirrico in quei formaggi senza l'aggiunta del ceppo K7; le barre grigie e i cerchi denotano ugualmente la conta delle spore dei clostridi e l'acido butirrico, ma in quei formaggi ove è stata aggiunta la coltura protettiva (Bogovic M. B. et al., 2007)

Al fine di aumentare la probabilità di indurre il gonfiore tardivo è stata inoculata un'alta dose di spore, circa $2,5 \times 10^3$ spore/ml, ottenuta da due ceppi di *C. tyrobutyricum* isolati da formaggi recanti il problema del gonfiore tardivo.

Nella Tabella 4.1 sono riportati vari parametri utili alla determinazione dell'efficacia dell'inserimento della coltura protettiva. In particolare, indice di sviluppo di clostridi è la concentrazione (g/Kg) di acido butirrico. I dati ricavati dalle analisi mostrano che l'aggiunta del ceppo batteriocinogenico porta a una diminuzione della concentrazione di acido butirrico alla sesta settimana circa del 50%. Come riportato nella Tabella 4.1, quindi, la comparsa del gonfiore tardivo viene del tutto compromessa nelle prime due settimane, mentre in quelle successive viene fortemente ridotta.

Variable	Cheese	Weeks of ripening				
		0	2	4	6	8
pH	With K7	5.28±0.03	5.24±0.11	5.23±0.15	5.33±0.28	5.33±0.24
	Without K7	5.25±0.02	5.34±0.09	5.42±0.15	5.65±0.29	5.54±0.21
<i>n</i> -Butyric acid (g kg ⁻¹)	With K7	0.09±0.02	0.262±0.331	0.39±0.272	0.702±0.286	0.928±0.443
	Without K7	0.088±0.017	0.105±0.026	0.588±0.256	1.433±0.421	1.47±0.342
Acetic acid (g kg ⁻¹)	With K7	< 0.5	< 0.5	< 0.5	0.554±0.061	0.568±0.065
	Without K7	< 0.5	< 0.5	< 0.5	0.588±0.057	0.682±0.341
Propionic acid (g kg ⁻¹)	With K7	< 0.1	< 0.1	0.246±0.094	0.304±0.099	0.408±0.114
	Without K7	< 0.1	< 0.1	0.264±0.085	0.430±0.144	0.412±0.182
Appearance of blowing	With K7	no	no	One of five	All slightly blown	Four slightly cracked
	Without K7	no	Three from five	All five	Blown, cracked	Blown, cracked

^aThe presented concentrations of organic acids and pH values are average values ± standard deviations of five cheeses produced in separate trials. n.d., not detected.

Tabella 4.1 – Evoluzione del valore del pH, della produzione di acidi organici e il relativo riscontro di gonfiore durante la maturazione dei formaggi (Bogovic˘ Matijas˘ic˘ B. et al., 2007)

Vista l'alta concentrazione di spore inoculate è da considerarsi un buon risultato, in quanto nella produzione del formaggio condizioni analoghe sono rare. Ci si aspetta, quindi, una migliore inibizione dello sviluppo di clostridi in contesto produttivo. Considerando entrambe le immagini appena descritte, c'è un nesso tra causa ed effetto nell'uso della coltura protettiva.

4.3 Utilizzo di batteri lattici per il controllo di *Penicillium commune* in ricotta

In questo lavoro si è voluto valutare l'efficacia dell'uso di batteri lattici, principalmente della specie *Lb. plantarum*, nel controllo dello sviluppo di muffe. Questi LAB sono stati isolati da varie matrici vegetali, come frutta e verdura. L'attività antifungina per ogni batterio lattico è stata valutata in piastra tramite MRS agar. Sono stati inoculati su una ricotta commerciale ceppi di LAB e di *Penicillium commune* in modo da stimare l'antagonismo dei primi nei confronti del secondo e quindi la possibilità di rendere il prodotto maggiormente resistente alle contaminazioni fungine e allungarne il periodo di *shelf-life*. La scelta di *Penicillium commune* è dovuta alla sua predominanza nei vari casi di contaminazione fungina.

I batteri lattici con effetto soppressivo nei confronti di *P. commune* sono stati utilizzati per l'analisi, mentre quelli che non presentavano attività antifungina sono stati utilizzati come controllo.

I LAB con azione antifungina sono stati fatti crescere in piastra con brodo MRS per 48h a 30°C. Dopo il periodo di incubazione, tramite analisi sulla densità ottica con OD₆₀₀, è stata stabilita una concentrazione di LAB pari a 10⁹ UFC/ml.

Successivamente, 20 grammi di ricotta commerciale, chimicamente costituita da 11.3g di proteine, 5.4g di grassi e 2.6g di zucchero per 100g totali, sono stati inseriti in piastre petri e inoculati con 0.1ml della sospensione di LAB prima determinati. Le piastre sono dunque state inoculate a 24°C per due giorni.

A questo punto l'inoculo (0.1ml) di *P. commune* con una concentrazione di circa 10⁶ spore/ml è stato addizionato ai vari preparati, inclusi quelli di controllo e miscelati in modo da favorire una corretta distribuzione del tutto. La concentrazione finale di spore nella ricotta è inferiore e pari a 10⁴ spore/g.

Le piastre sono tenute a temperatura ambiente ed esaminate ogni 4-5 giorni.

I risultati dell'attività antifungina delle diverse specie di LAB contro il *P. commune* sono mostrati nella Tabella 4.2.

Il controllo 1 (Tabella 4.2) è ricotta inoculata con *P. commune* senza l'aggiunta di LAB e dal giorno 4 presenta già un moderato sviluppo della muffa che va sempre più a intensificarsi (Figura 4.3).

Invece, alcuni campioni inoculati con la coltura protettiva di lactobacilli non mostrano sviluppo fino al giorno 18 e altri addirittura fino al giorno 29 (Tabella 4.2 e Figura 4.3).

I batteri lattici che non possiedono attività antifungina evidenziano quindi lo sviluppo di muffa a partire già dai primi giorni.

No.	Species	Source	LAB CFU/g	<i>P. commune</i> growth on cottage cheese ^a									
				Day									
				0	4	8	12	16	18	20	25	29	
LAB with antifungal activity on MRS agar													
170	<i>Lb. plantarum</i>	Stevia (sweet leaf)	10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
377	<i>Lb. plantarum</i>	Baby endive	10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
845	<i>Lb. plantarum</i>	Parsnips	10 ⁷	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
880	<i>Lb. plantarum</i>	Asian vegetables	10 ⁸	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
883	<i>Lb. plantarum</i>	Spinach	10 ⁷	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
884	<i>Lb. plantarum</i>	Cos lettuce	10 ⁷	-	-	-	-	-	+	+	++	++	++
885	<i>Lb. plantarum</i>	Broccoli	10 ⁷	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
871	<i>Lb. plantarum</i>	Red capsicum	10 ⁷	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
891	<i>Lb. plantarum</i>	Cos lettuce	10 ⁷	-	-	-	-	-	+	+	+	+	++
892	<i>Lb. plantarum</i>	Broccoli	10 ⁷	-	-	-	-	-	+	+	++	++	+++
895	<i>Lb. plantarum</i>	Spinach	10 ⁷	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
897	<i>Lb. plantarum</i>	Green bean	10 ⁷	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Control LAB with no antifungal activity on MRS agar													
33	<i>W. soli</i>	Mixed salad	10 ⁷	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
49	<i>Lc. lactis</i>	Flat parsley	10 ⁷	-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
402	<i>Le. inhae</i>	Baby Rocket	10 ⁸	-	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
844	<i>Le. mesenteroides</i>	Rocket leaves	10 ⁷	-	+	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Controls													
1	no LAB		0	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	no LAB and no <i>P. commune</i>		0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

^a Unless stated all cheese samples were inoculated with *P. commune*. Scoring was as follows: (-) no mould growth; (+) small mould spots; (++) moderate sized mould spots or patches; (+++) mostly or completely covered by mould.

Tabella 4.2 – Specie di batteri lattici inoculati nella ricotta e la loro capacità di contrastare lo sviluppo di *P. commune* (Cheong E.Y.L. et al., 2014)

L'attività antifungina si può osservare non solo tramite il primo *screening* su MRS agar, ma si nota analiticamente e visivamente anche sulla matrice alimentare, indicando quindi un potenziale utilizzo per il controllo delle muffe nei prodotti lattiero caseari.

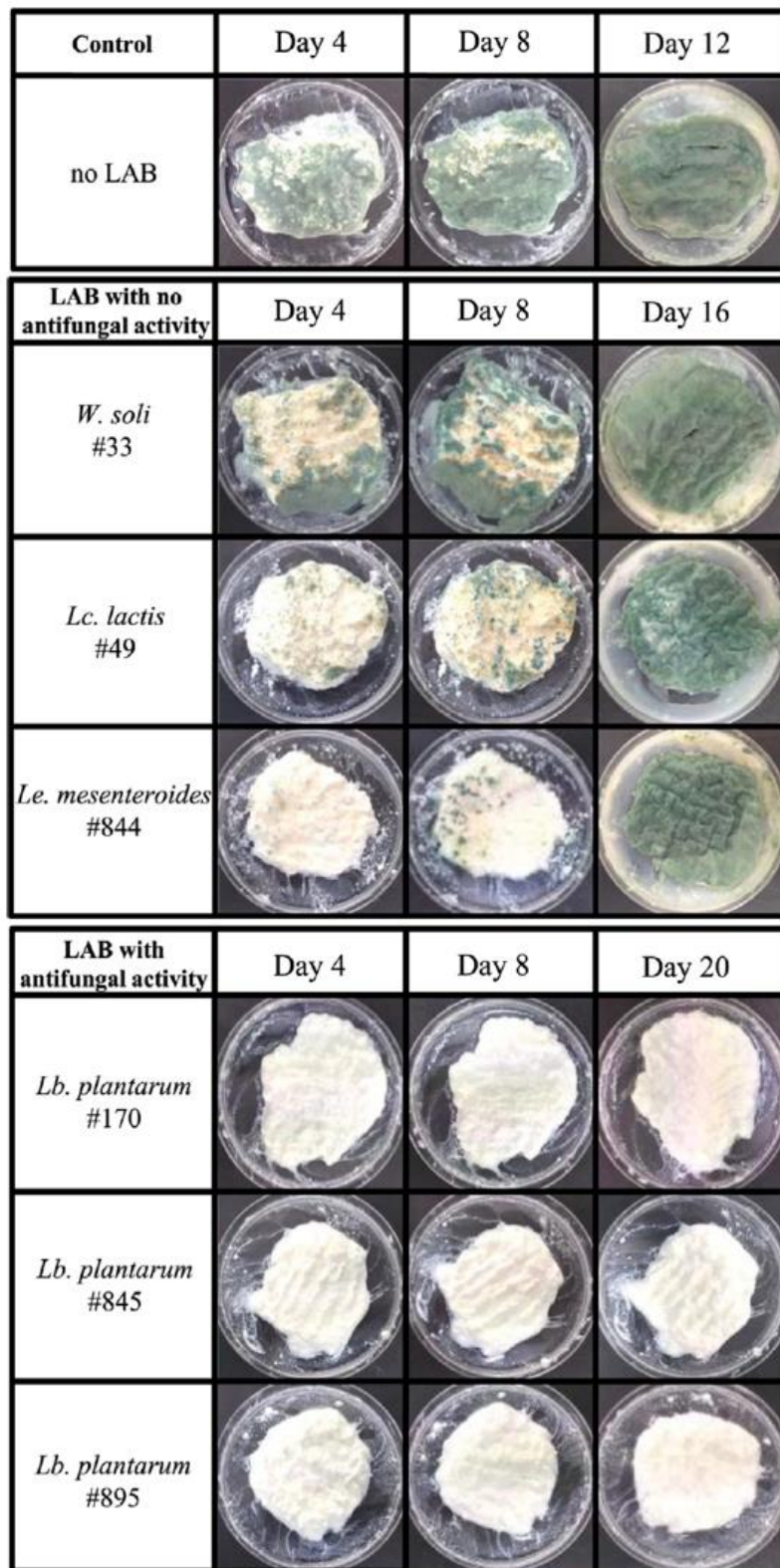


Figura 4.3 – Foto dimostranti la protezione microbica conferita da specie di batteri lattici a confronto (Cheong E.Y.L. et al., 2014)

5 CONCLUSIONI

Le colture protettive sono una soluzione promettente a problemi di carattere salutistico e tecnologico: si adattano positivamente alle varie matrici alimentari – in particolar modo ai prodotti lattiero-caseari – si sviluppano nell'alimento e producono dei prodotti finali con caratteristiche vantaggiose al loro impiego nel settore lattiero-caseario. I batteri lattici produttori di batteriocine sono un'ottima alternativa all'utilizzo di conservanti chimici normalmente utilizzati in molteplici campi alimentari. Il consumatore oggi richiede prodotti sempre più *green* e *safe* ed è a conoscenza del fatto che molti conservanti introdotti con l'alimentazione nel lungo periodo possano indurre problemi di carattere salutistico. In passato le scelte alimentari sono state guidate da scelte edonistiche ed economiche, ora il consumatore pone maggior attenzione agli ingredienti che costituiscono l'alimento e viene spinto a scegliere prodotti con *clean label*. Altro motivo per cui è stato valutato l'impiego delle colture protettive è rendere il prodotto lattiero-caseario disponibile a persone che presentano intolleranze e allergie verso alcuni additivi: creare un prodotto libero da questi può determinare un incremento delle vendite e rendere il prodotto disponibile a una fascia di persone sempre più ampia.

Indubbiamente l'utilizzo di queste colture protettive non è la panacea per il controllo microbiologico in campo alimentare, tuttavia esse sicuramente offrono un vantaggio sfruttabile tramite le *hurdle technologies*, ovvero le tecnologie a ostacoli. La combinazione di più tecniche di conservazione è necessaria per il controllo microbiologico, poiché è di maggior vantaggio agire in modo blando su più fattori che ostacolano la crescita microbica e che prevengono la degradazione di un prodotto, piuttosto che su uno solo di essi in modo drastico.

È stato appurato che tecnologie come i campi elettrici pulsati e le alte pressioni idrostatiche che aumentano la permeabilità di membrana influenzano positivamente l'attività delle batteriocine. Inoltre, la combinazione di batteriocine con oli essenziali (es. *Rosmarinus officinalis*) possono avvantaggiare l'effetto positivo di queste ultime.

Visto il costo di purificazione e isolamento delle batteriocine, è conveniente utilizzare direttamente le colture batteriche selezionate. Le batteriocine sono una prima linea di difesa nei confronti dei patogeni, in quanto vengono prodotte molto velocemente e si diffondono più rapidamente delle grandi molecole.

Ad oggi, i risultati ottenuti in laboratorio riguardo l'applicazione delle colture protettive sono promettenti e molto incentivanti. Al contrario, nel lato pratico si presentano criticità

nell'impiego di queste colture batteriche e dei loro metaboliti (batteriocine), in quanto vi sono dei problemi di diffusione di queste molecole negli alimenti, di degradazione enzimatica e di scarsa solubilità nella matrice alimentare.

Si prevede che nel 2050 la popolazione mondiale raggiunga i 9 miliardi di persone. La sostenibilità e il livello di spreco di prodotti continuano a influenzare il percorso dell'industria lattiero-casearia ed è fondamentale che i produttori agiscano pensando alla sostenibilità. Gli sprechi alimentari possono verificarsi in qualsiasi punto della catena alimentare, ma i livelli sono più alti nella fase di consumo e di conservazione casalinga. Le colture protettive estendono la *shelf-life* dei prodotti, riducendo così le perdite, rendendo il mondo più sostenibile e conferendo la possibilità ai produttori di rendere disponibili i propri prodotti in altri mercati.

Le batteriocine sono applicabili sia nella matrice alimentare sia nelle plastiche di confezionamento e rendono il loro utilizzo di buon auspicio per il futuro.

BIBLIOGRAFIA

Y Farkye N. 2004. Cheese technology, International Journal of Dairy Technology, Vol 57, N. 2/3. doi.org/10.1111/j.1471-0307.2004.00146.x.

Muñoz A., Maqueda M., Galvez A., Martínez-Bueno M., Rodríguez A., Valdivia E. 2004. Biocontrol of Psychrotrophic Enterotoxigenic *Bacillus cereus* in a Nonfat Hard Cheese by an Enterococcal Strain–Producing Enterocin AS-48, Journal of Food Protection, Vol. 67, N. 7, p.1517–1521. doi.org/10.4315/0362-028X-67.7.1517

Bogović Matijašić B., K. Rajsćp M., Perko B., Rogelj I. 2007. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in cheese by *Lactobacillus gasseri*, International Dairy Journal 17, 157–166. doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.01.011

Cheong E.Y.L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T.T., Nhiep, N.T., My Ho, H.T., Zwielehner, J., Bansal, N., Turner, M.S. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese, Food Control 46, 91-97. doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.011

O’Sullivan L., Ross R. P., Hill C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality, Biochimie 84, 593–604. doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01457-8

Pérez-Ramos A., Madi-Moussa D., Coucheney F., Drider D. 2021. Current Knowledge of the Mode of Action and Immunity Mechanisms of LAB-Bacteriocins, MDPI, Microorganisms 9, 2107. doi.org/10.3390/microorganisms9102107

Julien M. C., Dion P., Lafrenie`re C., Antoun H., Drouin P. 2008. Sources of Clostridia in Raw Milk on Farms, Applied and Environmental Microbiology, p.6348-6357. doi:10.1128/AEM.00913-08

Cotter P. D., Hill C. and Ross R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nat Rev Microbiol* 3, 777–788. doi.org/10.1038/nrmicro1273

Sobrino-Lopez A., Martin-Belloso O. 2008. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products, *International Dairy Journal* 18, Issue 4, Pages 329-343. doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.009

Rea M. C., Ross R. P., Cotter P. D., Hill C. 2011. Classification of Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria, Djamel Drieder and Sylvie Rebuffat (Editors), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides*, Chapter 3, p. 29-53. doi:10.1007/978-1-4419-7692-5_3

Koutsoumanis K., Allende A., Alvarez-Ordóñez A., Bolton D., Bover-Cid S., Chemaly M., Davies R., De Cesare A., Hilbert F., Lindqvist R., Nauta M., Peixe L., Ru G., Simmons M., Skandamis P., Suffredini E., Cocconcelli P. S., Fernández Escámez P. S., Prieto-Maradona M., Querol A., Sijtsma L., Suarez J. E., Sundh I., Vlak J. M., Barizzone F., Hempen M. and Herman L. 2022. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 15: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2021. *EFSA Journal* 2022; 20(1):7045, 60 pp. doi:10.2903/j.efsa.2022.7045

Braendle J., Domig K. J., Kneifel W. 2016. Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese, *Food Control* 67, p. 96-113. doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.02.038.

Acuña L., Picariello G., Sesma F., Morero R. D., Bellomio A. 2012. A new hybrid bacteriocin, Ent35-MccV, displays antimicrobial activity against pathogenic Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Febs openbio* 2, p. 12-19. doi.org/10.1016/j.fob.2012.01.002

Bartoszewicz M., Hansen B. M., Swiecicka I. 2008. The members of *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk, *Food Microbiology* 25, p.545-564. doi.org/10.1016/j.fm.2008.02.001

Jalil M. T. M., Ibrahim D. 2020. Biological activity of *Lasiodiplodia pseudotheobromae* IBRL OS-64 extracts, an Endophytic fungus isolated from medicinal herb, *Ocimum sanctum* against foodborne diarrhea-caused bacteria, *Pharmacognosy journal* 14, p.897-904. 10.5530/pj.2020.12.127

Proroga Yolande T. R., Capuano F., Castellano S., Giordano A., Mancusi A., Delibato E., Dumontet S., Pasquale V. 2019. Occurrence and toxin gene profile of *Bacillus cereus* in dairy products, *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 9, 58-62. 10.15414/jmbfs.2019.9.1.58-62

Garnier L., Valence F., and Mounier J. 2017. Diversity and Control of Spoilage Fungi in Dairy Products: An Update, *Microorganisms* 5, p.42. 10.3390/microorganisms5030042

Moradi M., Kousheh S. A., Almasi H., Alizadeh A., Guimarães J. T., Yilmaz N., Lotfi A. 2020. Postbiotics produced by lactic acid bacteria: The next frontier in food safety, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19, p. 3390-3415. 10.1111/1541-4337.12613

Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Cotter P. D. 2013. The complex microbiota of raw milk, *FEMS Microbiol Rev* 37, 664-98. 10.1111/1574-6976.12030

Bassi D., Fontana C., Zucchelli S., Gazzola S., Cocconcelli P. S. 2013. TaqMan real time-quantitative PCR targeting the phosphotransacetylase gene for *Clostridium tyrobutyricum* quantification in animal feed, faeces, milk and cheese, *International Dairy Journal* 33, p. 75-82. doi.org/10.1016/j.idairyj.2013.06.008

Drider D., Rebuffat S. 2011. Prokaryotic Antimicrobial Peptides: From Genes to Applications.

Food and Drug Administration (FDA). 2012. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins.

Salo S., Ehavald H., Raaska L., Vokk R., Wirtanen G. 2006. Microbial surveys in Estonian dairies, *LWT - Food Science and Technology* 39, p. 460-471.

Silva C. C. G., Silva P. M. S., Ribeiro C. S. 2018. Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation, *Frontiers in Microbiology* 9, 594.
10.3389/fmicb.2018.00594

Klaenhammer T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiol Rev* 12, 39-85. 10.1111/j.1574-6976.1993.tb00012.x

Jacob F., Lwoff A., Siminovitch A., Wollamn E. 1953. Definition of some terms relative to lysogeny, *Ann Inst Pasteur (Paris)* 84(1), p. 222-4.

Pitt J. I., Hocking A. D. 1999. Fungi and food spoilage