Università degli Studi di Napoli Federico II Dipartimento di Agraria



La "bioconservazione" degli alimenti: strategie e prospettive"

Francesco Villani

Dipartimento di Agraria Sezione di Microbiologia

Qualità e sicurezza degli alimenti



Industrie alimentari

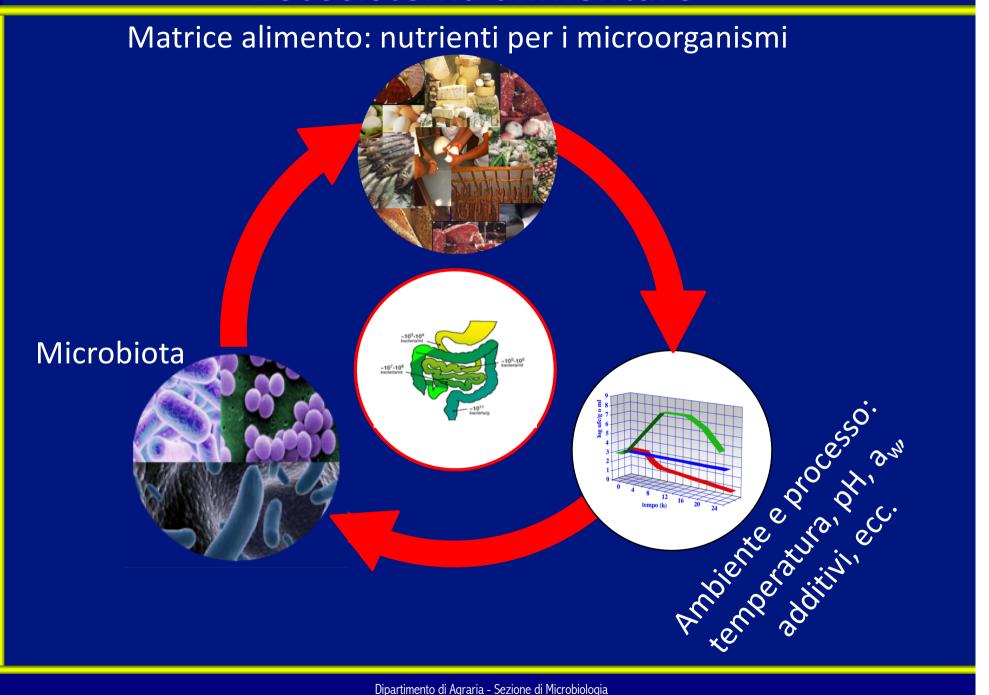


Consumatori





L'ecosistema alimentare

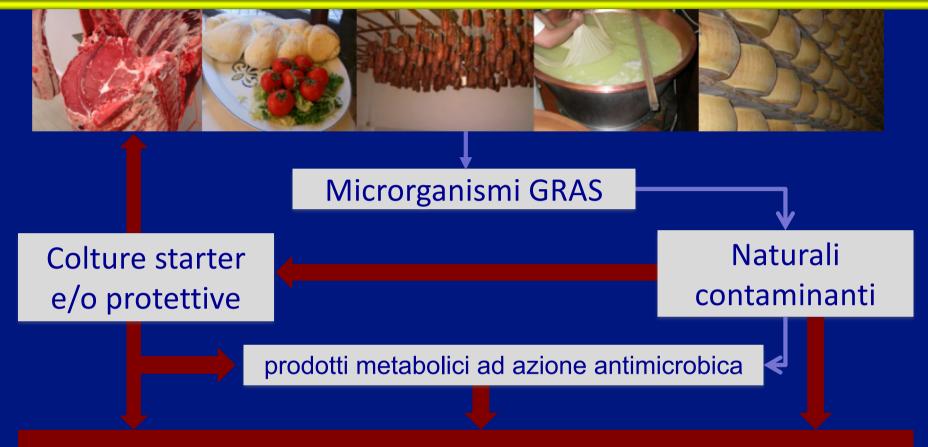


Il microbiota degli alimenti



Università degli Studi di Napoli Federico II

Tecnologie di conservazione degli alimenti: bioconservazione

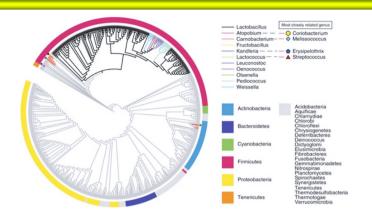


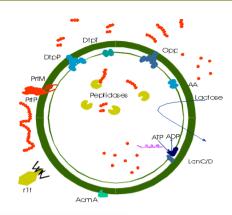
BIOCONSERVAZIONE

impiego di microrganismi "Food Grade" e/o loro metaboliti ad azione antimicrobica, per allungare la shelf life e migliorare la sicurezza degli alimenti



Ruolo multifunzionale dei batteri lattici negli alimenti





Batteri lattici

Fermentazioni alimentari COLTURE STARTER

assicurare l'esito tecnologico del processo produttivo

Conservazione biologica COLTURE PROTETTIVE

controllo di microrganismi indesiderati

Probiotica effetti benefici per la salute

Alterazioni

cambiamenti indesiderati in prodotti alimentari

Malattie

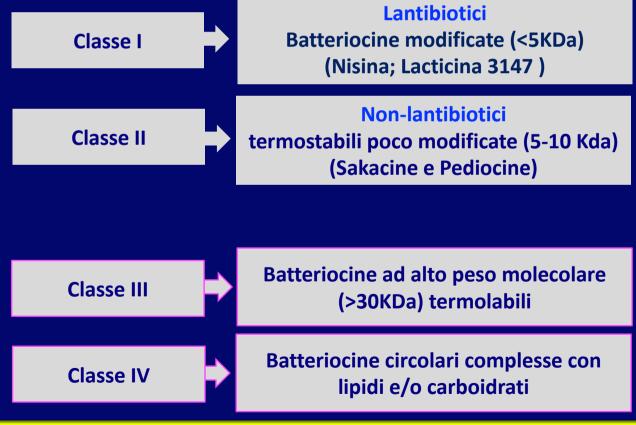
alcuni ceppi potenziali patogeni opportunisti in alcune infezioni cliniche

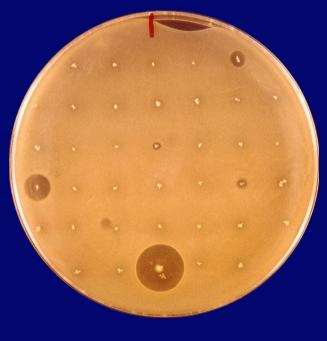


Batteriocine prodotte da batteri lattici

Peptidi sintetizzati ribosomalmente (alcuni modificati posttraduzionalmente) in grado di esercitare attività battericida nei confronti di altre specie batteriche.

Il microrganismo produttore è immune alla sua batteriocina.





Università degli Studi di Napoli Federico II



Modalità di impiego delle batteriocine negli alimenti



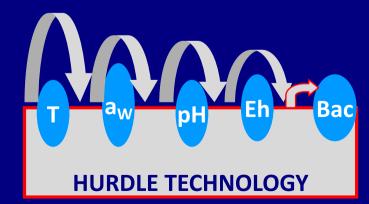
BATTERIOCINE e/o PRODUTTORI

Preparazioni purificate o semi-purificate

Colture vitali di ceppi produttori



Alimenti Film antimicrobici Substrati naturali o alimenti fermentati in cui è cresciuto il ceppo produttore e usati come ingredienti in altri alimenti

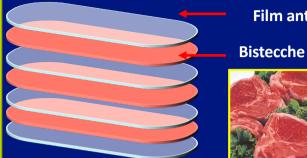


Controllo del microbiota patogeno e alterativo



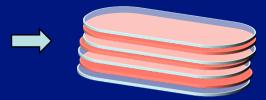
Packaging antimicrobico attivato con Nisina: carne in MAP

Preparazione del packaging









Bistecche impilate e intervallate con film antimicrobico



Compieni	Condizioni di conservazione							
Campioni	atmosfera Iniziale	film inter-fetta¹						
Α	Aria	-						
AF	Aria	film polietilene non attivo						
AAF	Aria	film Antimicrobico HDPE						
МАР	60% O ₂ – 40% CO ₂	-						
MAPF	60% O ₂ – 40% CO ₂	film polietilene non attivo						
MAPAF	60% O ₂ – 40% CO ₂	film Antimicrobico HDPE						

¹ caratteristiche: densità 0.95 g/cm³, PO₂ 2650 cm³/m²/24 h/atm a 23°C.

monitoraggio dopo 0, 1, 7 e 12 giorni di conservazione a 4°C

Microbiota alterativo e diversità di specie

Composti organici volatili

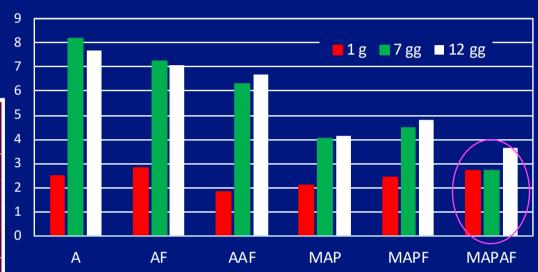
colore e proprietà sensoriali pH, composizione gas



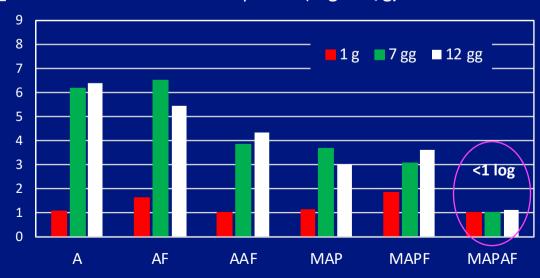
Microbiota alterativo della carne conservata in film antimicrobico e MAP

Condizioni di conservazione Campioni atmosfera Iniziale film inter-fetta1 Aria AF Aria film polietilene non attivo AAF Aria film Antimicrobico HDPE MAP 60% O₂ - 40% CO₂ MAPF film polietilene non attivo 60% O₂ - 40% CO₂ **MAPAF** film Antimicrobico HDPE 60% O₂ - 40% CO₂

Conteggio vitale totale (Log CFU/g)

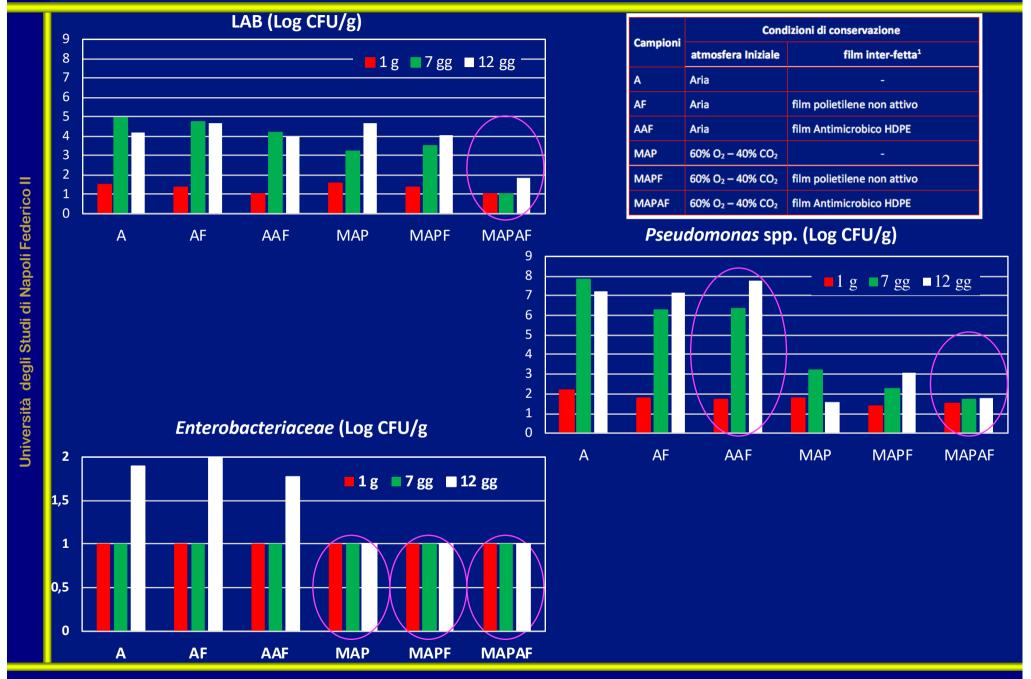


B. thermosphacta (Log CFU/g)





Microbiota alterativo della carne conservata in film antimicrobico e MAP







Identificazione delle specie microbiche della carne conservata in FA e MAP

PCR (regione variabile V6-V8 del 16SrRNA, 450 pb), DGGE (elettroforesi in gradiente denaturante di forza ionica) e sequenziamento; PCR specie-specifica

Specie		Campioni																
		А		AF		AAF		MAP		MAPF			MAPAF					
	1	7	12	1	7	12	1	7	12	1	7	12	1	7	12	1	7	12
Pseudomonas spp.		0	0															
P. fragi	0	0	0		0	0	0	0	0	O	0							
P. lundensis					0	0	0	0	0									
Rahnella aquatilis	0	0	0		0	0		0	0	O	0		0	0				
Carnobacterium spp.	0	0	0		0	0	0	0	0	O	0	0	0	0	0			
C. maltaromaticum	0	0	0		0	0		0	0	O	0	0	0	0	0		0	0
Brochothrix thermosphacta		0	0					0	0		0	0	0		0			
Serratia proteamaculans						0												
Staphylococcus saprophyticus															0			



L'analisi sensoriale evidenziava che l'imballaggio attivo preservava il colore e l'odore tipico della carne fresca per più di 10 giorni

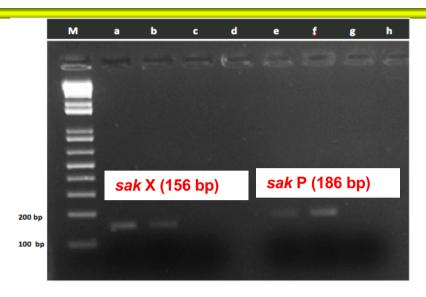
Composti come phenylethylalcohol, nonanal, decanal and ethylbutanoate erano prodotti tra 7 e 12 giorni di conservazione e solo nei campioni conservati in aria

CONCLUSIONE: film antimicrobici e stoccaggio in MAP della carne erano efficaci nel ritardare lo sviluppo delle popolazioni alterative e garantire un allungamento della shelf-life





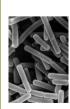
Batteriocine da Lactobacillus curvatus 54M16

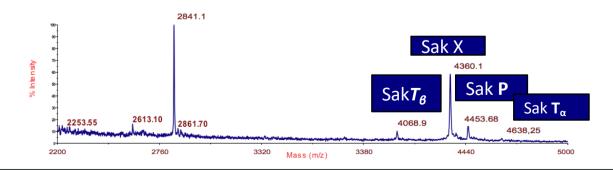




Analisi HPLC e MALDI-ToF/MS delle batteriocine di L. curvatus 54M16

HPLC fraction	Measured MW (Da, monoisotopic)	Expected MW (Da, monoisotopic)	Peptide name			
24.19 min	4360.1	4362.12	Sakacin X (ORF 13)			
31.02 min	4068.9	4070.22	Sakacin T_{θ} (ORF 11)			
32.01 min	2841.1	2842.32	IP-TX (ORF 6)			
35.89 min	4640.6	4644.32	Sakacin T_{α} (ORF 10)			
45.43 min	4453.6	4434.02	Sakacin P variant			





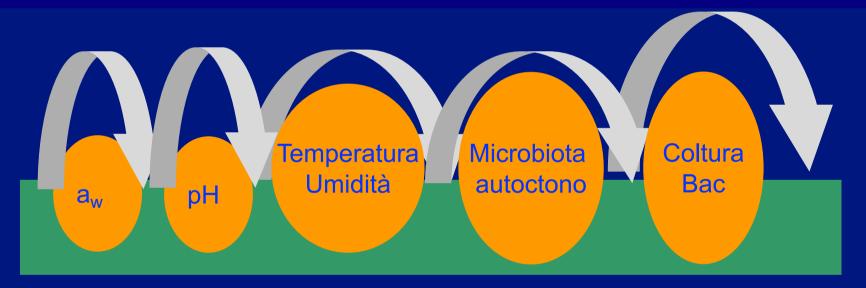




Lactobacillus curvatus 54M16 in insaccati carnei fermentati



Comportamento di L. monocytogenes durante la fermentazione e maturazione di insaccati carnei



- A) Salami controllo (non inoculati)
- C) Salami con Lb. curvatus 54M16

- B) Salami con ceppi di *L. monocytogenes*
- D) Salami con Listeria e Lb. curvatus

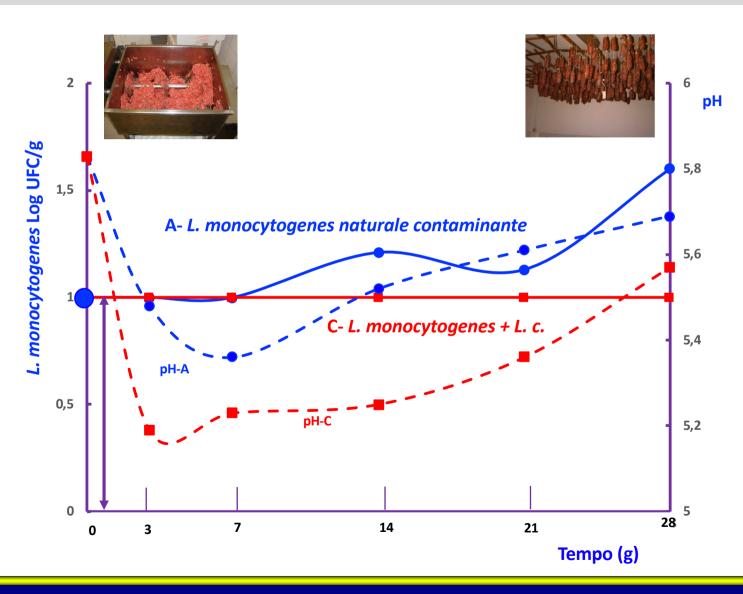


Listeria monocytogenes e pH durante la produzione di salami

Attività antimicrobica di Lb. curvatus 54M16 contro L. monocytogenes contaminante naturale

A) salami controllo (non inoculati)

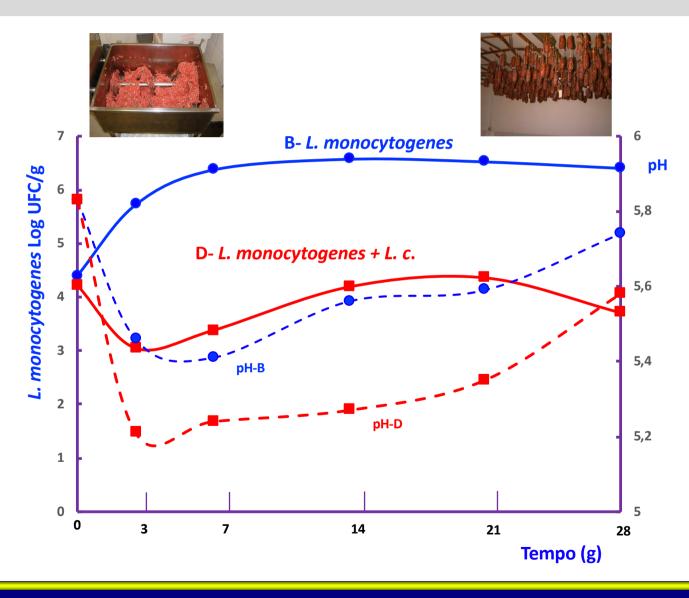
C) salami con Lb. curvatus 54M16





Listeria monocytogenes e pH durante la produzione di salami

Attività antimicrobica di Lb. curvatus 54M16 contro L. monocytogenes aggiunta alla carne
B) salami con ceppi di Listeria monocytogenes
D) salami con Listeria e Lb. curvatus

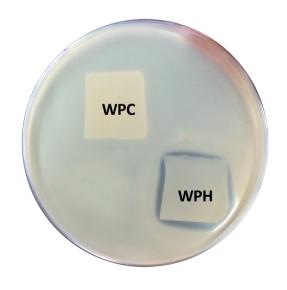


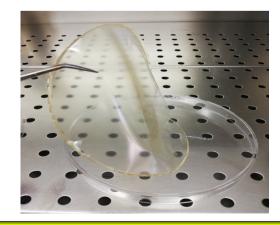


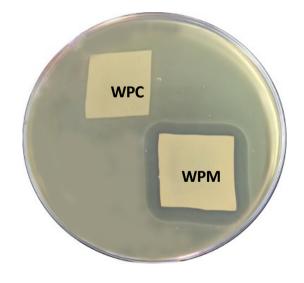
L. curvatus 54M16 in film edibili a base di sieroproteine

In questa applicazione il ceppo di *L. curvatus* 54M16 produttore di sakacine era incluso in film a base di sieroproteine del latte con aggiunta di nutrienti.

I film erano caratterizzati per le loro proprietà chimico-fisiche, meccaniche e di permeabilità e per le loro caratteristiche antimicrobiche.



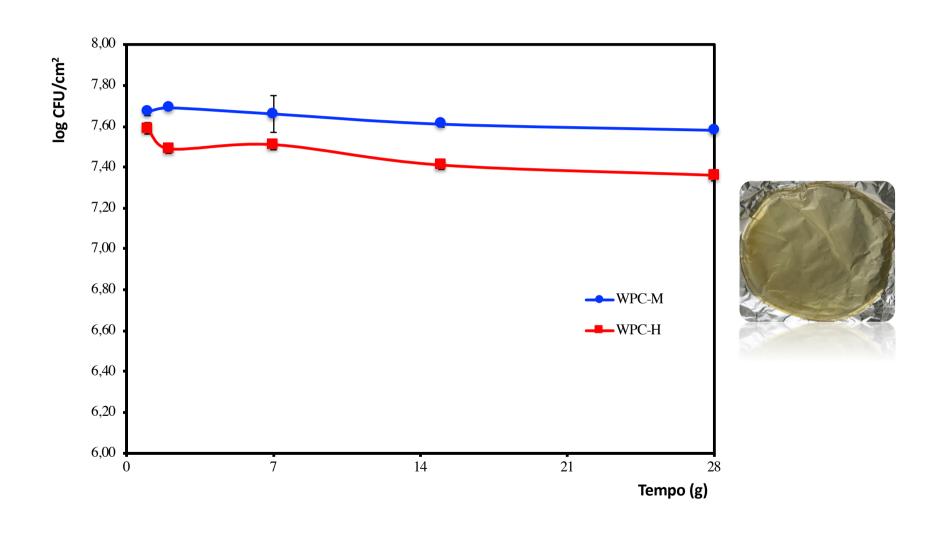






L. curvatus 54M16 in film edibili a base di sieroproteine

Vitalità di of *L. curvatus* 54M16 in film edibili conservati a 4° C







L. curvatus 54M16 in film edibili a base di sieroproteine

Attività antimicrobica dei film contro *L. innocua* 1770 durante la conservazione a 4°C

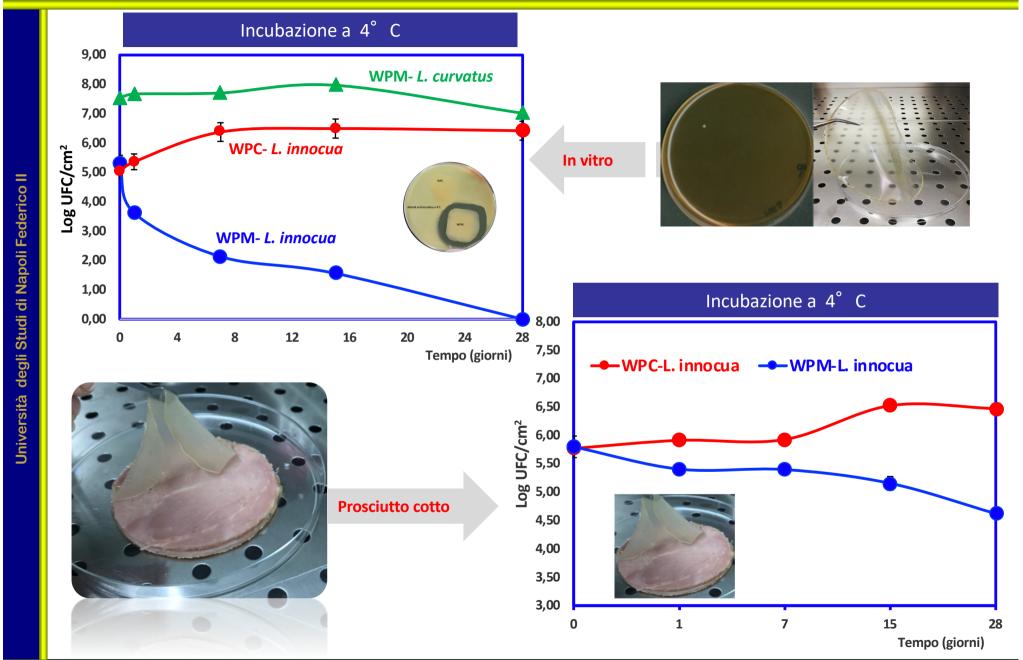
	Aree di inibizione (cm²)									
WPC	W	PM	WPH							
30°C and 10°C	30°C	10°C	30°C	10°C						
no inibizione	9.00±0.25 ^{Aa}	12.96±0.19 ^{Ba}	5.29±0.13 ^{Ca}	7.84±0.08 ^{Da}						
no inibizione	8.88±0.55 ^{Ab}	12.11±0.27 ^{Ba}	4.92±0.39 ^{Cb}	7.72±0.13 ^{Da}						
no inibizione	9.00±0.12 ^{Aa}	12.96±0.15 ^{Ba}	4.84±0.05 ^{cb}	6.76±0.14 ^{Dc}						
no inibizione	9.12±0.32 ^{Aa}	12.39±0.39 ^{Ba}	4.66±0.26 ^{Cc}	6.65±0.24 ^{Dc}						
	30°C and 10°C no inibizione no inibizione no inibizione	WPCW30°C and 10°C30°Cno inibizione9.00±0.25Aano inibizione8.88±0.55Abno inibizione9.00±0.12Aa	WPC WPM 30°C and 10°C 30°C 10°C no inibizione 9.00±0.25 ^{Aa} 12.96±0.19 ^{Ba} no inibizione 8.88±0.55 ^{Ab} 12.11±0.27 ^{Ba} no inibizione 9.00±0.12 ^{Aa} 12.96±0.15 ^{Ba}	WPC WPM W 30°C and 10°C 30°C 10°C 30°C no inibizione 9.00±0.25 ^{Aa} 12.96±0.19 ^{Ba} 5.29±0.13 ^{Ca} no inibizione 8.88±0.55 ^{Ab} 12.11±0.27 ^{Ba} 4.92±0.39 ^{Cb} no inibizione 9.00±0.12 ^{Aa} 12.96±0.15 ^{Ba} 4.84±0.05 ^{Cb}						

Esempi di aree inibizione di film dopo 15 giorni di conservazione a 10°C

WPC, controllo; WPM, film con Lb. curvatus 54M16 e mMRS; WPH, film preparati solo con Lb. curvatus 54M16



Attività antimicrobica dei film contro L. innocua in vitro e su prosciutto cotto





Batteriocine come bioconservanti alimentari

VANTAGGI

SVANTAGGI

- Ceppi produttori e batteriocine sono normali costituenti della dieta umana
- Non alterano l'ecologia del tratto digestivo (inattivazione da proteasi gastriche e pancreatiche)
- 🙂 Termostabili
- Attive a bassi pH
- Ceppi produttori: bassi costi di impiego

- Azione (in genere) solo contro batteri Gram-positivi
- Diffusione nella fase organica grassa dell'alimento (molecole idrofobiche)
- Disattivazione da enzimi
- Selezione di mutanti spontanei resistenti
- Preparazioni purificate:
- impiego regolamentato
- produzione e purificazione costosa



Conclusioni

Nuovi sviluppi dalla ricerca applicata

- Ricerche su dati relativi alla produzione e la concentrazione di batteriocine nel normale ambiente ecologico del produttore
- Maggiori conoscenze sulla distribuzione spaziale e le interazioni delle specie microbiche nell'alimento
- Estendere la comprensione degli effetti dei fattori ecologici sulla colonizzazione dei ceppi produttori negli alimenti
- Esplorazione dei genomi dei microrganismi provenienti da ambienti poco esplorati che potrebbero essere un serbatoio di nuove batteriocine



La "bioconservazione" degli alimenti: strategie e prospettive"

Bibliografia

Casaburi, A., Di Martino, V., Ferranti, P., Picariello, L., Villani, F. (2016) Technological properties and bacteriocins production by Lactobacillus curvatus 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. *Food Control*, 59, 31-45.

Chikindas, M.L., Weeks, R. Drider, Chistyakov, D.C.A., Dicks, L.M.T. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. Current Opinion Biotechnology. 49, 23–28.

Giello M., La Storia A., De Filippis F., Ercolini D., Villani F. (2018) Impact of Lactobacillus curvatus 54M16 on microbiota composition and growth of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages. Food Microbiology 72, 1-15.

La Storia, A., Di Giuseppe, F.A., Volpe S., Oliviero V., Villani F., Elena Torrieri E. (2020). Physical properties and antimicrobial activity of bioactive film based on whey protein and *Lactobacillus curvatus* 54M16 producer of bacteriocins. Food Hydrocolloids 108. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105959

La Storia, A., Ferrocino, I., Torrieri, E., Di Monaco, R., Mauriello, G., Villani, F., Ercolini, D. (2012) A combination of modified atmosphere and antimicrobial packaging to extend the shelf-life of beefsteaks stored at chill temperature. *International Journal of Food Microbiology* 158, 186-194.

Mauriello G., Villani, F. (2012) Bacteriocins in plastics. In: J.M. Lagaron, M.J. Ocio, A. Lopez-Rubio, Antimicrobial polymers, pg. 117-158, WILEY Ed. (USA), ISBN 0470598220-9780470598221.

O'Connor, P.M., Kuniyoshi, T.M., Oliveira R.P.S. Hill, C., Ross R.P., Cotter, P.D. (2020) Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. Current Opinion in Biotechnology 2020, 61, 160–167



La "bioconservazione" degli alimenti: strategie e prospettive"

Ringraziamenti

Colleghi della sezione di microbiologia e del Dipartimento di Agraria Colleghi di altri Atenei e Istituti di Ricerca

Grazie per l'attenzione

