

## **Dottorato**

**Titolo** Uso funzionale e biotecnologico di lattobacilli produttori di acido butirrico in latte e altre matrici alimentari

**Proponente tutor** Romano Raffaele

**Cotutor** Aponte Lara

**Obiettivi del progetto di ricerca nel triennio e collaborazioni interdisciplinari**  
(max 2000 caratteri spazi inclusi)

La fermentazione dell'acido butirrico è un processo complesso e difficile da controllare, poiché inibito dal prodotto finale. Numerosi ceppi microbici, appartenenti a generi diversi, sono stati isolati da molteplici habitat per la produzione di acido butirrico, ma i membri del genere *Clostridium* sono i più ampiamente studiati dacché in grado di utilizzare varie fonti di carbonio.

La capacità butirrogena in specie del genere *Lactobacillus* è stata raramente oggetto di studio. In *Lb. plantarum*, tale caratteristica si è dimostrata altamente dipendente dal tipo di substrato e finora non è stata assegnata a nessuna specifica via metabolica. Recentemente, è stata individuata siffatta capacità in un ceppo di tale specie in terreni di crescita per cellule umane ed è stato delineato un percorso metabolico mai precedentemente descritto per la produzione di acido butirrico. Nell'intestino umano, l'acido butirrico è il principale prodotto finale della fermentazione microbica di fibre alimentari non digerite e la sua produzione gioca un ruolo chiave nell'omeostasi intestinale.

Durante una precedente indagine, otto lattobacilli, tutti appartenenti alla collezione DSZM GmbH, sono stati valutati per la capacità di produrre acido butirrico. Inoltre, sono state stabilite le condizioni ottimali per la produzione da latte vaccino e d'asina.

I LAB possiedono lipasi intracellulari ed esterasi ed è noto che *Lb. plantarum* possiede lipasi intracellulari ceppo-specifiche ed esterasi in grado di idrolizzare gli esteri contenenti acidi grassi C4-C6, presenti nel grasso del latte. Secondo i risultati, l'attività di alcuni ceppi di *Lb. plantarum* è più elevata sulla tributirina e diminuisce progressivamente quando la lunghezza della catena degli acidi grassi aumenta passando dalla tricaprina alla tripalmitina, mentre l'idrolisi della trioleina è quasi assente.

In tal ottica, la finalità del progetto di dottorato proposto è di indagare ulteriormente sull'origine biosintetica dell'acido butirrico in latte e altre matrici alimentari, al fine di definire un uso funzionale e biotecnologico di uno o più ceppi batterici nell'industria alimentare.

**Elementi di innovazione e/o originalità del progetto rispetto allo stato dell'arte**  
(max 2000 caratteri spazi inclusi)

L'acido butirrico è un elemento cruciale per la produzione di sostanze chimiche di rilievo industriale. Commercialmente, l'acido butirrico è prodotto per via chimica a partire dal petrolio grezzo come materia prima. L'acido butirrico di origine biologica costituisce argomento di notevole rilievo scientifico, oltre che applicativo per le potenziali ricadute in campo alimentare e farmaceutico.

Agli acidi grassi a catena corta sono state attribuite proprietà anti-infiammatorie grazie alla capacità di sopprimere l'attività di mediatori che scatenano reazioni infiammatorie; in particolare modo, l'acido butirrico controlla la risposta immunitaria regolando l'attività dei linfociti T.

Studi recenti hanno evidenziato che nelle persone affette da diabete di tipo 1 sono assenti alcuni batteri del microbiota intestinale, ovvero quelli responsabili della produzione di acido butirrico. Per sopperire a tale mancanza è stata suggerita l'integrazione di butirrato. Altri importanti studi condotti sull'acido butirrico ne individuano le potenzialità nella lotta al cancro con specifico riferimento al carcinoma del colon-retto.

Diversi sforzi sono stati profusi per rendere economicamente sostenibile la produzione di acido butirrico per via fermentativa, adoperando materie prime eccedentarie e poco costose, oltre che esplorando strategie di fermentazione ad alta efficienza. Diverse tecniche di successo hanno previsto un approccio basato sull'impiego di metodi di ingegneria metabolica.

I protocolli sviluppati sono prevalentemente basati sull'uso di specie di *Clostridium*. Attualmente, pochissime ricerche si sono focalizzate su specie non appartenenti ai Clostridi, e ciò costituisce senz'altro un impedimento al trasferimento delle acquisizioni all'industria alimentare.

I risultati scientifici del presente progetto porteranno ad una migliore comprensione della profonda versatilità metabolica di cui sono capaci i lattobacilli. Inoltre, l'ottimizzazione della fermentazione in ceppi QPS aprirà le porte allo sviluppo di una nuova categoria di alimenti funzionali.

### **Disponibilità fondi 10K€**

#### **Collaborazioni con istituzioni straniere**

(max 500 caratteri spazi inclusi)

Abertay University- Division of Food and Drink

Area di intervento: Tecnologie e processi di lavorazione innovativi per il riutilizzo degli scarti dell'industria alimentare

Wageningen University & Research- Food Quality & Design

Area di intervento: Produzione sostenibile - inclusi percorsi di produzione biologica e biotecnologica e nuovi principi di processo e sistemi di produzione

#### **Collaborazioni con istituzioni nazionale**

Probiotical Novara

**Ph.D**  
**Food Science**

**Title: Functional and biotechnological use of lactobacilli as producers of butyric acid in milk and other food matrices**

**Supervisor:** Romano Raffaele  
**Co-Supervisor:** Aponte Lara

### **Research project objectives in three years and interdisciplinary collaborations**

Butyric acid fermentation is a complex process that is hard to control since it is inhibited by the final reaction product. Various microbial strains belonging to different genera have been isolated from different habitats for their ability to produce butyric acid. Among them, strains of the genus *Clostridium* are the most widely studied since able to use various carbon sources.

The butyrogenic capability of microorganisms belonging to the genus *Lactobacillus* (LAB) has been rarely studied. In *Lb. plantarum*, the production of butyric acid seems to be highly dependent on the substrate type and not related to any specific metabolic pathway. Recently, the capability to produce butyric acid in growth media containing human cells has been demonstrated and a new metabolic pathway for butyric acid production has been outlined. In the human gut, butyric acid is the main end-product of intestinal microbial fermentation of undigested dietary fibers and its production plays a key role in the intestinal homeostasis.

During a previous survey, eight lactobacilli, all belonging to the DSZM GmbH collection, were evaluated for the ability to produce butyric acid. Moreover, the optimal conditions for the production in cow's and donkey's milk were established.

LAB own intracellular lipases and esterases. It is known that *Lb. plantarum* possesses strain-specific intracellular lipases and esterases able to hydrolyse esters containing C4 to C6 fatty acids, such those occurring in the milk fat. According to these outcomes, the activity of some *Lb. plantarum* strains is highest on tributyrin and decreases progressively as the length of the fatty acid chain increases. In fact, the production of butyric acid declines from tricapyrin to triolein, where the hydrolysis of is almost absent.

Clearly, the intention of the PhD project is to investigate on the biosynthetic origin of butyric acid in different food matrices in order to define a functional and biotechnological use of some bacterial strains interesting for the food industry.

### **Innovation factors and / or originality of the project compared to the state of the art**

Butyric acid has an important role in food and pharmaceutical industry. Commercially, it is produced by a chemical pathway starting from crude oil as the

raw material. Nowadays, the demand for biological production of butyric acid is increasing.

Short chain fatty acids are known for their anti-inflammatory properties. Particularly, butyric acid controls immune-response by regulating T-lymphocytes activity.

Recent studies have highlighted that in people with type 1 diabetes some intestinal bacteria, responsible of butyric acid production, are absent. Other studies show butyric acid protection against cancer.

Several efforts have been made to make butyric acid production economically feasible, by using abundant/inexpensive raw materials and fermentation strategies. Several successful techniques for strain improvements have been developed through metabolic engineering methods. Nevertheless, all developed protocols, are basically based on the use of Clostridium species and so there is no chance for their application in the food industry. Currently, very few searches are focused on non-Clostridial species.

Scientific findings of the present project will lead to a deeper understanding of the metabolic versatility of LAB. Moreover, the optimization of fermentation in QPS lactobacilli will open the gates to the development of a new category of functional foods.

**Funds availability:** 10K€

### **Collaborations with foreign institutions**

Abertay University- Division of Food and Drink

**Intervention area:** Technology and innovation process for reuse of food factories waste

Wageningen University & Research- Food Quality & Design

**Intervention area:** Eco-friendly production, including biological and biotechnological strategies and new principles / production systems

### **Collaborations with national institutions**

Probiotical Novara