

## Ph.D

**Title:** Functional and biotechnological use of lactobacilli as producers of butyric and pyroglutamic in food matrices

**Proposing tutor:** Romano Raffaele

**Co-Supervisor:** Aponte Maria

### **Objectives of the research project and interdisciplinary collaborations**

Butyric and pyroglutamic acids may exert significant beneficial effects on human health. Commercially, butyric acid is produced using a chemical route starting from crude oil as the raw material. The production of butyric acid from a biological origin, in spite of the significant demand for food and pharmaceutical applications, is still a complex process hard to control.

As for butyric acid, several microbial strains belonging to different genera have been isolated from different habitats for their ability to produce butyric acid. In spite of this, members of the genus *Clostridium* are still the most widely studied since able to use various carbon sources.

The butyrogenic capability of lactobacilli, especially for the *Lb. plantarum* species, has been rarely studied. In *Lb. plantarum*, the production of butyric acid has been proved to be highly dependent on the substrate type and has been not related yet to any specific metabolic pathway.

In such light, the intention of this PhD project is to begin by a screening aimed to explore the butyrogenic ability of commercial probiotic strains as well as of LAB cultures isolated from food stuffs and belonging to the cultures collection of the Microbiology division. Production will be evaluated in media lipids- and/or polysaccharides-added. Once optimal conditions for metabolites production have been set, the metabolic pathway and its genetic basis will be investigated. In parallel, butyrate production by means of fermentation will be evaluated in food matrices to be settled. The goal is the definition of a functional and biotechnological use of some bacterial strains interesting for the food industry.

Of course, the kind of survey here proposed will require a multidisciplinary approach to be carried out. Microbiological analyses are needed for the search, the selection and the management of microbial cultures as well as for the strains' tracking along functional foods production and storage. On the other hand, proper diagnostic tools are required for the metabolites detection and for the management of the technological process of food

production as well as for the assessment of the storage conditions and for the sensory evaluation of the foods.

### **Innovation and originality of the project in relation to the state of the art**

Butyric and pyroglutamic acids exert significant beneficial effects on human health. Butyric acid controls the immune response by regulating T lymphocytes activity. Recent studies highlighted that in people with type 1 diabetes, some intestinal bacteria, responsible for butyric acid production, are absent. According to other surveys, butyric acid may protect against cancer.

Pyroglutamic acid is a protector of brain cells and is able to improve cognitive function and learning. It plays an important role in the amino acids circulation in the brain and exerts its protective effects mainly by eliminating excess glutamate.

Several efforts have been made to make butyric and pyroglutamic acid production economically feasible, by using abundant/inexpensive raw materials coupled to high-efficiency fermentation strategies. Several successful techniques adopted for strains' improvement have been developed through metabolic engineering methods. Nevertheless all developed protocols are, especially for butyric acid, essentially based on the use of *Clostridium* species and this prevents the application in the food industry. Currently, very few searches are focused on non-Clostridial genera.

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 as those occurring in the milk fat. According to these outcomes, the activity of some *Lb. plantarum* strains is higher on tributyrin, and progressively decreases as the length of the fatty acid chain increases. In fact, the production of butyric acid declines from tricaprilyn to triolein, where the hydrolysis of is almost absent.

As far as pyroglutamic acid is concerned, it is present both in ripened cheeses and in fermented beverages. It is formed during fermentation carried out by thermophilic LAB used as starters.

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 pave the way to the development of a new category of functional foods.

### **Grant availability**

- FEP Campania - Riduzione dell'impatto ambientale di antibiotici di sintesi ad effetto inibitorio della crescita batterica in *Sparus Aurata* (500000 €)

- Contratto di sviluppo Sweet Campania - Prodotti dolciari innovativi a ridotto contenuto di grassi saturi con e senza glutine CDSPAC\_05 (170000 €)
- Contratto di sviluppo ProFIQua "PROdotti da Forno Innovativi di QUALità", (prot. CDS000487) (752000 €)
- Progetto- Frutta vellutata prebiotica ricca in antiossidanti naturali, multivitaminica ad alto valore nutrizionale, con riduzione notevole di micotossine - bando HORIZON2020 Fondo di crescita sostenibile, Sportello Agrifood DM 05/03/2018 (200000 €)
- Progetto- Derivati industriali del pomodoro prebiotici 100% integrali -bando HORIZON2020 Fondo di crescita sostenibile, Sportello Agrifood DM 05/03/2018 (200000€)-
- Accordo di sviluppo POMOIN- Derivati del pomodoro realizzati a base di passata integrale di pomodoro ad alto valore nutrizionale (mise.AOO\_IAI.REGISTRO UFFICIALE.U.0251432.13-07-2018) (355000 €)
- Progetto SUPER - SURgelati, Prebiotici, prEcotti in foRno - bando HORIZON2020 Fondo di crescita sostenibile, Sportello Agrifood DM 05/03/2018 (200000€)-
- Progetto: "Miglioramento e controllo della produzione di pesce salinato adoperando colture selezionate di archeobatteri alofili - ArcAlici" 360.577,60 €
- Progetto "faBBriCA - Birra Biologica Campana" - POR FESR Campania 2014/2020 O.S. 1.1 -(82.768,00€)

### **Collaborations with foreign institutions**

- Abertay University- Division of Food and Drink

**Intervention area:** Technology and innovation process for reuse of food factories waste  
University of Valencia (Spain)- Faculty of Pharmacy

**Intervention area:** Nutrition and food science area  
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

### **Dottorato**

**Titolo:** Uso funzionale e biotecnologico di lattobacilli produttori di acido butirrico e acido piroglutammico in prodotti alimentari fermentati

**Proponente tutor:** Romano Raffaele

**Cotutor:** Aponte Maria

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

L'acido butirrico e piroglutammico hanno dimostrato di poter esercitare notevoli effetti benefici sulla salute umana. Commercialmente, l'acido butirrico è prodotto per via chimica, a partire dal petrolio grezzo, mentre la produzione acido butirrico di origine biologica, nonostante le numerose possibili ricadute in ambito alimentare e farmaceutico, resta un processo complesso e difficile da controllare.

Nel caso dell'acido butirrico, numerosi ceppi microbici, appartenenti a generi diversi, sono stati isolati da molteplici habitat in funzione della capacità butirrogena, ma in forza della versatilità metabolica, restano esponenti del genere *Clostridium* quelli più ampiamente studiati.

I rari studi concernenti la produzione di acido butirrico in lattobacilli, e segnatamente nella specie *Lb. plantarum*, hanno dimostrato che tale capacità è strettamente dipendente dal tipo di substrato e non è stata finora assegnata a nessuna specifica via metabolica.

In tale ottica, il percorso del progetto di dottorato qui proposto prende avvio con lo screening della capacità butirrogena in ceppi probiotici commerciali e batteri lattici isolati da matrici alimentari, appartenenti alla collezione della sez. di Microbiologia. La produzione sarà valutata in substrati contenenti o meno una fonte lipidica e/o polisaccaridica. Una volta individuate le condizioni ottimali per la produzione del metabolita in un pool di batteri lattici, si punterà da una parte alla comprensione del pathway metabolico e delle basi genetiche del medesimo e, in parallelo, la produzione per via fermentativa del butirrato sarà valutata in matrice alimentare, al fine di definire un uso funzionale e biotecnologico di uno o più ceppi batterici nell'industria alimentare.

Naturalmente il tipo di indagine proposto richiede un approccio necessariamente multidisciplinare che vede coinvolte le competenze microbiologiche nell'individuazione, selezione e gestione delle colture microbiche, oltre che nel monitoraggio delle stesse durante la produzione e conservazione degli alimenti funzionali e naturalmente di un apporto diagnostico per il rilevamento dei metaboliti e per la gestione del processo

tecnologico di produzione, conservazione e valutazione sensoriale dell'alimento arricchito in butirrato.

### **Elementi di innovazione e/o originalità del progetto rispetto allo stato dell'arte**

(max 2000 caratteri spazi inclusi)

L'acido butirrico e piroglutammico hanno notevoli effetti benefici sulla salute umana.

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.

L'acido piroglutammico è, invece, un protettore delle cellule cerebrali in grado di incidere positivamente sulla funzione cognitiva e l'apprendimento, e svolge un ruolo importante nella circolazione di tutti gli aminoacidi nel cervello ed esercita i suoi effetti protettivi principalmente eliminando dal cervello l'eccesso di glutammato.

Diversi sforzi sono stati profusi per rendere economicamente sostenibile la produzione di acido butirrico e piroglutammico per via fermentativa, adoperando materie prime eccedentarie e poco costose, coniugate a strategie di fermentazione ad alta efficienza.

I protocolli di ingegneria metabolica sviluppati, soprattutto per l'acido butirrico, sono prevalentemente basati sull'uso di specie di *Clostridium*. Attualmente, pochissime ricerche si sono focalizzate su generi diversi, e ciò costituisce senz'altro un impedimento al trasferimento delle acquisizioni all'industria alimentare e farmaceutica.

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.

Per quanto concerne l'acido piroglutammico, esso è presente in molte varietà di formaggi, soprattutto stagionati, e in bevande fermentate. Esso si forma durante la fermentazione attuata da batteri lattici termofili mediante una via metabolica non ancora del tutto definita.

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**

### Progetti approvati

- FEP Campania - Riduzione dell'impatto ambientale di antibiotici di sintesi ad effetto inibitorio della crescita batterica in Sparus Aurata -progetto retrospettivo coerente con la misura 3.5 del FEP Campania 2007–2013 di cui all'avviso pubblico del D.D. n. 854 del 22.12.2015 (500K€)
- Contratto di sviluppo Sweet Campania - Prodotti dolciari innovativi a ridotto contenuto di grassi saturi con e senza glutine CDSPAC\_05 Durata mesi 36 -2016-2019 (170K€)
- Contratto di sviluppo ProFIQua "PROdotti da Forno Innovativi di QUALità", (prot. CDS000487) Durata mesi 36: 01/04/19 - 31/03/22 (752K€)
- Progetto- Frutta vellutata prebiotica ricca in antiossidanti naturali, multivitaminica ad alto valore nutrizionale, con riduzione notevole di micotossine - bando HORIZON2020 Fondo di crescita sostenibile, Sportello Agrifood DM 05/03/2018 Data presentazione: 21/01/2019 Durata mesi 36 (200K€)
- Progetto- Derivati industriali del pomodoro prebiotici 100% integrali -bando HORIZON2020 Fondo di crescita sostenibile, Sportello Agrifood DM 05/03/2018 Data presentazione: 21/01/2019- Durata mesi 36 (200K€)-
- Accordo di sviluppo POMOIN- Derivati del pomodoro realizzati a basa di passata integrale di pomodoro ad alto valore nutrizionale (mise.AOO\_IAI.REGISTRO UFFICIALE.U.0251432.13-07-2018) Durata mesi 36: 7/01/2019 -31/12/2021 (355K€)
- Progetto SUPER - SURgelati, Prebiotici, prEcotti in foRno - bando HORIZON2020 Fondo di crescita sostenibile, Sportello Agrifood DM 05/03/2018 Data presentazione: 21/01/2019- Durata mesi 36 (200K€)-
- Progetto: "Miglioramento e controllo della produzione di pesce salinato adoperando colture selezionate di archeobatteri alofili - ArcAlici" progetto retrospettivo coerente

con la misura 3.5 del FEP Campania 2007–2013 di cui all'avviso pubblico del D.D. n. 854 del 22.12.2015 - Punteggio 44,5/100 Importo ammesso al FEP Campania 360,577K€

- Progetto "faBBriCA - Birra Biologica Campana" - POR FESR Campania 2014/2020 O.S. 1.1 – Sostegno alle imprese nella realizzazione di studi di fattibilità (Fase 1) e progetti di trasferimento tecnologico (Fase 2) coerenti con la ris 3. Decreto Dirigenziale n. 5 del 06/02/2019 - Soggetto Proponente AMPLIA srl – Durata mesi 6 (12-06-2019/12-12-2019) - Contributo 82,768K€

### **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
- University of Valencia (Spain)- Faculty of Pharmacy  
Area di intervento: Nutrizione umana e scienze alimentari
- 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

