

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”**



**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA**

XXXIV CICLO
(2018-2021)

**Progettazione e caratterizzazione di nuovi composti
antimicrobici per applicazioni nel settore alimentare**

*(Design and characterization of novel antimicrobial agents
for food applications)*

PhD student:

Dott.ssa Bruna Agrillo

Tutor (CNR):

Dott.ssa Gianna Palmieri

Coordinatore:

Prof. Sergio Esposito

Tutor (UNINA):

Prof. Salvatore Cozzolino

INDICE

INTRODUZIONE	1
1. Sicurezza alimentare e rischio microbiologico.....	1
1.1. Malattie trasmesse dagli alimenti	2
1.2. Batteri patogeni e deterioranti degli alimenti	4
1.3. Lieviti e muffe	13
2. Conservazione degli alimenti	16
2.1. Processi chimici.....	17
2.2. Processi fisici.....	19
2.3. <i>Antimicrobial-packaging</i>	21
3. I Peptidi antimicrobici	24
3.1. Struttura dei peptidi antimicrobici.....	24
3.2. Meccanismo d'azione.....	28
3.3. Progettazione di nuovi peptidi antimicrobici	33
SCOPO DELLA TESI	35
MATERIALI E METODI.....	37
1. Produzione dei peptidi	37
2. Analisi spettroscopiche.....	37
2.1. Spettroscopia di fluorescenza	37
2.2. Dicroismo circolare	38
3. Analisi della stabilità in alto sale	38
4. Test di vitalità cellulare	39
5. Analisi della morfologia cellulare	39
6. Test di attività antimicrobica	40
7. Test dell'attività antibiofilm	41
8. Attivazione al plasma del film polimerico	41
9. Caratterizzazione della superficie polimerica attivata.....	41
10. Immobilizzazione dei peptidi singoli e in miscela sui polimeri pre-attivati.....	42
11. Analisi mediante tecniche microscopiche dei peptidi immobilizzati su polimeri di polipropilene.....	42
11.1. Stereomicroscopia di superficie.....	42
11.2. Microscopia confocale a scansione laser.....	42

12. Analisi della resa di legame.....	43
13. Analisi di rilascio.....	43
14. Test di attività antimicrobica su matrice alimentare.....	44
14.1. Preparazione della matrice lattiero-casearia	44
14.2. Preparazione della matrice a base di carne	44
14.3. Preparazione della matrice ittica.....	44
14.4. Analisi microbiologiche	45
15. CHALLENGE TEST per <i>Listeria monocytogenes</i>	46
16. Determinazione del colore dei filetti di salmone.....	47
17. Analisi TBARS, TVB-N (Azoto basico volatile totale) e TMA (trimetilammina).....	47
18. Analisi sensoriale.....	48

RISULTATI E DISCUSSIONE..... 49

1. Analisi della stabilità strutturale dei peptidi e delle miscele da impiegare per la funzionalizzazione dei polimeri per le diverse tipologie di prodotto alimentare	49
2. Analisi di attività antimicrobica dei peptidi singoli e in miscela	61
3. Analisi dell'attività antibiofilm dei peptidi singoli e in miscela	65
4. Saggi di tossicità dei peptidi e delle miscele su sistemi cellulari specifici.....	67
5. Attivazione e immobilizzazione dei singoli peptidi e loro miscele su polimeri di polipropilene attraverso la tecnologia Openair-Plasma®.....	70
6. Resa e rilascio dei peptidi post funzionalizzazione	72
7. Analisi della popolazione microbica delle diverse matrici alimentari (lattiero-casearia, carnea e ittica) conservate con polimeri di polipropilene coniugati a peptidi antimicrobici.....	76
8. CHALLENGE TEST su hamburger bovino e salmone fresco.....	88
9. Analisi colorimetrica strumentale dei tranci di salmone conservati in presenza dell'imballaggio innovativo.....	91
10. Valutazione dell'effetto del <i>packaging</i> antimicrobico sui parametri chimici nei tranci di salmone	93
11. Analisi sensoriali su tranci di salmone conservati con <i>packaging</i> antimicrobico	96

CONCLUSIONI..... 98

BIBLIOGRAFIA..... 100

PUBBLICAZIONI..... 115

Introduzione

1. Sicurezza alimentare e rischio microbiologico

Con il passare degli anni, il tema della “sicurezza alimentare” è sempre più sentito dalla popolazione in quanto, i numerosi scambi commerciali con paesi in cui le normative in materia alimentare e agricola non sono necessariamente stringenti come quelle vigenti in Europa, possono mettere a rischio la salute pubblica. Inoltre, le mutate abitudini alimentari, non più incentrate su uno stretto rapporto tra produzione e consumo, dove gioca un ruolo fondamentale la conservazione degli alimenti, rendono necessari numerosi interventi che mirino a garantire il mantenimento dell'integrità dell'alimento. A tal proposito, già nel 1963 è stata istituita una commissione di esperti scientifici (JEMRA) amministrata congiuntamente dalla FAO (*Food and Agriculture Organization*) e dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità), due organizzazioni che operano a livello mondiale in materia di sicurezza degli alimenti, che ha sviluppato un programma volto a proteggere la salute dei consumatori chiamato *Codex Alimentarius*. In tempi più recenti, in Europa, a seguito della dichiarazione del commissario europeo per la salute e tutela dei consumatori, in cui la sicurezza del cibo viene individuata come parte intrinseca della sua qualità, nasce nel 2002 l'EFSA (*European Food Safety Authority*) con lo scopo di adottare un piano d'azione integrato, che coniughi qualità e sicurezza nel rispetto delle produzioni tipiche. La sicurezza alimentare può essere garantita esclusivamente attraverso opportune pratiche di produzione e manipolazione degli alimenti che, nel loro insieme, costituiscono una serie di misure di prevenzione e di controllo dei rischi. Dalla mancata corretta applicazione di tali misure, ne scaturisce una contaminazione dei prodotti alimentari ad opera di agenti di diversa natura (fisica, chimica e microbiologica) con la conseguente insorgenza di patologie, che in taluni casi possono avere conseguenze letali [1]. In tale contesto, per rischio microbiologico si intende la possibilità di contrarre malattie causate da batteri, virus e altri microrganismi patogeni ingeriti attraverso il consumo di alimenti. La valutazione del rischio microbiologico (MRA) è definita dalla Commissione del *Codex Alimentarius* come "un processo scientificamente fondato che consiste nelle seguenti fasi: (I) identificazione del pericolo; (II) caratterizzazione del pericolo; (III) valutazione dell'esposizione; e (IV) caratterizzazione del rischio" [2].

1.1. Malattie trasmesse dagli alimenti

Già nel 400 a.C., lo studioso greco Ippocrate aveva intuito la correlazione esistente tra cibo e salute ed infatti è sua la celebre frase “*Fa’ che il cibo sia la tua medicina e la medicina sia il tuo cibo*”. Le malattie di origine alimentare hanno un impatto enorme sulla salute pubblica. È stato stimato che su 600 milioni persone, quasi 1 persona su 10 nel mondo si ammala dopo aver mangiato cibo contaminato. L’assunzione di cibo contenente elevati livelli di microrganismi patogeni (batteri, virus e/o parassiti), sostanze chimiche o fisiche, contribuisce all’insorgenza di malattie acute o croniche, le cui conseguenze vanno dalla diarrea al cancro, alla disabilità permanente o anche alla morte [3]. Nel report annuale, relativo ai dati raccolti nel 2019, redatto dall’EFSA e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) [4] sono stati evidenziati i diversi casi di zoonosi, agenti zoonotici e focolai epidemici di malattie a trasmissione alimentare per 36 Paesi europei (28 Stati membri UE e 8 non-membri). I dati di monitoraggio sull’uomo hanno confermato che l’infezione più frequentemente riportata, corrispondente al 50% di tutte le segnalazioni (220.682 casi confermati), sia imputabile a *Campylobacter* spp. a cui segue *Salmonella* spp con 87.923 casi confermati, *Escherichia coli* produttore di Shigatossina (STEC) con 7.775 casi confermati e da *Yersinia enterocolitica* con 6.961 casi confermati. Inoltre, le zoonosi con esiti più gravi sono state le listeriosi (2.621 casi confermati) e le infezioni da West Nile virus (443 casi), dove quasi tutti i casi confermati hanno richiesto l’ospedalizzazione e il decesso è avvenuto in 1 caso su 5 per la listeriosi e in 1 caso su 10 per le infezioni da West Nile virus (**Figura 1**).

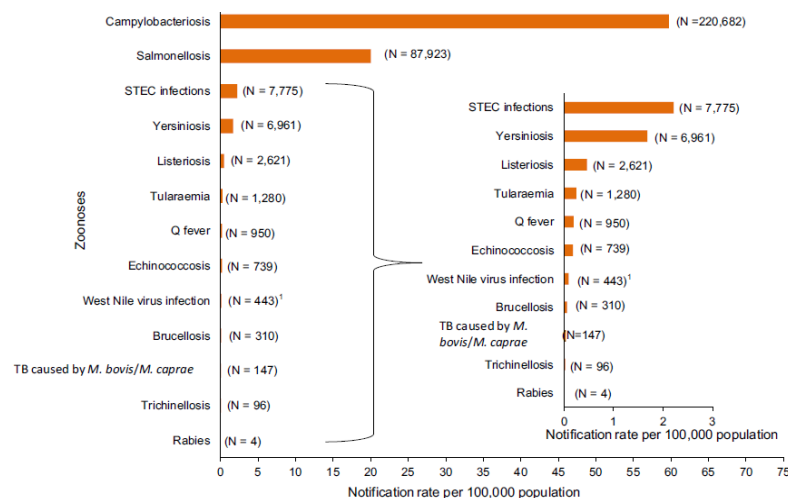


Figura 1. Tassi di incidenza delle zoonosi umane confermate nell'UE, 2019

Nel report, per gli agenti di zoonosi considerati prioritari, i dati di sorveglianza nell'uomo sono stati integrati con le informazioni sul monitoraggio nei serbatoi animali e nella filiera alimentare. Nel 2019, 27 paesi dell'Unione europea hanno segnalato 5.175 focolai epidemici di origine alimentare di cui *Salmonella* è risultato l'agente maggiormente identificato (926 focolai) ed è anche quello che ha richiesto il maggior numero di ricoveri. Le principali fonti di infezione sono state "uova e prodotti a base di uova", seguiti da "prodotti da forno", "carne di maiale e prodotti derivati" e "alimenti composti".

L'agente infettivo più dannoso è rappresentato dalla *Listeria monocytogenes*, batterio che da solo è stato responsabile di oltre la metà dei decessi registrati in corso di epidemia, la maggior parte dei quali è avvenuto in seguito al consumo di carne o prodotti a base di carne. Il maggior numero di focolai epidemici, il 23% del totale, è stato registrato nell'ambito della ristorazione collettiva (ristoranti, caffè, pub, ecc...), a seguire con il 19% dei casi si distingue l'ambito domestico e ancora un elevato numero di casi si sono verificati nei contesti scolastici, compresi gli asili. Lo studio dell'EFSA sottolinea inoltre che, tra gli alimenti di origine animale più coinvolti nei focolai epidemici, rientrano i crostacei responsabili quasi esclusivamente di epidemie di gastroenteriti di origine virale operate da norovirus.

Il consumo di ortaggi e altri vegetali contaminati è invece risultato associato a una elevata varietà di agenti patogeni quali agenti batterici (*Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica*), tossine batteriche, protozoi (*Cryptosporidium parvum*) e virus (norovirus) [4].

Dallo scenario epidemiologico mondiale tracciato nel report EFSA-ECDC 2019, si evince il motivo per il quale, le malattie di origine alimentare rappresentino un tema centrale per la salute pubblica in tutto il mondo. Per agire su tale problematica si è reso necessario operare su molti piani d'intervento fornendo: programmi di prevenzione appropriati, formazione del personale addetto, educazione e informazione dei consumatori, una legislazione adeguata e i conseguenti sistemi di controllo armonizzati a livello internazionale.

Numerosi sono i fattori che nel tempo hanno influenzato lo scenario epidemiologico delle malattie trasmesse dagli alimenti, tra questi il più importante è rappresentato dalle mutate abitudini alimentari, caratterizzate dalla crescente necessità di consumare i pasti fuori casa o l'acquisto di cibi *Ready To Eat* (RTE) così come il diffondersi nella popolazione di regimi dietetici particolari, che spesso prevedono l'uso di vegetali crudi e

potenzialmente infetti. Non meno importante è l'aspetto legato alla globalizzazione dei mercati, che determina una sempre maggiore circolazione di alimenti contaminati all'origine con conseguente comparsa di focolai multistato. Inoltre, bisogna tener conto della comparsa di nuovi agenti patogeni noti come “patogeni emergenti”, tra i quali si possono annoverare *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, il cui coinvolgimento nello sviluppo delle tossinfezioni si fa sempre più importante. Un altro fattore non poco rilevante è la sempre maggiore presenza sul mercato dei cosiddetti “prodotti di IV gamma”, ovvero prodotti vegetali freschi poco trattati prima di essere confezionati e spesso consumati crudi, che negli ultimi anni, sembrano aver portato ad un aumento del numero di focolai di malattie alimentari legate al loro consumo. Questi alimenti rappresentano quindi un serio rischio per la salute, se contaminati da microorganismi patogeni [5; 6].

1.2. Batteri patogeni e deterioranti degli alimenti

Molti microrganismi, soprattutto di natura batterica, vivono in stretto rapporto con l'uomo, questi sono innocui e anzi risultano essere utili al corpo umano per assolvere importanti funzioni, basti pensare ai batteri che compongono la flora intestinale, indispensabile per il mantenimento del benessere dell'intestino. Tuttavia, vi sono tanti altri microrganismi tra cui batteri, funghi e virus che sono patogeni e il cui accesso nel corpo umano è causa di molte malattie di origine alimentare. Il veicolo di tali patogeni è generalmente rappresentato da acqua contaminata o cibo poco cotto. I batteri rappresentano la causa più comune di malattie di origine alimentare ed esistono in una varietà di forme e proprietà. La maggior parte dei patogeni di origine alimentare sono mesofili con una temperatura di crescita ottimale tra i 20 °C e i 45 °C, anche se taluni, definiti psicotrofi, come *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*, sono in grado di crescere in condizioni refrigerate o a temperature inferiori a 10 °C [7].

Campylobacter spp.

Secondo l'OMS, circa l'1% della popolazione dell'Europa occidentale ogni anno è infettato da *Campylobacter jejuni* membro della famiglia Campylobacteriaceae, che è una delle cause più comuni di malattie diarroiche nel mondo. I *Campylobacter* spp. sono piccoli batteri Gram-negativi a forma di spirale che, a differenza dagli altri patogeni alimentari, necessitano di stringenti condizioni di crescita, come di

un'atmosfera contenente circa il 10% CO₂ e il 5% di O₂ essendo microaerofili. Le specie patogene per l'uomo sono classificate come *Campylobacter* termofili, avendo un ristretto intervallo di temperatura per la crescita, che va da un minimo di 30 °C ad un massimo di circa 46 °C [8]. Pur essendo considerati i mammiferi e gli uccelli i principali serbatoi di *Campylobacter*, questo microrganismo può infettare anche conigli, pecore, cavalli, mucche, maiali, pollame e persino animali domestici. Oltre ai prodotti carnei, la sua pericolosità è stata associata all'assunzione di verdure, crostacei e acqua contaminata. Nonostante le numerose fonti, quella individuata come la principale responsabile di contaminazione è il pollame, costituendo la causa dell'80% di tutti i casi di campilobatteriosi umana (**Figura 2**).

Figura 2. Esempio di prodotto alimentare contaminato da *Campylobacter*



Le indagini sui focolai scoppiati hanno permesso di individuare nel latte non pastorizzato, negli operatori del settore alimentare e nell'acqua di superficie contaminate ulteriori fonti di infezione. Delle 26 specie di *Campylobacter*, *C. jejuni* è considerato l'agente patogeno dominante essendo responsabile del 95% delle epidemie. A livello mondiale, l'emergere della resistenza agli antibiotici nei *Campylobacter*, soprattutto nelle due specie più rappresentative (*C. jejuni* e *C. coli*) sta destando una grande preoccupazione [9].

Escherichia coli

Un'altra importante causa di morbidità e mortalità in tutto il mondo è imputabile alle varianti patogene di *Escherichia coli*. Tale microrganismo è un batterio Gram-negativo a forma di bastoncello che può essere dotato o meno di motilità a seconda che presenti il

flagello oppure no. La maggior parte dei ceppi di *E. coli* non sono patogeni e solo un piccolo sottoinsieme ha caratteristiche di patogenicità che lo rendono responsabile di una varietà di malattie. Negli ultimi anni, nei paesi industrializzati, si sta osservando un sempre maggior numero di epidemie di origine alimentare causate da *E. coli* patogeni, per il consumo di carne, frutta e verdura contaminati. La diffusione nell'ambiente di questo batterio avviene attraverso il materiale fecale, che tramite la contaminazione di acqua potabile, acqua di irrigazione e suolo, può contaminare frutta e verdura fresche (**Figura 3**).

Figura 3. Esempio di prodotto alimentare contaminato da *Escherichia coli*



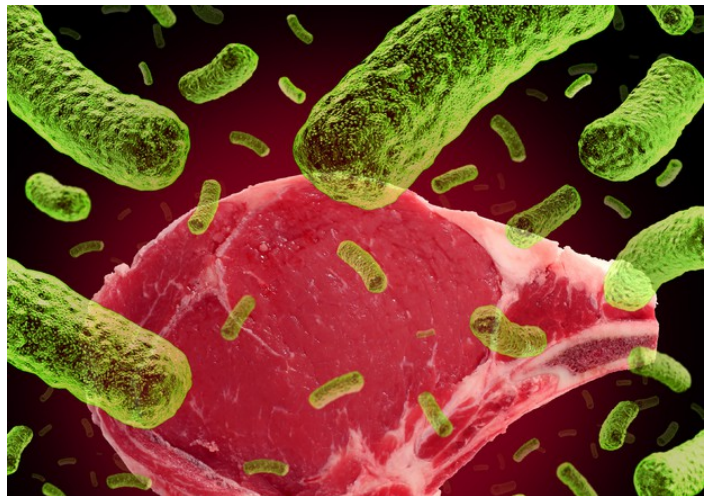
Alcuni patotipi di *E. coli* come l'*E. coli* enteroemorragico (EHEC) possono essere trasferiti attraverso carne (specialmente carne macinata), ma alcune epidemie sono state associate a prodotti caseari, maionese, sidro di mele, germogli, lattuga e spinaci. L'EHEC è un sottoinsieme di *E. coli* in grado di produrre della tossina Shiga (STEC). I ceppi appartenenti a questo gruppo di microrganismi sono stati suddivisi in cinque sierotipi (A-E) da Karmali *et al.* nel 2003, in base al tipo di focolaio e alla gravità dell'infezione. Il serbatoio naturale di STEC è rappresentato da bovini, ma questi batteri sono stati isolati anche dalle feci di polli, capre, pecore, maiali, cani, gatti e gabbiani [9].

Listeria monocytogenes

La *Listeria monocytogenes*, oggi ben riconosciuta a livello globale come agente responsabile di una grave infezione chiamata listeriosi, è emerso come patogeno alimentare solo tra la fine degli anni '70 e gli inizi degli anni '80 in Nord America [9].

La listeriosi pur essendo una malattia relativamente rara presenta un alto tasso di mortalità (20-30%) che la rende una delle minacce alimentari più pericolose [13]. I principali bersagli di questa malattia sistemica fatale sono le donne incinte, i neonati, gli anziani e gli individui immuno-compromessi. A differenza di molti altri patogeni di origine alimentare, la *Listeria* si moltiplica anche in ambienti freddi come i frigoriferi [14]. Nel corso degli ultimi 10-15 anni, un numero crescente di prove ha suggerito che, la persistenza di *L. monocytogenes* negli impianti di lavorazione per anni o addirittura decenni, è un fattore importante nella trasmissione di questo patogeno e la causa principale di una serie di focolai di listeriosi umana [15]. Questo microrganismo può essere rinvenuto sulla materia vegetale in decomposizione, nelle acque di scarico, acqua e suolo. Inoltre, esso può sopravvivere a temperature estreme (1-45 °C) ed in presenza di elevate concentrazioni saline rendendolo estremamente pericoloso, specialmente su alimenti che non vengono riscaldati. Il batterio infatti è stato riscontrato in una varietà di cibi crudi, come prodotti carnei (**Figura 4**) e verdure non cotte, così come in cibi che vengono contaminati dopo la cottura o la lavorazione.

Figura 4. Esempio di prodotto alimentare contaminato da *Listeria monocytogenes*



Le fonti primarie di *Listeria* sono gli alimenti pronti al consumo (RTE) di origine animale o vegetale, come carne, latticini, frutta e verdura. Ciò che desta maggiormente preoccupazione è la contaminazione dei prodotti alimentari post-lavorazione giacché il loro consumo avviene senza ulteriore cottura. Dall'osservazione dei focolai scoppiati si è potuto notare che gli alimenti coinvolti sono salumi, hotdog, paté, insalata, pesce affumicato, latte, formaggio morbido fatto con latte non pastorizzato, gelato, melone, verdure congelate e mele caramellate. Per i cibi pronti, negli USA c'è una politica di "tolleranza zero" verso *L. monocytogenes*, mentre per altri paesi come il Canada e

alcuni paesi europei la legislazione ha posto un limite di 100 CFU in 25 g di cibo, a condizione che l'ambiente in cui il prodotto è conservato non promuova la proliferazione batterica durante il periodo di conservazione. L'FDA statunitense ha classificato gli alimenti RTE in base al rischio: gli alimenti ad altissimo rischio includono salumi e wurstel (non riscaldati); i cibi ad alto rischio sono i prodotti lattiero-caseari ad alto contenuto di grassi, come il formaggio molle non stagionato, il latte non pastorizzato, paté, creme da spalmare e frutti di mare affumicati; i prodotti a medio rischio sono latte pastorizzato, formaggio fresco a pasta molle, formaggio morbido stagionato, crostacei cotti RTE, insalate, wurstel (riscaldati), frutta e verdure; e i prodotti a rischio molto basso sono formaggi duri, gelati, prodotti lattiero-caseari congelati, e formaggio fuso [9]. Per molti alimenti RTE viene usata la refrigerazione per limitare la crescita batterica durante la conservazione, ma, sebbene tali pratiche standard funzionino bene per la maggior parte dei batteri, non sono adeguate per il controllo della *Listeria*, in quanto è in grado di crescere in queste condizioni [16].

Salmonella spp

Una delle cause più comuni di infezioni enteriche in tutto il mondo è rappresentata da *Salmonella* spp appartenente al gruppo delle Enterobacteriaceae (**Figura 5**). La loro denominazione deriva dal nome dallo scienziato Dr. Daniel Salmon che isolò il primo organismo, *Salmonella choleraesuis*, dall'intestino di un maiale [17]. Il genere *Salmonella* è diviso in due specie che possono causare malattie negli esseri umani: *S. enterica* e *S. bongori* [18]. *Salmonella* è ulteriormente suddivisa in sierotipi, sulla base dello schema di tipizzazione Kaufmann-White pubblicato per la prima volta nel 1934, che differenzia i ceppi di *Salmonella* per le loro proprietà antigeniche superficiali e flagellari. La *Salmonella* spp. viene comunemente indicata con i nomi dei suoi sierotipi. Ad esempio, *Salmonella enterica* è ulteriormente divisa in numerosi sierotipi, tra cui *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* [18]. La principale fonte di salmonellosi di origine alimentare è rappresentata dal pollame, in parte a causa dell'alta densità degli animali nelle operazioni di allevamento, che permettono agli uccelli colonizzati di diffondere le salmonelle ad altri uccelli all'interno di uno stormo.

Figura 5. Esempio di prodotto alimentare contaminato da *Salmonella*



Inoltre, il fatto che la colonizzazione del batterio avvenga a livello intestinale aumenta il rischio di contaminazione durante le pratiche di macellazione ed eviscerazione. Anche le uova sono serbatoi per la salmonella, in particolare il sierotipo Enteritidis, poiché questo microrganismo può invadere e colonizzare l'ovaia della gallina ovaiole [9].

Staphylococcus spp.

Al genere *Staphylococcus* appartengono più di 30 specie, tra cui quella che ha un impatto maggiore sulla salute umana è *Staphylococcus aureus* (**Figura 6**). Si tratta di cocci Gram-positivi non mobili che appaiono singolarmente o in coppie, tetradi, brevi catene o come caratteristici ammassi "a grappolo". Gli stafilococchi sono anaerobi facoltativi ad eccezione di *Staphylococcus saccharolyticus* e *Staphylococcus aureus subsp. anaerobius*, che crescono più rapidamente in condizioni anerobiche [7]. *Staphylococcus* spp. è diffuso ovunque in natura e può essere ritrovato sulla pelle e sulle ghiandole cutanee di mammiferi e uccelli, oltre che nella bocca, nel sangue, ghiandole mammarie e tratti intestinali, genitourinari e respiratori superiori di ospiti infetti [7]. Il batterio è anche coinvolto in epidemie di origine alimentare.

Figura 6. Esempi di prodotti alimentari contaminati da *Staphylococcus*



L'intossicazione alimentare da stafilococco è una delle malattie alimentari più segnalate in tutto il mondo. Quasi un terzo di tutti i casi di intossicazioni alimentari, registrati durante gli anni '70 e '80 negli Stati Uniti, sono stati causati da stafilococchi, con una evidente diminuzione negli ultimi due decenni. Tale patologia è spesso associata all'assunzione di alimenti cremosi preparati con latte e prodotti lattiero-caseari, formaggio, crema pasticcera (pudding), pasticcini ripieni di crema, torte, condimenti per insalate, crostacei, pesce, carne e prosciutti, così come gli alimenti che richiedono una maggiore preparazione a mano, come la pasta e le insalate di pollo, i salumi e i panini. Un aspetto rilevante è che gli stafilococchi possono essere trasmessi al cibo attraverso i coltelli del tritacarne e gli addetti alla manipolazione degli alimenti [9]. Fuori dal corpo, *Staphylococcus aureus* può sopravvivere per lunghi periodi di tempo su varie superfici ed è stato isolato dall'aria, dalla polvere, dalle acque reflue e dall'acqua, rendendolo uno dei più resistenti patogeni non sporigeni [5]. Gli esseri umani sono il principale serbatoio di *Staphylococcus aureus* e la maggior parte dei casi di intossicazione alimentare da stafilococco sono riconducibili al cibo contaminato durante la preparazione a causa di refrigerazione inadeguata, cottura o riscaldamento inadeguati, o scarsa igiene personale.

Batteri deterioranti

Tra i batteri contaminanti degli alimenti vi sono quelli noti come deterioranti in quanto, pur causando un'alterazione della matrice alimentare con cambiamenti nella consistenza, nel sapore, nell'odore e nell'aspetto, non comportano l'insorgenza di patologie. Di questa categoria fanno parte i batteri definiti *spore-forming*, si tratta di

batteri Gram-positivi che possono essere anaerobi stretti o facoltativi essendo in grado di crescere in presenza o meno di ossigeno. Questi batteri sono generalmente associati al deterioramento dei cibi trattati a caldo per la capacità delle loro spore di sopravvivere alle alte temperature di processo. Le specie *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* e *Oenococcus* anche noti come batteri dell'acido lattico (LAB), sono microrganismi generalmente impiegati nella produzione dei cibi fermentati come yogurt e sottaceti, che in specifiche condizioni, quali acidità, basse concentrazioni di ossigeno e basse temperature, diventando organismi deterioranti per una grande varietà di alimenti. La loro crescita è la principale responsabile dell'inverdimento dei prodotti carnei, nonché della produzione di gas nei formaggi, sottaceti e in prodotti confezionati o in scatola. I LAB crescono su carne e pollame confezionati sotto vuoto e in atmosfere modificate dove sono in grado di produrre, tramite processi fermentativi, acidi organici a partire dal glucosio con conseguente sviluppo dei caratteristici odori acidi. Quando presenti in grandi quantità possono produrre un esopolisaccaride che forma una sorta di melma sulla superficie dei prodotti. Tuttavia, i LAB sono debolmente proteolitici e quindi non producono grandi quantità di ammine o solfuri, rendendo il deterioramento da essi operato sulla carne non molto offensivo.

Tra i più comuni organismi psicotrofi deterioranti di alimenti ritroviamo *Pseudomonas* spp., si tratta di un batterio del suolo Gram-negativo particolarmente diffuso nei cibi conservati in condizioni aerobiche con un alto contenuto di acqua e pH neutro come carne rossa, pesce, pollame, latte e prodotti lattiero caseari. Le specie principalmente coinvolte nel deterioramento alimentare sono *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. lundensis*, e *P. putrefaciens*, queste contaminano alimenti di origine animale (carne, pesce, latte) dove attraverso la secrezione di lipasi e proteasi causano la formazione di solfuri e trimetilammina responsabili dei caratteristici odori sgradevoli. *P. fluorescens* e *P. viridiflava* comprendono più del 40% dei batteri che naturalmente si ritrovano sulla superficie di frutta e verdura e causano quasi la metà dei processi putrefattivi post-raccolta dei prodotti freschi conservati a basse temperature [19;20]. Per il latte e i prodotti caseari, la specie più comunemente isolata sembra essere *Pseudomonas fluorescens* [21;22;23;24], ritrovata anche negli impianti di produzione e acque di lavorazione [25;26;21]. Alcuni membri della specie *P. fluorescens* hanno dimostrato di essere potenziali agenti di colorazione anomala blu nel formaggio, causando importanti perdite economiche per l'industria [21]. La produzione del pigmento blu sembra avvenire in particolari condizioni di conservazione [25;26]. Oltre alla secrezione di

enzimi idrolitici e alla produzione di pigmento blu, *P. fluorescens* è conosciuto anche per la capacità di aderire e formare biofilm sulle vasche di latte o nelle strutture dell'azienda casearia (tubi, vasche di cagliata, tavolo e pressa per formaggio) [27]; quest'ultima capacità fornisce una protezione contro condizioni avverse determinate nei processi di *cleaning-in-place* (CIP) [28]. Infatti, il biofilm aiuta i microrganismi a persistere nell'ambiente e a migliorare la capacità di resistere all'essiccazione, ai raggi UV e ai trattamenti con disinfettanti e antimicrobici [29].

Tra gli organismi di deterioramento alimentare è importante ricordare la grande famiglia delle Enterobacteriaceae comprendente anche un certo numero di patogeni umani quali i già citati *Salmonella* e *E. coli*. Di questa famiglia fa parte il batterio *Erwinia carotovora*, che è il principale responsabile della decomposizione del materiale vegetale in campo o quando conservato a temperatura ambiente. Diversi membri di questo gruppo sono responsabili della produzione delle ammine biogene nella carne e nel pesce mentre altri forniscono cattivi odori o colori alla birra (*Obesumbacterium*), pancetta e altri salumi (*Proteus*, *Serratia*), formaggi (diversi generi), insalata di cavolo slaw (*Klebsiella*), e uova con guscio (*Proteus*, *Enterobacter*, *Serratia*). I fattori più importanti nello sviluppo di una specifica tipologia di agente microbico sugli alimenti sono la temperatura, la concentrazione di sale e il pH.

Batteri produttori di biofilm

Il 99% circa dei microrganismi presenti sul pianeta Terra vivono in comunità note con il nome di biofilm [30]. Le cellule microbiche che compongono il biofilm sono strettamente associate alla superficie contaminata e inglobate in una matrice composta da una sostanza polimerica extracellulare (EPS). Tale struttura consente agli agenti patogeni che la compongono non solo di infettare, ma anche di resistere a diverse condizioni ambientali [31]. Tra le specie batteriche, anche i patogeni alimentari possono svilupparsi sotto forma di biofilm e dar luogo ad infezioni alimentari a causa di una inadeguata sterilizzazione delle superfici di lavoro [32]. Nel settore alimentare il principale agente patogeno responsabile della contaminazione ad opera di biofilm è la *Listeria monocytogenes* [33]. Come già precedentemente accennato le nuove abitudini alimentari stanno incentivando l'uso dei cibi RTE per i quali risultano particolarmente importanti le infestazioni da *Enterobacter cloacae* [33;34], che con *Salmonella* Enteridis, il patogeno più comune negli allevamenti di pollame, sono riconosciuti per il 50% quali produttori di biofilm [35]. Un'ulteriore categoria alimentare da annoverare

come caratterizzata da un alto rischio di contaminazione da biofilm microbici è rappresentata dai prodotti della filiera ittica. L'elevato valore nutrizionale che contraddistingue i frutti di mare è alla base del loro forte consumo, il quale sembra però anche essere associato ad un elevato numero di infezioni alimentari, riconosciute come una delle principali cause di ricoveri e morbidità in tutto il mondo [36;37]. Le infezioni legate ai frutti di mare sono causate da numerosi virus, batteri e parassiti [33], i quali formano biofilm sulla loro superficie, sui ripiani con cui essi entrano in contatto e nell'acqua [38] dove restano adesi per lunghi intervalli di tempo [39]. Tra gli agenti patogeni responsabili di contaminazione nei prodotti ittici, la specie più conosciuta è *Aeromonas hydrophila* [40;41] a cui segue con una pari importanza *Vibrio cholerae* [42] principalmente associato a contaminazione nei frutti di mare durante la loro manipolazione, produzione e lavorazione [43;44]. Un processo di pulizia e sanitizzazione non adeguato può aiutare lo sviluppo di biofilm microbici anche nell'industria lattiero-casearia [45,46], con un impatto negativo sia sulla salute pubblica che economico. I batteri più comunemente riscontrati appartengono al genere *Enterobacter*, *Micrococcus*, *Listeria*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Pseudomonas* [47-48]. Oltre alle attrezzature da lavoro, altre fonti di contaminazione sono rappresentate dalle condutture del latte, dai silos e dai serbatoi di stoccaggio [49]. La quantità e qualità dei prodotti alimentari è continuamente minacciata dallo sviluppo di biofilm microbici, la cui crescita è governata da molti fattori biotici e abiotici. Lo sviluppo di tecnologie in grado di controllare questi fattori può rappresentare una valida strategia per ridurre la possibilità di infezioni operate da biofilm.

1.3. Lieviti e muffe

Tra gli organismi appartenenti al regno dei funghi ritroviamo i lieviti e le muffe, questi sono ampiamente diffusi in natura e la loro presenza è nota anche a livello alimentare, dove possono presentare effetti benefici o nocivi. I lieviti sono microfunghi unicellulari eucarioti di cui se ne conoscono circa 1000 specie, ma queste rappresentano solo una frazione della biodiversità del lievito sulla Terra. La loro presenza è di fondamentale importanza in alcuni prodotti come il vino o la birra, essendo responsabili dei processi di fermentazione indispensabili per la trasformazione in quello che sarà il prodotto finale, ma ad essi va anche attribuita un'azione nociva essendo in taluni casi causa di deterioramento alimentare. Ad esempio, nella produzione del vino la trasformazione del

succo d'uva in vino avviene ad opera di un particolare lievito denominato *Saccharomyces cerevisiae*, il quale, insieme ad altre specie è allo stesso tempo il responsabile dei danni che avvengono a carico del prodotto. I danni si manifestano come un'alterazione degli odori e dei sapori e possono verificarsi in qualsiasi fase del processo. I più comuni processi di deterioramento del vino sono dovuti o alla produzione di acetato di etile ad opera del lievito apiculato prima che avvenga la fermentazione o durante il processo fermentativo alla produzione da parte di *Saccharomyces cerevisiae* di solfuro di idrogeno o ancora nelle fasi di stoccaggio alla produzione di acetaldeide ad opera dei lieviti filmogeni. Per evitare che ciò avvenga è possibile ricorrere alle attuali misure preventive o curative come i trattamenti termici, i conservanti chimici, la filtrazione, e l'igiene della preparazione [50]. Non può essere stabilito un limite, espresso come numero di cellule, universalmente valido per tutti i lieviti, ma il numero di cellule necessario a rovinare il prodotto varia in funzione del tipo di lievito e dell'alimento in questione. L'azione dei lieviti è importante anche nei processi di stagionatura del formaggio, in particolare le specie *Debaromyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces marxianus* e *S. cerevisiae*, sono responsabili del caratteristico sapore e dalla consistenza di questi prodotti, dovuti alle reazioni di lipolisi, proteolisi e fermentazione del lattosio [51]. Generalmente i fattori che influenzano la crescita microbica sono il pH e l'attività dell'acqua. Nei frutti, l'elevata concentrazione di zuccheri e il pH acido, congiuntamente all'elevata attività dell'acqua li rende substrati ideali per la crescita dei lieviti. Per le verdure, il loro contatto con il suolo le rende facile bersaglio di infezioni durante la produzione, tra queste anche quelle operate dai lieviti sono in grado di rovinarle, causando non solo un aumentato rischio per la salute, ma anche consistenti perdite economiche [52]. La contaminazione da lieviti può riguardare anche i prodotti lattiero-caseari come yogurt, burro e formaggio. La *Candida spp.* è stata isolata da diverse fonti di latte da Garnier *et al.* [53] per valutare la sua alta resistenza ai conservanti. Il latte fermentato si è dimostrato un eccellente substrato per la crescita dei funghi, Medina e Jordano (1993) [54] hanno identificato il lievito *C. krusei* in tutti i campioni analizzati e fissato il termine di conservazione a 24 giorni per una temperatura di 7 °C. Nel latte crudo e pastorizzato il contenuto di lieviti è pari a 10^1 - 10^3 CFU/ml, ma una volta refrigerato la loro crescita è ostacolata dai batteri psicrotrofi che in tali condizioni proliferano rapidamente. Nonostante questo, i lieviti prosperano nel latte perché è il substrato perfetto, e senza alcuna competizione da parte dei batteri, possono crescere fino a raggiungere 10^8 - 10^9 CFU/mL [55].

L'altro deteriorante alimentare di origine fungina è rappresentato dalle muffe, le quali sono responsabili dell'alterazione di alimenti quali cereali, noci, frutta e verdura. Si tratta di microrganismi multicellulari strutturalmente composti da ife, conidiofori e conidi (spore). Generalmente l'identificazione della specie avviene attraverso lo studio della morfologia e delle dimensioni delle spore al microscopio ottico [9].

Le muffe sono in grado di crescere e sopravvivere su un'ampia varietà di prodotti e in condizioni che risulterebbero proibitive per altre forme di vita come: acidità, condizioni secche e basse temperature. La loro crescita nei generi alimentari può avere sia effetti benefici che dannosi a seconda del tipo muffa, del substrato di crescita e delle condizioni ambientali [56] (**Figura 7**).



Figura 7. Due esempi di alimenti contaminati da muffe. A sinistra, il gorgonzola formaggio caratterizzato dalla presenza di una muffa non tossica *Penicillium glaucum* e a destra pane contaminato da muffa tossica

Storicamente, questi microrganismi sono impiegati nella produzione di numerosi prodotti tra cui formaggi stagionati, salsa di soia, tempeh e altri prodotti. Come detto però, questi contaminanti possono anche rappresentare un fattore di rischio per la salute umana scatenando reazioni allergiche o in casi ancor più gravi cancerogenesi, teratogenesi, irritazione alla pelle, neurotossicità o addirittura morte, per effetto delle micotossine prodotte da alcuni tipi di muffe filamentose. Le micotossine sono composti a basso peso molecolare prodotti come metaboliti secondari, la cui pericolosità risiede nella loro estrema stabilità e resistenza ai tradizionali trattamenti impiegati nelle fasi di produzione degli alimenti.

Gli alimenti maggiormente colpiti dalle muffe sono i prodotti vegetali e la loro contaminazione può verificarsi in ognuna delle diverse fasi della produzione

dell'alimento: nel campo, durante il raccolto, la lavorazione, il trasporto o lo stoccaggio. Gli effetti che ne conseguono sono sia economici, in quanto le rese ridotte comportano un minore profitto, che un danno per la salute animale che può assumere del mangime contaminato e per l'uomo.

Secondo le stime dalla FAO, ogni anno il 25% dei raccolti mondiali sono contaminati da muffe, con perdite che arrivano a circa 1 miliardo di tonnellate di cibo.

Non solo le muffe, ma anche le micotossine influenzano le catene di approvvigionamento alimentare e dei mangimi, compresi i produttori di colture, produttori di animali, gestori e distributori di cereali, i trasformatori, i consumatori e la società nel suo complesso. Dal 25 al 50% dei prodotti alimentari, soprattutto quelli a base di cereali e le noci sono presumibilmente contaminati da micotossine. La malattia causata dalla micotossina è chiamata micotossicosi, si tratta di una patologia non trasmissibile che non risponde agli antibiotici, la cui epidemia associata è solitamente stagionale. Le muffe di maggiore interesse per la sicurezza alimentare e per la produzione di micotossine sono tre: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* [9]. Tra le micotossine principalmente coinvolte nel deterioramento alimentare vi sono le alfatossine e l'ocratossina A prodotte da diversi membri di *Aspergillus*, mentre OTA può essere prodotta da alcune specie di *Penicillium*. Il maggiore produttore di alfatossine è *Aspergillus flavus* responsabile dell'alterazione di svariati prodotti (frutta e verdura, spezie, cereali, pane, noci, arachidi, mandorle e pistacchi). *Fusarium* e altre specie di *Aspergillus* sono noti per la produzione di fumonisine [57]. La patulina, che non è cancerogena ma immunotossica e neurotossica negli animali, può essere prodotta da *Penicillium expansum*, un comune guastatore di mele, e poi trasferita a succhi e altri prodotti derivati, ad esempio gli alimenti per bambini e la salsa di mele [57].

2. Conservazione degli alimenti

Gli alimenti, di origine vegetale o animale, sono sostanze organiche che vengono consumate per scopi nutrizionali. Essi sono costituiti prevalentemente da acqua, proteine, lipidi, carboidrati e minerali. I valori nutrizionali, il colore, la consistenza e la commestibilità che li contraddistinguono possono andare incontro ad un processo di deterioramento operato tanto da agenti microbici, quanto da sostanze chimiche o fisiche. [58]. In risposta a ciò, la loro conservazione mira a preservarne la qualità per un periodo di tempo prolungato. La conservazione degli alimenti è definita come una serie di

procedure o tecniche, messe in atto per tenere sotto controllo i fattori, interni ed esterni, che possono innescare quei processi che portano all'alterazione finale del prodotto. Già nell'antica civiltà, con gli uomini primitivi nasce l'esigenza di conservare il cibo, in quanto, dopo aver cacciato un grosso animale, si palesava l'impossibilità a mangiarlo in una sola volta. Pertanto, conoscere le tecniche di conservazione del cibo fu il primo e più importante passo verso la creazione della civiltà [59]. Le tecniche convenzionali di conservazione degli alimenti come l'essiccazione, il congelamento, la refrigerazione, la pastorizzazione e la conservazione chimica sono oggi usate in tutto il mondo. Tuttavia, il progresso scientifico sta dando un forte contributo all'evoluzione delle tecnologie esistenti e allo sviluppo di quelle nuove [60-61] per rendere le procedure di conservazione sempre più efficienti.

2.1.Processi chimici

Conservare gli alimenti per mezzo di sostanze chimiche è uno dei metodi più antichi e tradizionali [62], la cui efficacia dipende dalla concentrazione e dalla selettività della sostanza adoperata, dagli organismi implicati nel deterioramento e dalle caratteristiche chimico-fisiche degli alimenti [63]. Il consumo globale e l'applicazione di additivi e conservanti alimentari si sta espandendo, tuttavia, il loro impiego resta una questione delicata a causa dei preoccupanti risvolti sulla salute [64].

L'impiego degli additivi alimentari ha come scopo la conservazione dei valori nutrizionali, la preservazione delle caratteristiche organolettiche, il miglioramento della qualità dei prodotti, la riduzione degli sprechi, la stimolazione di un maggiore interesse da parte del cliente, una più agevole disponibilità dell'alimento, nonché una più facile lavorazione dello stesso [65]. Secondo il *Codex Alimentarius* (2017), additivo alimentare significa *“qualsiasi sostanza abitualmente non consumata come alimento in sé e non utilizzata come ingrediente caratteristico di alimenti, con o senza valore nutritivo, la cui aggiunta intenzionale ad alimenti per uno scopo tecnologico nella fabbricazione, nella trasformazione, nella preparazione, nel trattamento, nell'imballaggio, nel trasporto o nel magazzinaggio degli stessi, abbia o possa presumibilmente avere per effetto che la sostanza o i suoi sottoprodotti diventino, direttamente o indirettamente, componenti di tali alimenti”*. Poiché queste sostanze chimiche sono intenzionalmente aggiunte agli alimenti, è essenziale conoscerne le proprietà, in modo da garantire il loro uso adeguato e sicuro [66;67]. Quanto sia

importante l'uso degli additivi tecnologici nella produzione alimentare è evidente [68], ma allo stesso tempo è necessario essere consapevoli dei possibili rischi tossicologici dipendenti dalla frequenza e/o quantità di queste sostanze impiegate [69]. La valutazione degli additivi alimentari a livello mondiale è supportata dal sistema di controllo della dose giornaliera accettabile (ADI), sviluppato dalla FAO e dall'OMS. L'ADI è definito come un valore numerico stabilito in relazione al peso corporeo e indica la quantità di additivo che una persona può ingerire quotidianamente per tutta la vita senza rischi significativi per la salute [70]. Gli additivi alimentari sono sostanze chimiche, sia naturali che sintetiche, usate durante i processi di lavorazione, imballaggio o conservazione degli alimenti. Un'ulteriore distinzione dei diversi additivi viene fatta sulla base del loro uso, in intenzionale o accidentale. Tra queste due categorie, quella degli additivi intenzionali è strettamente controllata dalle autorità governative [65]. Secondo l'Accademia Nazionale delle Scienze (1973), gli additivi sono proibiti se finalizzati a mascherare un processo difettoso, nascondere un deterioramento in corso o altri danni e se si vuole ingannare il consumatore. Inoltre, il loro uso è vietato anche laddove essi siano la causa di una sostanziale riduzione dei valori nutrizionali [65]. Per conservanti chimici si intendono sostanze capaci di inibire, ritardare o arrestare la crescita di microrganismi o qualsiasi altro deterioramento derivante dalla loro presenza [71]. I conservanti alimentari prolungano la durata di conservazione di alcuni prodotti, mantenendone inalterati il colore, la consistenza e il sapore [71]. I conservanti possono essere naturali (sale e zucchero) o chimici, questi ultimi rappresentano la tipologia più efficace nella conservazione per periodi più lunghi [72;73]. I conservanti più comunemente usati sono: l'anidride solforosa, il benzoato di sodio, l'acido sorbico, l'acido propionico, i nitriti e i nitrati di sodio e i nitrati di potassio [74]. Analogamente ad altre classi di additivi alimentari, i conservanti devono soddisfare precisi criteri per il loro utilizzo, in quanto si tratta di sostanze chimiche che possono avere effetti negativi sulla salute [75]. Recenti studi tossicologici indicano che certe concentrazioni di conservanti sintetici e il loro uso continuo possono essere potenzialmente mutageni e/o genotossici [76;77;78].

C'è grande fermento nella ricerca, giacché si mira a trovare composti naturali con attività antimicrobica e antiossidante, che possano essere delle valide alternative per sostituire i conservanti sintetici comunemente usati o per agire in associazione ad essi, riducendo così la loro quantità negli alimenti e i loro possibili rischi per la salute [79].

2.2.Processi fisici

I trattamenti fisici sono quelli più largamente adoperati per la produzione e conservazione dei prodotti alimentari. Questi processi si basano sulla temperatura e si dividono in trattamenti a freddo e trattamenti a caldo.

Trattamenti a caldo

Nell'ambito dei processi fisici a caldo, uno dei metodi di conservazione più antichi consiste nell'essiccazione o disidratazione. Si tratta di un processo che prevede la rimozione dell'acqua da un alimento solido o liquido attraverso l'evaporazione [80]. L'acqua rappresenta l'elemento grazie al quale i microrganismi e gli enzimi riescono ad attivare i meccanismi di deterioramento degli alimenti. Pertanto, con la riduzione del contenuto di acqua le attività di questi microrganismi risultano inibite [81, 82]. L'essiccazione ha numerosi vantaggi: riduce il peso e il volume degli alimenti, facilita la conservazione, l'imballaggio e il trasporto e fornisce anche sapori e odori diversi. Con tutti questi vantaggi, l'essiccazione è apparentemente il metodo più economico di conservazione degli alimenti [83], tuttavia, questo processo ha anche dei limiti, rappresentati dall'osservazione per alcuni alimenti di una significativa perdita di sapore e aroma, nonché di composti funzionali come vitamina C, tiamina, proteine e lipidi [84;85;86]. Tale metodica è generalmente usata per la lavorazione di alimenti quali, frutta, verdure, carne e pesce, ma è utilizzata anche per la produzione del caffè istantaneo e del tè [87;88].

Un'altra tecnica di conservazione a caldo è la pastorizzazione, che consiste nel trattare al calore un alimento fino a una specifica temperatura per distruggere i microrganismi e gli enzimi che sono causa di deterioramento [89;90]. Quasi tutti i batteri patogeni, lieviti e muffe vengono distrutti grazie a questo processo, determinando in tal modo un prolungamento della durata di conservazione dei prodotti alimentari [91;92]. L'efficienza della pastorizzazione dipende dalla combinazione dei fattori temperatura-tempo. Questa combinazione si basa principalmente sugli studi di morte termica dei microrganismi resistenti al calore [92]. Inoltre, durante il trattamento termico degli alimenti hanno luogo minimi cambiamenti fisici, chimici o biologici [93]. Tale aspetto rappresenta però un punto di debolezza in quanto può portare ad un possibile danneggiamento di alcune vitamine, minerali e batteri benefici, ad esempio la vitamina C è ridotta del 20 %, il calcio e il fosforo solubili sono ridotti del 5 % e la tiamina e la

vitamina B12 sono ridotte del 10 %. Nei succhi di frutta, la pastorizzazione causa una riduzione della vitamina C, dell'acido ascorbico e del carotene. Tuttavia, queste perdite possono essere considerate minori dal punto di vista nutrizionale [94;95]. Dopo il riscaldamento, i prodotti sono confezionati asetticamente in contenitori sterili [96].

La sterilizzazione termica, diversa dalla pastorizzazione, è un processo di trattamento termico che distrugge completamente tutti i microrganismi vitali (lieviti, muffe, batteri vegetativi e spore) con conseguente allungamento della durata di conservazione [94].

Trattamenti a freddo

Tra i trattamenti fisici a freddo, uno dei metodi più facili ed economici per la conservazione degli alimenti è il congelamento. Il congelamento arresta lo sviluppo dei microbi, ma non li uccide. L'azione preservante consiste nella riduzione dell'attività dell'acqua, con conseguente inibizione dell'attività microbica e dei tassi di reazione chimica. Un altro aspetto da non sottovalutare è l'effetto inibitorio a carico degli enzimi contenuti negli alimenti, la cui azione è generalmente responsabile della distruzione delle sostanze nutritive del cibo, che comporta un cambiamento nell'aspetto e nella consistenza del prodotto durante la conservazione. L'aspetto negativo correlato a questa metodica risiede nel trasferimento di calore, ovvero durante lo scongelamento si verificano una serie di processi chimici e fisici che influenzano la qualità del prodotto portando ad una perdita della consistenza, del colore e del gusto. Tra le metodiche a freddo è importante annoverare anche il processo di refrigerazione, ampiamente utilizzato per la sua efficace capacità di conservazione a breve termine, nel quale la temperatura degli alimenti viene mantenuta tra -1 e 8 °C. Come per il congelamento la bassa temperatura riduce il tasso di cambiamenti biochimici e microbiologici, consentendo un'estensione della durata di conservazione degli alimenti freschi e lavorati [97].

2.3.Antimicrobial-packaging



L'imballaggio è un sistema di protezione alimentare che consiste nell'impedire che i prodotti possano subire delle manomissioni o essere contaminati da fonti fisiche, chimiche o biologiche. Il vantaggio di questo sistema consiste nella possibilità di preservare i benefici della lavorazione del cibo a processo ultimato, permettendo agli alimenti di viaggiare in sicurezza per lunghe distanze dal sito di produzione e di essere consumati integri. I principali insulti che possono subire gli alimenti sono essenzialmente dovuti all'ossigeno, al vapore acqueo, alla luce ultravioletta, alle sostanze chimiche e agli agenti microbici.

L'*active packaging* rappresenta un concetto innovativo che rivoluziona l'idea di imballaggio, in quanto può essere definito come il risultato dell'interazione tra confezione, prodotto e ambiente, al fine di prolungare la durata di conservazione di un alimento o aumentarne la sicurezza o migliorarne le proprietà sensoriali, senza inficiarne la qualità. Il suo impiego risulta particolarmente importante per gli alimenti freschi e quelli a lunga conservazione. L'imballaggio intelligente è stato definito come un "sistema di imballaggio che monitora le condizioni e la qualità del cibo confezionato durante il trasporto e lo stoccaggio" [98]. Una forma di imballaggio attivo è rappresentato dall'imballaggio antimicrobico il cui obiettivo è di estendere la durata di conservazione degli alimenti e ridurre il rischio di contaminazione da agenti patogeni. Le confezioni degli alimenti sono quasi esclusivamente in materiale plastico, i polimeri maggiormente impiegati in Europa nel settore alimentare sono il polipropilene (PP) per il 19,3%; il polietilene a bassa densità (LDPE) per il 17,5% e il polietilene tereftalato (PET) per il 7,4% e infatti il 39,9% di tutta la plastica prodotta va al packaging [99]. Il successo della plastica come materiale di imballaggio è facilmente spiegabile con i bassi

costi della materia prima, la facilità di modifica con cui è possibile ottenere prodotti diversi, dai film flessibili ai contenitori rigidi, la resistenza, la stabilità, la leggerezza, l'impermeabilità ai gas e a molti solventi ed infine la possibilità di sterilizzare senza compromettere la qualità degli alimenti [100]. L'imballaggio alimentare attivo comporta l'uso di pellicole polimeriche che fungono da supporto per vari composti attivi come gli estratti naturali che entrano in questo modo a far parte dell'imballaggio stesso [101;102]. Il grande interesse osservato nel settore alimentare verso questi materiali arricchiti è direttamente collegato alla volontà di ridurre l'uso diretto di additivi alimentari nei prodotti. La strategia di produzione dell'imballaggio attivo può prevedere diversi approcci: la raccolta di sostanze antimicrobiche in una bustina collegata alla confezione dalla quale la sostanza bioattiva volatile viene rilasciata per tutta la durata della conservazione; l'internalizzazione dei composti bioattivi all'interno del polimero; il rivestimento o assorbimento di tali composti sulla superficie del polimero e l'immobilizzazione delle molecole attive direttamente sulla superficie polimerica mediante la formazione di legami covalenti.

Sia che gli agenti antimicrobici siano incorporati o che rivestano la superficie della pellicola la sostanza può migrare parzialmente o completamente attraverso una diffusione graduale nell'alimento o nello spazio esterno, dove esercita la sua azione protettiva, oppure può non migrare, agendo solo quando l'alimento è in contatto con la superficie della pellicola e di conseguenza il microrganismo incontra l'agente antimicrobico. Un'ulteriore possibilità è che tali molecole possano essere incorporate o rivestire speciali pellicole (pellicola commestibile) poste direttamente sulla superficie del cibo (**Figura 8**) [103;104].

La ricorsa all'imballaggio antimicrobico ha come scopo quello di migliorare le misure di sicurezza e preservare la qualità del cibo. L'attenzione a questi requisiti è già alta nell'industria alimentare, pertanto tale procedura non è da intendere come una sostituzione di quelle che sono le solide pratiche di produzione e manipolazione degli alimenti, ma fornire un ulteriore ostacolo da superare per i batteri patogeni e microrganismi deterioranti [105].

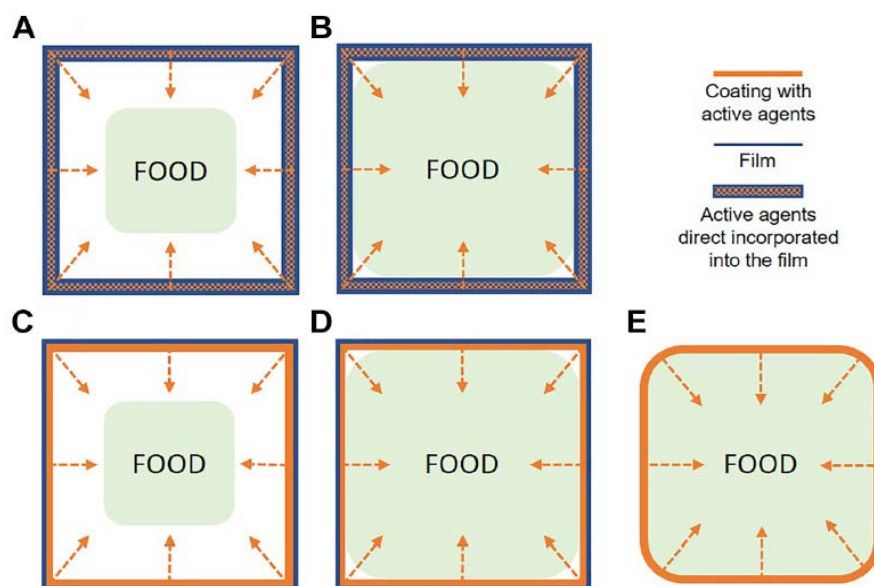


Figura 8. Differenti strategie di incorporazione al film polimerico e tipologia di rilascio degli agenti antimicrobici negli alimenti: **(A)** inclusione della molecola bioattiva nel polimero prima dell'estrusione e rilascio dal materiale con diffusione graduale dal materiale nello spazio di testa; **(B)** incorporazione nel film plastico prima dell'estrusione e diffusione graduale dal materiale nell'alimento per contatto diretto; **(C)** *coating* superficiale sulla pellicola e rilascio nello spazio di testa per diffusione graduale; **(D)** *coating* superficiale sulla pellicola e diffusione graduale dal materiale nell'alimento per contatto diretto; **(E)** pellicola commestibile e diffusione graduale dal materiale nell'alimento per contatto diretto.

Nello sviluppo dell'imballaggio antimicrobico i fattori che devono essere considerati sono la tipologia di microrganismo bersaglio e la composizione del cibo. Per la scelta dell'agente antimicrobico da incorporare nei polimeri bisogna considerare lo spettro di attività, la modalità d'azione, la composizione chimica, il tasso di crescita e lo stato fisiologico dei microrganismi. Infatti, per le molecole che si diffondono dall'imballaggio al cibo sarà determinante, almeno in parte, la cinetica di diffusione [106]. Per le molecole che non diffondono è importante che siano attivi mentre sono legati al polimero. In questo caso gioca un ruolo molto importante il loro meccanismo d'azione, giacché solo se l'effetto di tali molecole è esplicato a livello della membrana cellulare o sulla parete del microrganismo, è possibile che l'antimicrobico attaccato agisca sulle cellule.

3. I Peptidi antimicrobici

I peptidi antimicrobici (AMPs) sono molecole definite anche come peptidi di difesa dell'ospite essendo una componente essenziale del sistema immunitario innato. La loro produzione da parte di organismi multicellulari è volta a proteggere l'organismo ospite dall'insulto operato dai microrganismi patogeni con cui entra in contatto [107;108;109;110]. I peptidi antimicrobici di origine vegetale e animale sono generalmente composti da un numero di residui aminoacidici che può variare dai 10 ai 50 [111] ed hanno generalmente un carattere cationico dovuto ad un eccesso di residui di lisina, arginina e istidina nella loro sequenza [112]. Gli AMPs mostrano attività antimicrobiche ad ampio spettro contro vari microrganismi, compresi i batteri Gram-positivi e Gram-negativi, funghi e virus [107]. Un aspetto particolarmente interessante che li contraddistingue è l'efficacia che molti di essi presentano contro i batteri multi-farmaco resistenti (MDR) e una scarsa tendenza a sviluppare resistenza [113;114;115]. Negli anni '90, un gruppo di ricercatori intuì che disporre di un *database* di peptidi antimicrobici sarebbe stato utile per aiutare a gestire le loro informazioni di base. Così, nel 2003 è stato creato un *database* online di peptidi antimicrobici (APD, <http://aps.unmc.edu/AP/>). Lo scopo di questa banca dati è quello di essere uno strumento per la ricerca e l'istruzione, e la sua versione attuale (APD3) è stata rilasciata nel 2016 come aggiornamento della versione precedente (APD2) risalente al 2009. APD3 si concentra sui peptidi antimicrobici naturali aventi sequenze e attività definite. Esso include più di 2.600 peptidi antimicrobici provenienti da diverse fonti (animali, piante, batteri, protisti e archea). I composti inseriti in APD3 sono classificati come peptidi antibatterici, antivirali, anti-HIV, antimicotici, antiparassitari e anticancro [116]. Tra le funzioni dei peptidi, le proprietà antimicrobiche sono quelle che hanno attirato da subito un maggiore interesse da parte dei ricercatori di tutto il mondo. Si pensa di impiegare queste molecole con grandi potenzialità sia nel campo medico, al fine di sostituire i comuni antibiotici, che nel settore alimentare per aumentare la sicurezza e la conservabilità dei prodotti [117].

3.1. Struttura dei peptidi antimicrobici

L'organizzazione/disposizione strutturale delle molecole antimicrobiche è cruciale per comprendere i loro meccanismi d'azione e la modalità di interazione con i bersagli

biologici. È possibile classificare gli AMPs secondo una varietà di proprietà, ma la classificazione basata sulla loro struttura secondaria è la più comune. Le strutture dei peptidi antimicrobici sono generalmente classificate in α -elica, β -sheet, miste (α -elica/ β -sheet) e cicliche (**Figura 9**).

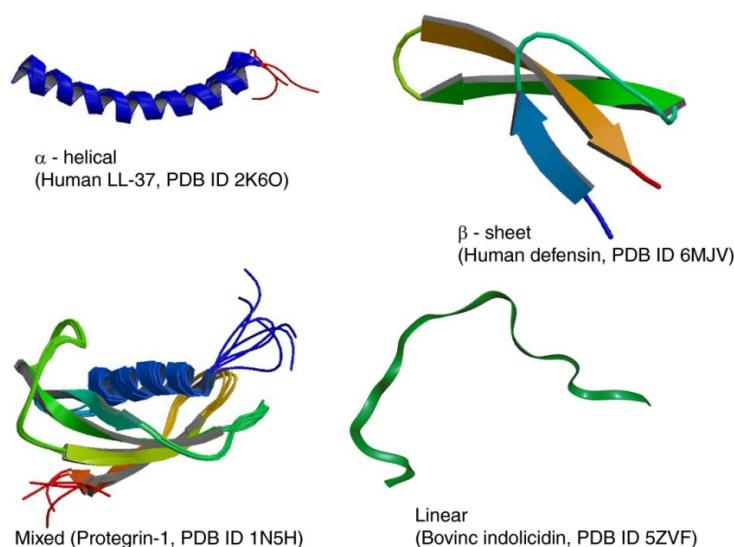


Figura 9. Esempi di arrangiamenti conformazionali di peptidi antimicrobici

Peptidi con conformazione ad α -elica

Forse una delle classi più grandi e meglio studiate è quella composta da peptidi cationici con conformazione ad α -elica anfipatica. Tuttavia, ci sono anche peptidi ad α -elica anionici con proprietà idrofobiche, ma è stato dimostrato che questi presentano una minore selettività verso i microrganismi rispetto alle cellule dei mammiferi. Nella struttura dei peptidi ad α -elica, ogni residuo aminoacidico presenta una rotazione di circa 100° nella struttura elicoidale (l'elica ha 3,6 residui per giro) e una traslazione di $1,5 \text{ \AA}$ ($0,15 \text{ nm}$) lungo l'asse dell'elica [118]. La presenza dei motivi α -elica è un fattore chiave che promuove le interazioni dei peptidi con le membrane bersaglio consentendone la successiva rottura. Pertanto, quando la struttura α -elica si interrompe tramite sostituzioni di aminoacidi, l'attività antibatterica diminuisce significativamente [119]. Inoltre, la conformazione anfipatica della struttura α -elica, in cui i domini cationici e idrofobici sono disposti sulle facce opposte dell'elica, rappresenta un'ulteriore proprietà che facilita l'interazione tra AMPs e membrane cellulari. Se da un

lato la struttura elicoidale di questi peptidi influenza significativamente la potenza antimicrobica, dall'altro essa è anche associata all'attività emolitica e tossicità per le cellule dei mammiferi [120;121]. Tuttavia le strategie basate su sostituzioni di alcuni L-amminoacidi con i loro isomeri D per ottenere stereoselettività [122] o l'inserimento di residui Lys nella faccia non polare dei D-peptidi elicoidali [123], hanno consentito di ridurre l'attività emolitica mantenendo l'attività antimicrobica. Uno dei peptidi cationici elicoidali anfipatici più studiati è la magainina. Si tratta di un peptide di 23 aminoacidi isolato dall'epidermide della rana artigliata africana, *Xenopus laevis*, che mostra attività antimicrobiche verso svariati microrganismi (batteri Gram-positivi e Gram-negativi, funghi e protozoi) e antitumorali [124;125;126]. Il suo meccanismo d'azione prevede un processo di permeabilizzazione della membrana dell'ospite, dove le magainine, cariche positivamente interagiscono preferenzialmente con i fosfolipidi di membrana carichi negativamente per formare eliche anfifiliche, disponendosi parallelamente alla superficie. Cinque eliche formano spontaneamente dei pori che attraversano la membrana, mentre una frazione dei peptidi si trasferisce nei foglietti interni, causandone poi la disattivazione.

Peptidi con conformazione β -sheet (foglietto- β)

Il secondo gruppo di peptidi antimicrobici studiati presenta una conformazione a foglietto- β che consiste di almeno una coppia di due filamenti β disposti uno accanto all'altro e collegati tra loro attraverso diversi legami a idrogeno e/o con legami disolfuro. La presenza di ponti disolfuro è necessaria per la stabilizzazione della struttura e soddisfare la funzione biologica dei peptidi. I ponti salini e la ciclizzazione testa-coda sono ulteriori fattori che sostengono la stabilità complessiva della struttura secondaria dei peptidi. Poiché gli AMPs a foglietto- β possiedono una struttura più stabile, non subiscono cambiamenti conformazionali essenziali in seguito all'interazione con le membrane fosfolipidiche [127]. I peptidi con conformazione β -sheet di solito esibiscono un carattere anfipatico conferito con β -strands segregati spazialmente come domini polari e non polari [128]. Gli AMPs a foglietto- β includono i peptidi β -hairpin e le α -, β - e θ -defensine cicliche. I peptidi antimicrobici β -hairpin sono caratterizzati da foglietti β antiparalleli che costituiscono una forma a forcina stabilizzata da ponti disolfuro *interstrand* [129]. Le defensine rappresentano uno dei gruppi meglio descritti di AMPs con un ampio spettro di attività antimicrobica contro batteri, funghi e virus. Le

α -defensine sono presenti principalmente nei neutrofili mentre le β -defensine sono in gran parte secrete nelle cellule epiteliali di vari tessuti [130]. Le defensine contengono da tre a sei ponti disolfuro e la posizione dei legami disolfuro intramolecolari determinano la classe della defensina. I legami disolfuro che stabilizzano la struttura a triplo filamento β -sheet si trovano nelle posizioni Cys1-Cys6, Cys2-Cys4 e Cys3-Cys5 per le α -defensine e C1-C5, C2-C4 e C3-C6 per le β -defensine. La terza classe di defensine è quella delle θ -defensine, che sono state isolate per la prima volta nei leucociti di macaco *rhesus*. La struttura delle θ -defensine è caratterizzata da una spina dorsale peptidica ciclica interconnessa da tre disolfuri paralleli [131]. La conformazione ciclica della cisteina ladder probabilmente supporta l'attività antimicrobica delle θ -defensine mantenendo la struttura e la stabilità del *backbone* ciclico [132]. Inoltre, i peptidi ciclici altamente stabili hanno una grande superficie e una limitata flessibilità conformazionale, che migliora la capacità di legame e la selettività [133]. È stato indicato che i ponti disolfuro e la circolarità nella θ -defensina-1 umana (retrociclina-1) hanno aumentato l'attività di legame al recettore e hanno inibito l'ingresso di HIV-1 [134].

Peptidi con conformazione mista α -elica/ β -sheet

Un'ulteriore categoria di polipeptidi antimicrobici adotta invece una struttura mista α -elica/ β -sheet, stabilizzata da tre o quattro ponti disolfuro. Questo motivo strutturale α/β stabilizzato con cisteina (CS $\alpha\beta$), che è composto da una singola α -elica e un foglietto- β costituito da due o tre filamenti antiparalleli, è stato riconosciuto per la prima volta nelle defensine degli insetti e nelle neurotossine degli scorpioni [135;136]. Le defensine contenenti CS $\alpha\beta$ sono comunemente presenti nelle piante e negli insetti e hanno mostrato principalmente attività antimicrobica contro funghi e batteri, rispettivamente [137].

Peptidi ciclici

Un'interessante classe di peptidi ampiamente studiata negli ultimi decenni è rappresentata dai peptidi ciclici. Si è visto che il processo di ciclizzazione è responsabile di un potenziamento di caratteristiche fondamentali per tali molecole quali, efficacia, specificità e sicurezza. Dal punto di vista conformazionale, il vincolo introdotto dalla

ciclizzazione, rende la catena peptidica più stabile aumentandone la specificità. In altri termini, a causa di un minor numero di conformazioni alternative si verifica un miglioramento dell'affinità di legame con la proteina bersaglio, riducendo la possibilità che si instaurino legami aspecifici [138]. Inoltre, la ridotta flessibilità conformazionale è causa di un miglioramento in termini di resistenza all'azione di proteasi, in quanto riduce la possibilità di inserimento nel sito catalitico di questi enzimi [139]. Infine, la ciclizzazione aumenta anche l'efficacia delle catene peptidiche in quanto genera una più estesa superficie d'interazione proteina-proteina [140]. La ciclizzazione migliora non solo le proprietà strutturali delle catene peptidiche, ma anche le proprietà farmacocinetiche per l'assorbimento e la permeabilità della membrana biologica che è necessaria per raggiungere i bersagli proteici [141].

3.2.Meccanismo d'azione

La modalità con cui agiscano i peptidi antimicrobici per contrastare la crescita dei microrganismi non è ancora del tutto chiara. La prima idea sviluppata prevedeva che queste molecole entrassero in contatto con le membrane cellulari microbiche, portando alla formazione di pori, con destrutturazione del doppio strato e conseguente collasso cellulare. Studi successivi hanno messo in luce altre possibili modalità d'azione, in particolare basati sull'interazione con specifici bersagli intracellulari e alterazione del normale metabolismo batterico, inibizione della sintesi degli acidi nucleici e proteine, interferenza con la formazione di componenti cellulari (ad esempio la parete cellulare) o ancora inibizione dell'attività enzimatica [142]. Indipendentemente dal meccanismo d'azione, il primo *step* è sempre rappresentato dall'interazione fisica tra il peptide e la cellula microbica bersaglio. L'interazione che si determina è promossa dall'attrazione elettrostatica generata tra i domini carichi positivamente del peptide e le cariche negative esposte sulla superficie esterna della membrana batterica. Tali interazioni non richiedono la presenza di specifici recettori sulla membrana batterica [143;142]. Per i batteri Gram-negativi la penetrazione della membrana cellulare batterica da parte dei peptidi avviene attraverso un meccanismo guidato da interazioni idrofobiche. Si ipotizza che, la molecola peptidica assumi una conformazione spaziale che promuova la formazione di un complesso peptide-membrana. Questo evento, disturbando l'architettura della membrana cellulare esterna promuove un'ulteriore permeazione delle molecole peptidiche, processo che prende il nome di “*self-promoted captation*”.

L'elevato numero di lipidi carichi negativamente è il principale responsabile della selettività con cui la membrana citoplasmatica batterica risponde a specifiche sequenze peptidiche, effetto che non avviene sulle cellule eucariotiche in cui prevalgono lipidi senza carica [142].

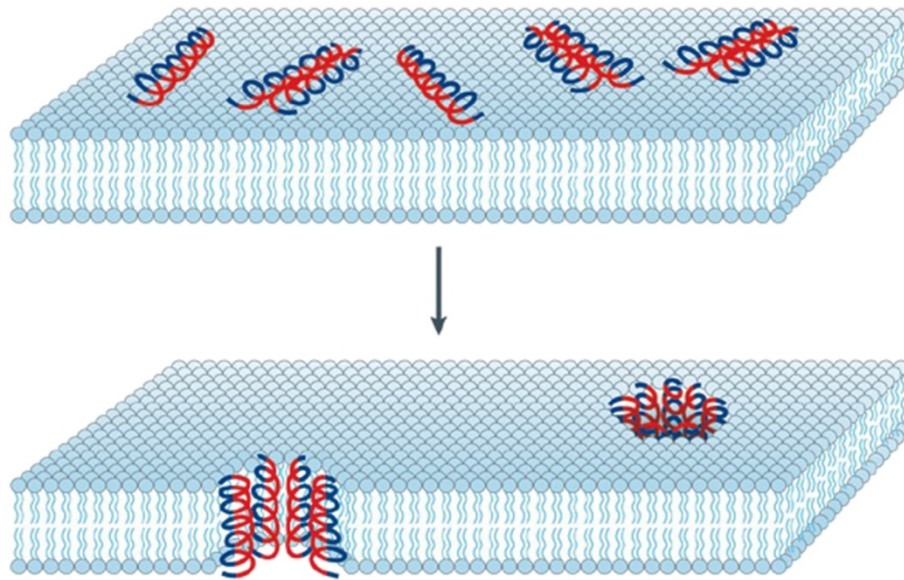


Figura 10. Rappresentazione schematica del modello "*barrel-stave*". Le porzioni idrofile e idrofobiche delle molecole peptidiche sono rappresentate rispettivamente in blu e in rosso. Immagine riprodotta da Brogden (2005)

I modelli più accettati per descrivere il meccanismo d'azione con cui i peptidi operano a livello della membrana citoplasmatica batterica sono il *barrel stave*, il *toroidal pore* e *carpet*. Nel modello *barrel stave* (**Figura 10**) gli AMPs si legano alla membrana inizialmente come monomeri e possono subire una transizione conformazionale che induce un assottigliamento localizzato della membrana. Quando l'accumulo dei peptidi raggiunge una concentrazione soglia, i diversi monomeri vanno incontro ad un processo di oligomerizzazione e successivo inserimento nel nucleo idrofobico della membrana [144;145]. In questo modello le catene peptidiche si aggregano in sovrastrutture cilindriche con le loro porzioni idrofiliche che rivestono il lume del poro e le loro porzioni idrofobiche che interagiscono con i fosfolipidi di membrana [146].

Nel modello denominato *toroidal pore* (**Figura 11**) la formazione dei pori è associata alla formazione di una struttura in cui le molecole antimicrobiche non interagiscono l'una con l'altra come avviene nel modello *barrel stave*, ma con i lipidi della membrana

inducendone una curvatura verso l'interno. Il nucleo interno del poro sarà circondato in parte dai peptidi ed in parte dai lipidi [147].

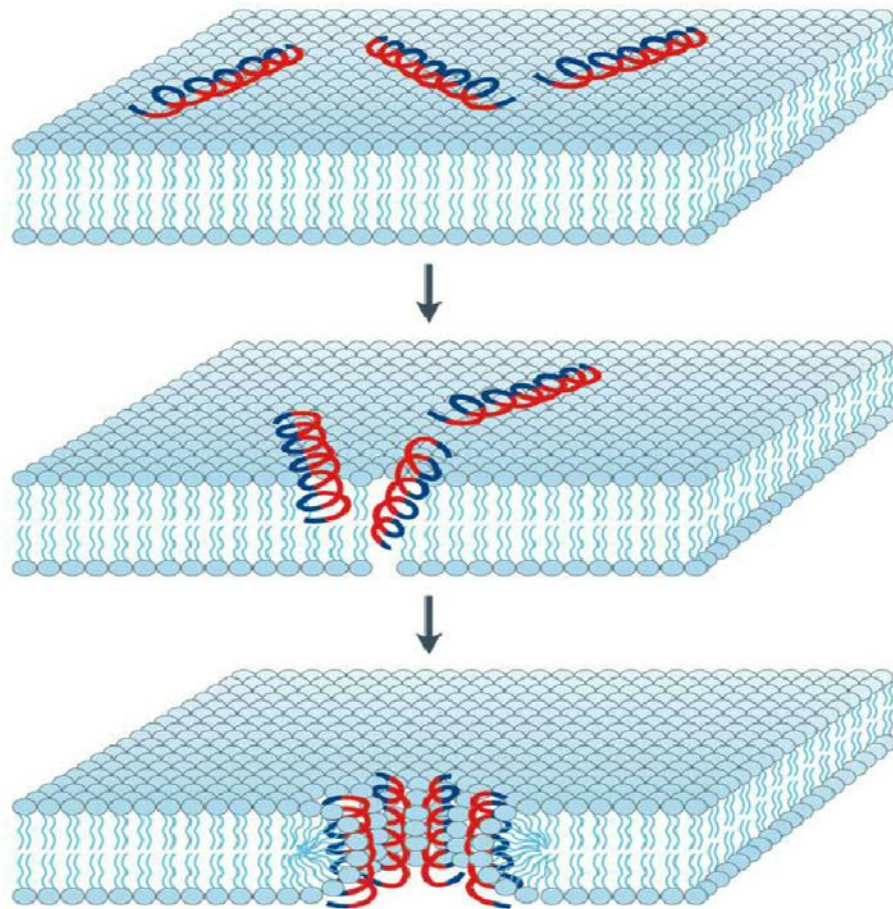


Figura 11. Rappresentazione schematica del modello "toroidal-pore". Le porzioni idrofiliche e idrofobiche delle molecole peptidiche sono rappresentate rispettivamente in blu e in rosso. Immagine riprodotta da Brogden (2005)

Questo modello è il secondo più studiato e caratterizzato dopo il *carpet model* e prevede un'interazione della porzione idrofila delle molecole peptidiche con la porzione polare dei fosfolipidi che compongono la membrana batterica. Successivamente, quando i peptidi entrano in contatto con la componente idrofoba dei fosfolipidi di membrana vanno incontro ad un cambiamento conformazionale e si formano delle strutture elicoidali. Nella fase iniziale, le eliche restano parallele alla membrana batterica, ma quando la concentrazione dei peptidi raggiunge un certo valore soglia, questi cambiano il loro orientamento in modo da disporsi perpendicolarmente alla membrana. Dopo lo sviluppo di un sufficiente stress da parte dei peptidi antimicrobici, si verifica un

assottigliamento e destabilizzazione della membrana, che si traduce nella rottura dell'integrità di questa [148].

Il modello di destabilizzazione della membrana più descritto è il *carpet model* (**Figura 12**), nel quale i peptidi si assemblano e si accumulano in modo parallelo intorno alla membrana dei microrganismi, da qui il nome “modello a tappeto”. Dopo l'accumulo, i peptidi raggiungono una concentrazione critica e si riorientano verso l'interno delle membrane causandone la disintegrazione e successiva formazione di micelle con un nucleo idrofobico [149].

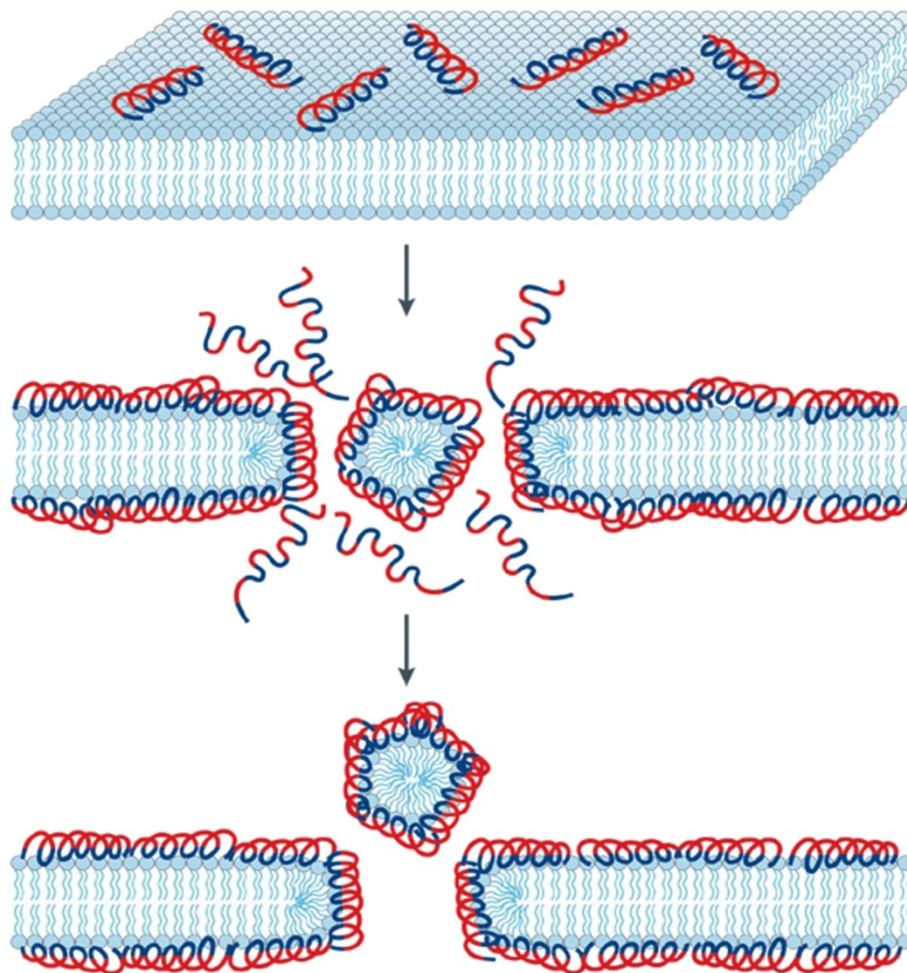


Figura 12. Rappresentazione schematica del modello "carpet-like". Le porzioni idrofiliche e idrofobiche delle molecole peptidiche sono rappresentate rispettivamente in blu e in rosso. Immagine riprodotta da Brogden (2005)

Come precedentemente accennato, anche se l'azione battericida degli AMPs è stata descritta inizialmente come meccanismi di interazione con le membrane cellulari, recentemente è stato scoperto che molti di essi mirano a componenti cellulari essenziali,

dalla cui interruzione funzionale ne scaturisce la morte del microrganismo. In alcuni casi è stato osservato che tali molecole antimicrobiche sono in grado di traslocare all'interno della membrana batterica senza perturbarla e interagire con obiettivi intracellulari specifici bloccando processi cellulari critici. Ad oggi, sono stati descritti molti di questi meccanismi che non coinvolgono direttamente la membrana e prevedono l'inibizione della sintesi di proteine e degli acidi nucleici o la degradazione di enzimi e proteine (**Figura 13**) [150].

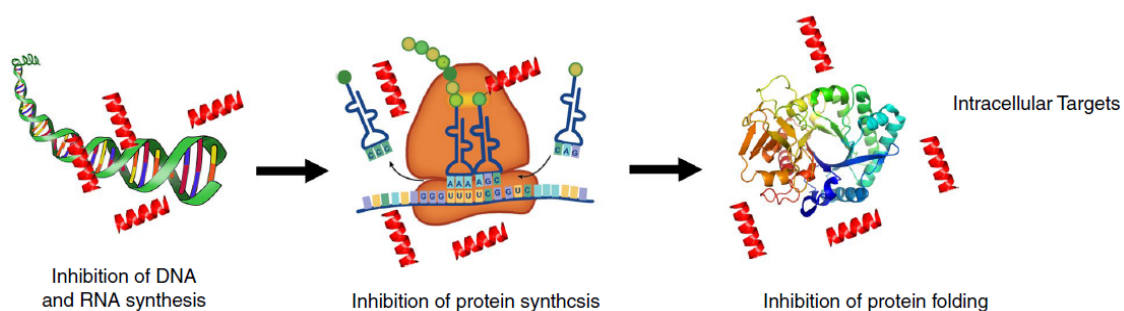


Figura 13. Meccanismi di azione antimicrobica di AMP che prevedono l'interazione con *target* intracellulari

I peptidi ricchi in prolina (PrAMPs) generalmente caratterizzati da un elevato contenuto di residui di prolina e arginina, hanno mostrato un'attività intracellulare inibendo la sintesi proteica batterica. Studi effettuati su due PrAMPs, Bac7 e Tur1A, hanno dimostrato che tali molecole hanno un effetto inibitore interagendo con il ribosoma e inibendo la traduzione, con blocco della transizione dalla fase di iniziazione a quella di allungamento [151;152]. Diversi AMPs transmembrana invece, esplicano il loro potere antimicrobico interagendo con gli acidi nucleici (DNA e/o RNA), come la buforina II che dopo aver attraversato la membrana batterica si lega al DNA e RNA di *E.coli* [153]. Un ulteriore meccanismo noto prevede che gli AMPs agiscano a livello delle proteine chaperon, che guidano il corretto ripiegamento e assemblaggio delle proteine appena sintetizzate. Otvos *et al.* (2000) [154] hanno dimostrato che i PrAMPs come la pirofocoricina, l'apidaecina e la drosocina, sono in grado di bloccare il ripiegamento delle proteine legandosi in modo specifico alla Dna K (proteina da shock termico di 70KDa) e non specifico alla chaperonina batterica di 60 KDa GroEL.

3.3. Progettazione di nuovi peptidi antimicrobici

Il continuo aumento nel numero di epidemie e pandemie nel mondo sta rendendo sempre più popolari i peptidi antimicrobici a causa della necessità di disporre di molecole in grado di arrestare l'avanzata delle malattie provocate da microrganismi patogeni. Oltre all'estrazione da fonti naturali, più recentemente la ricerca sta concentrando le sue energie sulla produzione di AMPs sintetici analoghi alle sequenze naturali, per i quali il ricorso ad alcune modifiche nella progettazione mira a superare le limitazioni di stabilità, tossicità e attività, insite nelle molecole reperibili in natura. Gli AMPs sono una classe di molecole molto eterogenea, le cui sequenze differiscono per lunghezza, struttura e composizione aminoacidica. Tuttavia, alcune caratteristiche sono frequentemente diffuse nella stragrande maggioranza dei peptidi antimicrobici noti e queste sono la presenza di una carica netta positiva e la presenza di un certo numero di aminoacidi idrofobici [155]. Pertanto, le caratteristiche molecolari chiave di questi composti, sono determinate proprio dalla sequenza aminoacidica, dove l'essere ricca in residui di lisina e arginina, nonché di aminoacidi idrofobici come il triptofano, giocano un ruolo determinante nel potenziale potere antimicrobico della molecola [156]. È noto infatti, che la natura cationica e la geometria unica dei legami ad idrogeno dell'arginina e le proprietà chimico-fisiche del triptofano, migliorino le performance antimicrobiche di un peptide, incrementandone la capacità di legare la membrana batterica [157]. In uno studio effettuato da Liu *et al.* (2019) [158] si è visto che modificando la carica netta di AMPs ne derivava un miglioramento nella loro attività. I risultati ottenuti hanno dimostrato che, sostituendo una alanina con una lisina in un peptide analogo alla filloseptina-PHa (PSPHa1), l'aumento della carica positiva ha influenzato positivamente la loro funzione membranolitica. Negli studi di progettazione e sintesi di queste molecole un'ulteriore fattore considerato cruciale per l'interazione degli AMPs con le membrane delle cellule microbiche è l'anfipaticità. Un bilanciamento tra il carattere idrofobico e idrofilo di queste molecole, con l'ottenimento di una struttura chiaramente a carattere anfipatico in una conformazione α -elica, facilita l'attività antibatterica e la loro selettività verso specifici *target* [159]. È stata anche osservata la correlazione esistente tra un eccesso di aminoacidi idrofobici e una forte attività emolitica, in quanto la presenza eccessiva di tali residui ostacola l'iterazione peptide-fosfolipidi di membrana, portando ad una perdita di selettività [160;161]. Ulteriori studi, hanno dimostrato che l'efficacia antimicrobica di peptidi naturali non risiede nell'intera

sequenza aminoacidica, infatti in molti casi si è visto che una piccola porzione di essa presenta un'eguale, se non addirittura superiore, attività antimicrobica rispetto al peptide originale. A tal proposito, lo sviluppo di AMPs a catena corta offre alcuni vantaggi come la facilità di sintesi e un minor consumo di reagenti, con un ritorno economico e un minor impatto sull'ambiente [162;163]. Gli approcci con cui la ricerca recente è a caccia di nuovi AMPs con proprietà desiderate, sono in continua evoluzione. Ad oggi, possono essere distinti tre diverse strategie sperimentali che vertono sulla modifica di sequenze di AMPs noti, modellazione biofisica per capire l'attività del peptide ed infine sullo *screening* virtuale.

Studi volti ad identificare nuovi peptidi con una maggiore attività antimicrobica e ridotta tossicità partendo da una molecola nota usata come *template*, hanno consentito di individuare quelli che sono gli aminoacidi e le posizioni importanti per l'attività, attraverso la sostituzione di un singolo aminoacido nella sequenza. Tuttavia, è evidente che tali approcci "locali" non tengano conto delle interazioni tra gli aminoacidi che influenzano la conformazione tridimensionale globale del peptide [164]. Inoltre, è chiaro che quando si confrontano due studi di sostituzione degli aminoacidi, le sostituzioni che favoriscono l'attività variano a seconda della sequenza del modello, il che vuol dire, che sostituzioni analoghe possono avere effetti sostanzialmente diversi in posizioni diverse nella sequenza primaria [165]. A differenza del metodo di progettazione basato su *template*, in cui i peptidi sono trattati come un "testo" i cui costituenti, ovvero gli aminoacidi, rappresentano le "lettere" con proprietà individuali come carica ed idrofobicità, gli studi di modellazione biofisica mirano a comprendere l'attività degli AMPs e progettare delle varianti migliorate, esaminando le strutture peptidiche in ambienti idrofobici o modellando i peptidi a livello atomico. Questi studi includono esempi di *molecular modelling* basati sulla perturbazione dell'energia libera, simulazione di dinamica molecolare e calcoli termodinamici delle interazioni dei peptidi con le membrane [166]. L'ultimo approccio è rappresentato dagli studi di *screening* virtuale che, a dispetto degli studi computazionali, non cerca di creare modelli immediatamente e facilmente interpretabili. Esso sfrutta metodi numerici per determinare, a partire dalla struttura primaria e dalle caratteristiche chimico-fisiche, le proprietà quantificabili dei peptidi come ad esempio, la carica, l'idrofobicità, l'idrofilicità e l'idropaticità, sono impiegati per mettere in relazione tali proprietà con le attività biologiche utilizzando i modelli SAR.

Scopo della tesi

Ad oggi, l'industria alimentare sta affrontando sempre nuove sfide dovute all'insorgenza dei cosiddetti patogeni emergenti e allo sviluppo per molte specie microbiche di profili di resistenza nei confronti dei più comuni antibiotici, rappresentando una continua minaccia per la salute pubblica. Vi è quindi un crescente interesse verso soluzioni innovative che consentano di aumentare la conservabilità degli alimenti mantenendo alti gli standard di qualità e sicurezza. In questo scenario si inserisce il presente progetto di tesi riguardante la “Progettazione e caratterizzazione di nuovi composti antimicrobici per applicazioni nel settore alimentare”, svolto in collaborazione con il partner aziendale Materias s.r.l. Il progetto si propone di sviluppare un imballaggio “attivo” identificando e ottimizzando le condizioni in grado di coniugare in modo stabile, ad uno dei film plastici più largamente adoperati per il confezionamento alimentare, due peptidi antimicrobici progettati dal gruppo di ricerca della Dott.ssa Palmieri.

La progettazione delle due molecole antimicrobiche è avvenuta attraverso due diversi tipi di approcci sperimentali utilizzando sequenze note usate come *template*. La molecola denominata 1018-K6, oggetto di un brevetto depositato da Materias s.r.l. (No. 102017000080068, 2017), è stata sviluppata a partire da sequenze di diverse catelicidine bovine, peptidi coinvolti nella risposta immune innata e localizzati a livello dei granuli dei neutrofili polimorfonucleati, i quali, come le altre molecole appartenenti alla stessa categoria, sono ben noti per il loro ampio spettro d'azione. La molecola denominata MTP1, dove MTP sta per “*Mitochondrial Targeted Peptides*”, è stata disegnata usando come modello sequenze specifiche di proteine mitocondriali note. L'idea di utilizzare come riferimento tratti di proteine mitocondriali è stata suggerita da studi recenti che hanno dimostrato, per taluni peptidi antimicrobici, un effetto citotossico a carico di cellule tumorali, in quanto in grado di operare un danno selettivo a livello della membrana mitocondriale. Un'ulteriore evidenza che ha avvalorato la potenzialità di questa strategia di progettazione, si basa sulla presenza nelle membrane batteriche di almeno il 5% delle proteine che costituiscono la membrana mitocondriale. Da ciò è scaturita l'ipotesi che MTP1 potesse agire come peptide ad attività antimicrobica attraverso l'interazione e conseguente destabilizzazione della membrana plasmatica in batteri patogeni. Le due suddette sequenze, già oggetto da qualche anno di studi preliminari circa il loro potere antimicrobico, hanno mostrato una selettività

verso bersagli microbici differenti. Da qui, l'idea di utilizzarle nel seguente progetto anche in combinazione, allo scopo di ottenere un'unica soluzione avente potenzialmente un più ampio spettro d'azione antimicrobica.

Lo studio ha previsto una prima fase di caratterizzazione strutturale delle molecole antimicrobiche sia singolarmente che in miscela, in diverse condizioni ambientali di pH, temperatura e salinità. La sperimentazione sviluppata in un intervallo temporale di 24 h, ha inoltre permesso di selezionare le soluzioni peptidiche risultate più stabili, ovvero in grado di preservare l'integrità strutturale, nelle diverse condizioni investigate. Successivamente, presso i locali del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università Federico II di Napoli, in collaborazione con il gruppo di ricerca del Prof. Anastasio, le molecole selezionate sono state sottoposte ad analisi di attività antimicrobica nei confronti di quattro microrganismi sia patogeni che non, isolati da matrici alimentari quali: *Staphylococcus aureus* MRSA M7 isolato da carne di suino, *Staphylococcus aureus* SA 4 isolato da un prodotto lattiero-caseario (Svizzera), *Listeria monocytogenes* 92 isolato da carne bovina e lieviti. Parallelamente alla valutazione del loro potere antimicrobico, le stesse molecole sono state sottoposte ad analisi di citotossicità, per verificare la mancanza di effetti avversi nei confronti di cellule eucariotiche, tale da incoraggiarne l'uso a livello biotecnologico. Infine sono state messe a punto le condizioni di bioconiugazione dei bio-composti ai film di polipropilene ottenendo diverse soluzioni di polimeri funzionalizzati. Negli ultimi anni, il *packaging* antimicrobico si sta facendo sempre più largo nel settore degli imballaggi, in quanto il suo impiego presenta risvolti positivi sia a livello sociale che economico. Inoltre, è importante ricordare che la strada che conduce alla registrazione di un nuovo tipo di *packaging* alimentare non è priva di ostacoli, in quanto esiste una stringente normativa che regola sia a livello nazionale che europeo l'utilizzo dei film plastici nel settore della *food industry*. In tale contesto va tenuto conto che l'imballaggio alimentare non va inteso come una semplice barriera protettiva, ma esso rappresenta un vero e proprio componente "attivo", che dovrebbe preservare la qualità, la sicurezza e la *shelf-life* degli alimenti. Nel presente studio, il *target* alimentare dell'imballaggio progettato è stato scelto nell'ambito di tre diverse tipologie di prodotti maggiormente riconosciuti per la loro facile deperibilità quali quelli lattiero-caseari, carnei e ittici, per i quali il mantenimento dell'integrità per un tempo più lungo, anche di pochi giorni, si traduce spesso in un considerevole ritorno economico.

Materiali e metodi

1. Produzione dei peptidi

La sintesi delle sequenze antimicrobiche 1018-K6 e MTP1, è stata commissionata all'azienda olandese GenScript Biotech (Leiden). Come suggerito dalla stessa casa produttrice, le molecole sintetizzate sono state conservate sotto forma di liofilizzati alla temperatura di $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Prima di procedere con le diverse sperimentazioni, sono state preparate delle soluzioni madri aventi una concentrazione pari a 10 mM ottenute dissolvendo il liofilizzato in DMSO al 100%. Tali soluzioni sono state vortexate, sonicate e successivamente diluite per portarle alla concentrazione desiderata.

2. Analisi spettroscopiche

2.1. Spettroscopia di fluorescenza

L'emissione della fluorescenza intrinseca legata alla presenza di residui di triptofano (Trp) in entrambe le molecole peptidiche oggetto del presente studio (1018-K6 e MTP1) è stata monitorata tra i 300 e i 400 nm ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 280 nm. Le misure di fluorescenza sono state effettuate con uno spettrofluorimetro Shimadzu RF-6000 (Kyoto, Giappone) munito di bagnetto termostato alla temperatura di $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizzando una cuvetta con un cammino ottico di 1 cm in direzione di eccitazione e di 1 cm in direzione di emissione. Per valutare l'effetto del pH sul *folding* dei peptidi MTP1 e 1018-K6, nonché delle miscele ottenute da un diverso assortimento di entrambi, le molecole sono state disciolte nei tamponi 10 mM glicina HCl pH 2.0, 10 mM Tris HCl pH 7.0 e 10 mM glicina NaOH pH 10.0, ad una concentrazione finale di 50 μM ed incubate fino ad un massimo di 24 h. La stabilità conformazionale alla temperatura è stata analizzata incubando i peptidi e le loro miscele alla concentrazione finale di 50 μM in tampone 10 mM Tris HCl pH 7.0 a tre diverse temperature (4, 37 e $90\text{ }^{\circ}\text{C}$) fino ad un massimo di 24 h. Per indurre la strutturazione delle molecole antimicrobiche, tutte le analisi sono state effettuate in presenza di una concentrazione 3 mM del detergente SDS, che viene ampiamente utilizzato per mimare la composizione anionica delle membrane batteriche.

2.2. Dicroismo circolare

Gli elementi di struttura secondaria dei peptidi MTP1, 1018-K6 e delle relative miscele sono stati analizzati mediante spettroscopia di dicroismo circolare. Le misure di dicroismo circolare sono state eseguite con uno spettropolarimetro JASCO J-810 (Kyoto, Giappone) dotato di un sistema di controllo di temperatura e nell'intervallo di lunghezze d'onda di 195-250 nm, utilizzando una cella in quarzo con un cammino ottico di 0,1 cm (Hellma Analytics, Milana, Italia). Gli spettri sono stati registrati ad una velocità di scansione di 20 nm/min ed una larghezza di banda di 5 nm, effettuando 5 accumuli. Le misure sono state effettuate per ciascun peptide o miscela ad una concentrazione di 50 μ M in presenza di 3 mM di SDS e in diverse condizioni ambientali di pH e temperatura fino a 24h di incubazione. Per stimare le possibili variazioni in termini di struttura secondaria dovute al pH della soluzione, le analisi sono state effettuate in tamponi aventi una concentrazione pari a 10 mM di: glicina HCl pH 2.0, Tris HCl pH 7.0 e glicina NaOH pH 10.0. Per ottenere informazione circa gli effetti della temperatura sulla struttura secondaria, le singole molecole e le loro miscele sono state disciolte in tampone di Tris HCl pH 7.0 10 mM ed incubate fino ad un massimo di 24 h alle temperature di 4, 37 e 90 °C. Per tutte le misure effettuate, la linea di base degli spettri CD è stata corretta sottraendo lo spettro del tampone.

3. Analisi della stabilità in alto sale

Gli effetti della forza ionica sulla stabilità delle molecole peptidiche sono stati valutati mediante analisi cromatografica a fase inversa condotta su uno strumento HPLC (cromatografia liquida ad alta prestazione) utilizzando una colonna C18. Nello specifico, i peptidi antimicrobici presenti singolarmente o in miscela sono stati disciolti ad una concentrazione di 50 μ M in una soluzione 1 M di cloruro di sodio (NaCl) ed incubati per un tempo massimo di 24 h a 25 °C. Successivamente, 200 μ l delle soluzioni peptidiche prelevate ai diversi tempi di incubazione (0, 6 e 24 h) sono state iniettate su colonna a fase inversa C18 μ Bondapak (3.9 mm $\times$ 300 mm, Waters Corp., Milford, MA, USA) connessa ad un sistema HPLC (Shimadzu, Milano, Italia) e sottoposte a separazione cromatografica applicando un gradiente lineare dal 5 al 95% di acetonitrile e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.1%. Le soluzioni dei peptidi (50 μ M) al tempo 0 (t = 0) sono state utilizzate come campioni di riferimento. La stabilità dei peptidi in

presenza della soluzione salina è stata valutata confrontando l'area dei picchi ottenuti ai diversi tempi di incubazione con quella del corrispondente peptide al tempo $t = 0$.

4. Test di vitalità cellulare

Per valutare gli eventuali effetti citotossici dei peptidi oggetto del presente studio a carico di cellule eucariotiche, sono stati effettuati saggi di vitalità cellulare utilizzando il *Cell Counting Kit-8* (Dojindo Eu GmbH). Tre diverse linee cellulari umane ottenute dall'American Type Culture Collection (ATCC), ovvero cheratinociti (HaCAT), linee cellulari di fibroblasti polmonari fetali (WI-38) ed adulte (TIG-3), sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ad una densità di 5×10^4 cellule/pozzetto in terreno *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, DIFCO), supplementato con l'1% di L-glutamina e il 10% di siero fetale di vitello (FCS, DIFCO), e coltivate per 16 h alla temperatura costante di 37 °C ed in atmosfera controllata al 5% (v/v) di CO₂. Successivamente, le cellule sono state trattate per 24 h con i peptidi MTP1 e 1018-K6 a due diverse concentrazioni (20 e 50 µM) e con le miscele Mix2 e Mix3 alla massima concentrazione (50 µM), utilizzando le cellule non trattate come controlli negativi. Al termine del tempo di incubazione, sono stati aggiunti al terreno di coltura 50 µl/pozzetto della soluzione CCK8. Dopo 3 h di incubazione a 37 °C, si è proceduto alla misura dell'assorbanza a 450 nm con un lettore di piastre.

5. Analisi della morfologia cellulare

Gli effetti dei trattamenti con i peptidi 1018-K6, MTP1 e delle rispettive miscele (Mix2 e Mix3) sulla morfologia delle cellule eucariotiche HaCAT, WI-38 e TIG-3 sono stati valutati cellule mediante microscopia a contrasto di fase. Dopo aver cresciuto le cellule in terreno DMEM (DIFCO) addizionato con 1% di L-glutamina e 10% FCS (DIFCO), queste sono state seminate in piastre da 24 pozzetti ad una densità di 5×10^4 cellule/pozzetto e incubate per 16 h a 37 °C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂. Le cellule sono state quindi trattate con diverse concentrazioni (0; 0,5; 1,5; 10; 20; 40 e 50 µM) dei due peptidi MTP1 e 1018-K6 e con una concentrazione pari a 50 µM delle miscele Mix2 e Mix3, utilizzando come controlli negativi le cellule non trattate. Trascorse le 24 h di trattamento, le cellule sono state lavate con tampone PBS (Phosphate Buffered Saline), fissate con paraformaldeide al 4% (PFA) per 30 min e visualizzate al microscopio a contrasto di fase utilizzando il microscopio invertito

completamente automatico DMI6000B con telecamera DFC420 RGB (Leica Microsystems, Wetzlar, Germania). Il software Leica LASV5.4 è stato utilizzato per l'acquisizione/elaborazione delle immagini (regolazione del contrasto/ γ)

6. Test di attività antimicrobica

I ceppi di campo di *Listeria monocytogenes* 92 (isolato da carne bovina), di *Staphylococcus aureus* SA 4 (isolato da un prodotto lattiero-caseario, Svizzera), *Staphylococcus aureus* MRSA M7 (isolato da carne di suino) e Lieviti, sono stati messi in coltura in Muller Hinton Broth ed incubati per 24 h a 37 °C. Successivamente, le colture batteriche sono state seminate su Nutrient Agar ed incubate per ulteriori 24 h a 37 °C. Per ottenere la sospensione batterica di partenza, le colonie isolate per ogni ceppo di riferimento sono state risospese in una soluzione salina allo 0,85%, ed incubate fino al raggiungimento di un grado di torbidità uguale a 0,5 della scala Mc Farland, verificata misurando l'assorbanza della sospensione a 600 nm. Le sospensioni batteriche sono state incubate fino ad un valore di densità ottica corrispondente ad una concentrazione di $1-2 \times 10^8$ Unità Formanti Colonia (CFU)/mL. Le sospensioni batteriche sono state ulteriormente diluite con terreno Muller Hinton Broth ad una concentrazione cellulare di 10^3 CFU/mL, ed incubate per 24-48 h a 37 °C. Ogni ceppo è stato sottoposto a trattamento con diverse concentrazioni dei peptidi singoli (1018-K6 e MTP1) e delle due miscele selezionate (Mix2 e Mix3). Le soluzioni peptidiche di partenza aventi una concentrazione di 10 mM in DMSO sono state diluite in un volume finale di 100 μ l di sospensione batterica (10^3 CFU/mL) in modo tale da avere una concentrazione finale pari a 2,5, 15 e 37,5 μ M per i peptidi singoli e a 10, 20 e 50 μ M per le miscele ed incubate a 37 °C per 20 h. L'inoculo batterico non messo a contatto con le molecole antimicrobiche è stato utilizzato come controllo. Trascorso il tempo stabilito, i diversi campioni sono stati seminati su piastre Nutrient Agar ed incubati per 24 h a 37 °C. Tutti gli esperimenti di attività antimicrobica sono stati condotti in triplicato per almeno tre volte.

7. Test dell'attività antibiofilm

L'efficacia dei peptidi antimicrobici nell'inibire la formazione del biofilm è stata valutata nei confronti di *L. monocytogenes* 92 e *S. aureus* MRSA M7. Le sospensioni batteriche sono state diluite nel terreno di coltura ad una concentrazione finale di 5×10^4 CFU/mL, da cui sono stati prelevati 20 μ l che sono stati aliquotati nei pozzetti di una multiwell da 96 pozzetti a fondo piatto, contenenti 230 μ l delle soluzioni peptidiche diluite in terreno di crescita (Muller–Hinton Broth) alle concentrazioni finali di 2,5, 15 e 37,5 μ M. Dopo aver incubato le micropiastre a 37 °C per 24 h, da ciascun pozzetto è stato allontanato il surnatante e sono stati effettuati 3 lavaggi con 300 μ l di acqua distillata. Le cellule batteriche adese al fondo dei pozzetti sono state fissate mediante incubazione di 15 min a 37 °C con 250 μ l di metanolo, che è stato poi allontanato. I pozzetti sono stati quindi asciugati e le cellule batteriche sono state colorate con 250 μ l di una soluzione di Crystal Violet 0,1 % per 5 min. Successivamente, i pozzetti sono stati lavati sotto acqua corrente, asciugati e riempiti con 250 μ l di acido acetico glaciale al 33% per solubilizzare il colorante contenuto nel biofilm. La densità ottica in ciascun pozzetto è stata misurata con un lettore di piastre ad una lunghezza d'onda di 630 nm. Il test di attività antibiofilm è stato eseguito per tre volte verso entrambi i ceppi batterici.

8. Attivazione al plasma del film polimerico

Per l'ottenimento di polimeri attivati è stata adoperata la tecnologia Openair-Plasma®. Superfici circolari del diametro di 5 cm sono stati intagliati da fogli di polipropilene (PP) commerciale e posti sulla piastra ad una distanza di 3 cm dagli ugelli. La procedura ha previsto l'impiego di aria come gas di trattamento che è stato applicato ad una pressione di 74 mbar, con un flusso di 30 l/min, una potenza di 400 Watt ed una velocità di 10 mm/sec.

9. Caratterizzazione della superficie polimerica attivata

L'effetto del plasma sulle superfici polimeriche è stato valutato utilizzando il test Ink (*Plasmatreat*), che prevede l'impiego di inchiostri che consentono di determinare la bagnabilità del materiale plastico attivato.

Gli inchiostri, con valori di tensione superficiale da 48 e 72 mN/m, sono stati applicati con un pennellino in strato sottile sulle superfici trattate. Quindi, si è misurato il tempo

impiegato dal liquido per dividersi in goccioline. La stessa procedura è stata effettuata sui polimeri non trattati.

10. Immobilizzazione dei peptidi singoli e in miscela sui polimeri pre-attivati

I dischi di PP pre-attivati dal trattamento al plasma atmosferico, sono stati posti in piastre Petri ed incubati con le soluzioni peptidiche di MTP1 e 1018-K6 (15 mL) preparate in acqua ultrapura a tre diverse concentrazioni (50, 100 and 200 μ M) per circa 6 h a 70 °C per rimuovere completamente l'acqua e favorire l'interazione tra la superficie polimerica e le molecole peptidiche. Dopo la totale evaporazione dell'acqua, i dischi di PP funzionalizzati sono stati incubati in uno stesso volume di acqua distillata (15 mL) per 16 h a temperatura ambiente sotto agitazione.

Infine, la soluzione acquosa ancora a contatto con il disco di polipropilene è stata sonicata per 20 min per allontanare la quota di peptide non legata covalentemente al film polimerico. Lo stesso protocollo è stato utilizzato per la funzionalizzazione dei dischi di PP con la miscela Mix2 ad una concentrazione finale di 50 μ M.

11. Analisi mediante tecniche microscopiche dei peptidi immobilizzati su polimeri di polipropilene

11.1. Stereomicroscopia di superficie

Per confermare l'avvenuta funzionalizzazione dei dischi PP con i due peptidi 1018-K6 e MTP1, i film polimerici funzionalizzati e non con entrambi gli AMPs sono stati sottoposti ad analisi mediante stereomicroscopia di superficie utilizzando uno stereomicroscopio Leica MZ16-FA (Wetzlar, Germania). L'acquisizione/elaborazione delle immagini ottenute è stata effettuata per mezzo del software Leica EZ.

11.2. Microscopia confocale a scansione laser

Al fine di valutare la localizzazione superficiale dei peptidi sul film plastico a seguito della procedura di funzionalizzazione, i campioni sono stati esaminati mediante microscopia confocale. In tale analisi, i polimeri controllo e quelli bio-coniugati con il peptide 1018-K6 marcato con la Fluoresceina-5-isotiocianato (FITC), preparati come descritto nel capitolo precedente, sono stati sottoposti ad analisi microscopica

utilizzando un microscopio confocale Nikon A1 (Eclipse Ti-E, NIKON, Giappone) munito di un obiettivo ad immersione ad olio 60X con N.A=1.40. Per visualizzare la molecola peptidica marcata con FITC è stata utilizzata una linea di eccitazione di 492 nm e un intervallo di lunghezza d'onda di 500-550nm. Le immagini sono state acquisite con una risoluzione di 1024x1024 pixels e processate con software NIS-Elements Advanced Research.

12. Analisi della resa di legame

La quantità di peptide legata al film plastico pre-attivato è stata determinata mediante cromatografia a fase inversa (RP-HPLC) (Shimadzu, Milano, Italia) utilizzando una colonna C18 μ Bondapak della Waters (3.9 mm $\times$ 300 mm). Ultimata la procedura di immobilizzazione, 200 μ l della soluzione peptidica posta a contatto con il disco di polipropilene sono stati analizzati cromatograficamente applicando un gradiente lineare 5 - 95% di acetonitrile e acido trifluoroacetico (TFA) allo 0.1%. La resa di legame è stata stimata indirettamente calcolando la quota di peptide non legata rimasta in soluzione dopo la reazione di immobilizzazione. Come riferimento, è stata utilizzata la soluzione peptidica al tempo zero e preparata alla stessa concentrazione impiegata nella reazione di coniugazione. Nello specifico, la quantità di peptide covalentemente legato ai polimeri (espressa in percentuale) è stata determinata confrontando l'area del picco corrispondente alla quantità di peptide non legato con l'area del picco della soluzione peptidica di riferimento. La determinazione della concentrazione di peptide legato è stata effettuata anche per interpolazione di una retta di calibrazione costruita utilizzando concentrazioni note di MTP1 e 1018K-6. Tutte le misurazioni sono state eseguite in triplicato su tre diverse preparazioni.

13. Analisi di rilascio

Per determinare la stabilità del legame instauratosi tra le molecole peptidiche e il film polimerico, è stato eseguito un test di rilascio mediante cromatografia RP-HPLC. Dopo la reazione di coniugazione, i dischi funzionalizzati sono stati immersi in 15 mL di una soluzione salina all'1% di NaCl e tenuti per 24 h a 4 °C. Trascorso il tempo stabilito, la soluzione è stata raccolta e analizzata su colonna RP-C18. Le soluzioni a contatto con i polimeri funzionalizzati al tempo $t = 0$ sono state utilizzate come campioni di controllo

e analizzate in parallelo. Tutte le misure sono state eseguite in triplicato su tre diverse preparazioni.

14. Test di attività antimicrobica su matrice alimentare

14.1. Preparazione della matrice lattiero-casearia

Le porzioni (n. 3) di ricotta di bufala da 200 g sono state fornite da un caseificio campano. Da ciascuna porzione sono stati prelevati e pesati in sterilità 30 g di ricotta che sono stati messi in contatto con i dischi di polipropilene funzionalizzati e chiusi all'interno di una piastra Petri. I dischi non funzionalizzati sono stati utilizzati come controllo. I campioni così allestiti sono stati conservati a 4 ± 1 °C fino ad un massimo di 10 giorni. Le analisi microbiologiche sono state effettuate a 4 e 10 giorni.

14.2. Preparazione della matrice a base di carne

Le matrici a base di carne su cui è stata svolta la sperimentazione, ovvero hamburger bovino e due diversi tagli di carne bovina (scamone e filetto), sono state fornite da un impianto di macellazione campano. Per l'hamburger bovino tre porzioni da 50 g sono state pesate in sterilità e messe a contatto con i film plastici funzionalizzati e riposti in piastre Petri. I campioni così allestiti sono stati conservati a 4 ± 1 °C per un tempo massimo di 12 giorni. I tagli bovini di scamone e filetto sono stati acquistati sottovuoto. Per le analisi, l'imballaggio è stato aperto in sterilità e i tagli di carne sono stati posizionati tra due dischi di PP funzionalizzati e richiusi sottovuoto. Gli imballaggi così preparati sono stati conservati fino a 14 giorni ad una temperatura di refrigerazione pari a 4 ± 1 °C. Le stesse procedure con i film non funzionalizzati sono state effettuate per i campioni controllo. La valutazione del profilo microbiologico è stata effettuata per l'hamburger bovino a 4 e 12 giorni, mentre per i due tagli bovini conservati sottovuoto direttamente a 14 giorni.

14.3. Preparazione della matrice ittica

Differenti tranci di salmone fresco (*Salmo salar*, Linnaeus 1758) sono stati acquistati presso un'azienda ittica locale (Napoli, Italia). Per la sperimentazione, due campioni di circa 50 g sono stati tagliati in sterilità da ogni trancio e adoperati per la verifica

dell'efficienza dei polimeri funzionalizzati. L'allestimento dei campioni ha previsto la suddivisione in due gruppi: i campioni controllo (CTRL-PP), rappresentati dai filetti di salmone posti a contatto con i film di polipropilene pre-attivati e non funzionalizzati con i peptidi antimicrobici ed i campioni trattati, dove la matrice alimentare è stata conservata in presenza dei polimeri funzionalizzati con le molecole peptidiche. I campioni così preparati sono stati posti in piastre Petri e conservati ad una temperatura di refrigerazione di 4 ± 1 °C fino ad un massimo di 7 giorni. I prelievi e le successive analisi microbiologiche sono state eseguite a 4 e 7 giorni.

14.4. Analisi microbiologiche

Per ciascuna matrice alimentare, 10 g di prodotto sono stati prelevati in condizioni di sterilità da ciascun campione in corrispondenza dei diversi tempi di analisi e miscelati all'interno di un sacchetto stomacher sterile con 90 mL di acqua peptonata tamponata (Buffered Peptone Water, BPW, Oxoid). La miscela campione/diluente è stata immediatamente omogeneizzata per 3 min a 230 rpm in un omogeneizzatore peristaltico (BagMixer® 400 P, Interscience, Saint Nom, Francia). Per ciascun omogenato si è proceduto ad allestire dieci diluizioni decimali seriali in BPW e alla semina sull'adatto terreno nutritivo agarizzato per procedere con le analisi microbiologiche specifiche. La conta batterica totale aerobica per microrganismi mesofili e psicrofili è stata effettuata su terreno selettivo Plate Count Agar (PCA, Oxoid, Madrid, Spagna), incubando i campioni a 30 °C per 48/72 h e a 7 °C per 10 giorni seguendo le procedure ISO di riferimento, rispettivamente ISO 4833-1:2013 e ISO 17410:2019. L'enumerazione dei coliformi totali è stata effettuata su terreno selettivo Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL, Oxoid, Madrid, Spagna), incubando le piastre a 37 °C per 48 h seguendo la procedura ISO 4831:2006. Per le enterobatteriacee, le cellule sono state piastrate su Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG, Oxoid, Madrid, Spagna) ed incubate a 37 °C per 48 h (ISO 21528-2:2017). L'enumerazione dei lattobacilli è stata effettuata su piastre di terreno selettivo MRS agar (Oxoid, Madrid, Spagna) incubate a 37 °C per 72 h come da ISO 15214:2015. La conta di *Pseudomonas* spp. è stata determinata secondo la ISO 13720:2010 su terreno *Pseudomonas* Agar Base supplementato con CFC (Oxoid, Madrid, Spain) incubando le piastre a 25 °C per 48 h. Per *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi, l'enumerazione è stata effettuata su Triptone Bile X-glucuronide Agar (TBX, Oxoid, Madrid, Spagna) dopo incubazione a

44 °C per 24 h (ISO 16649-1:2018). *Brochothrix thermosphacta* su STAA (streptomycin thallos acetate actidione agar, Oxoid, Madrid, Spagna) incubando a 37 °C per 48 h; *Enterococcus faecalis* su KAA (Kanamycin Aesculin Azide, Oxoid, Madrid, Spagna) a 37 °C per 48 h; gli stafilococchi coagulasi su Baird-Parker Agar (Oxoid, Madrid, Spagna) a 37 °C per 24/48 h (ISO 6888-1:1999). Infine, per l'enumerazione di lieviti e muffe, seguendo la ISO di riferimento (21527-1:2008), le cellule sono state piastrate su DRBC (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) Agar e incubate a 25 ± 1 °C per 5 giorni. I risultati ottenuti sono stati espressi come logaritmo del numero di unità formanti colonia per unità di peso (grammo) del campione in esame (CFU/g). Tutte le misurazioni sono state effettuate in triplicato ed i risultati espressi come medie $\pm$ deviazione standard (SD).

15. CHALLENGE TEST per *Listeria monocytogenes*

L'hamburger bovino e il salmone fresco sono stati sottoposti ai *challenge test* verso *L. monocytogenes*. Diversi porzioni di ciascuna matrice sono stati testati secondo il metodo AFNOR-BRD 07/10-04/05-Real Time PCR per provare la totale assenza di contaminazione pregressa da parte del batterio scelto per le analisi. Per la contaminazione dei filetti di salmone, sono stati selezionati tre ceppi di *L. monocytogenes* isolati dal pesce, seguendo la norma ISO 11290-1, e conservati nella biobanca dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. Per la contaminazione dell'hamburger bovino sono stati selezionati due ceppi di *Listeria*: il ceppo *L. m.* serotipo 1/2c isolato da carne macinata bovina e *L. m.* serotipo 1/2c isolato da carpaccio bovino, conservati presso la ceppoteca dell'unità di ispezione degli Alimenti di Origine animale, UNINA. Tutti i ceppi sono stati risospesi in diluente ad una concentrazione finale di 0,5 McFarland e successivamente sottoposti a diluizioni seriali per raggiungere una concentrazione di 150 CFU/mL. Diversi filetti da 150 g di ciascuna matrice sono stati contaminati in superficie con i rispettivi ceppi di campo di *L. monocytogenes*, per simulare una contaminazione durante il taglio. Filetti non contaminati sono stati adoperati come controlli. A seguito della contaminazione artificiale, i diversi filetti sono stati messi a contatto con i film di polipropilene funzionalizzati e conservati a 5 °C fino ad un massimo di 72 h. In accordo con le procedure ISO di riferimento (EN ISO 11290-2), l'enumerazione della *Listeria* è stata effettuata a 24, 48 e 72 h.

16. Determinazione del colore dei filetti di salmone

La valutazione del colore dei filetti di salmone è stata effettuata colometricamente utilizzando un colorimetro Konica Minolta CR 300 (Minolta, Osaka, Giappone). Il colore è stato espresso secondo il metodo CieLab in termini di Luminosità (L^*), indice del rosso (a^*) ed indice del giallo (b^*). Inoltre sono state determinate le coordinate angolari relative all'angolo di tinta h [$h_{ab} = \text{ArcTan}(b^*/a^*)$] e alla saturazione (o croma) [$C_{ab} = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$]. Le variazioni di colore totale (ΔE), dell'indice del rosso (Δa^*) e del giallo (Δb^*) sono state calcolate applicando le seguenti formule:

$$\Delta E = \sqrt{(L_1^* - L_2^*)^2 + (a_1^* - a_2^*)^2 + (b_1^* - b_2^*)^2}$$

$$\Delta a^* = a_2^* - a_1^*$$

$$\Delta b^* = b_2^* - b_1^*$$

Dove L_2^* , a_2^* e b_2^* sono i valori raccolti a giorni stabiliti durante l'intera durata dello stoccaggio e L_1^* , a_1^* e b_1^* sono i valori relativi al campione di partenza.

I valori di Δa^* e Δb^* sono stati presi in considerazione in quanto il valore di ΔE dipende dalle variazioni di luminosità (ΔL^*), dell'indice del rosso (Δa^*) e del giallo (Δb^*), che non sempre cambiano in parallelo. Le misurazioni per ciascun campione sono state effettuate in diversi punti del filetto e sono state poi riportate come media.

17. Analisi TBARS, TVB-N (Azoto basico volatile totale) e TMA (trimetilammina)

Nei tranci di salmone, lo stato di ossidazione lipidica è stato monitorato attraverso la determinazione dei livelli delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS). Tra i maggiori prodotti di degradazione ossidativa vi è la malondialdeide (MDA) [$\text{CH}_2(\text{CHO})_2$], che per questo motivo è stata utilizzata come marker rappresentativo del grado di perossidazione. L'MDA ha la capacità di legarsi chimicamente all'acido tiobarbiturico (TBA) aggiunto all'ambiente di reazione. In opportune condizioni di acidità e di temperatura, l'MDA forma un addotto cromogeno con il TBA determinabile per via spettrofotometrica. Le misurazioni sono state eseguite secondo la metodica riportata in Ambrosio *et al.* [167] ed i risultati ottenuti sono stati espressi come mg di MDA formata per Kg di campione (mg/Kg). In aggiunta, i valori di TVB-N (azoto basico volatile totale) e TMA (trimetilammina) per tutti i campioni sottoposti ad analisi

sono stati quantificati secondo il metodo di microdiffusione di Conway [168], ed i risultati ottenuti espressi come mg di azoto per 100 g di campione.

18. Analisi sensoriale

Sui filetti di salmone confezionati con i dischi di PP funzionalizzati con i peptidi antimicrobici o con i dischi di PP pre-attivati ma non funzionalizzati, sono state effettuate le analisi sensoriali, che hanno previsto il coinvolgimento di una giuria composta da 5 esperti. La qualità dei tranci di salmone è stata valutata in base a specifici parametri quali: colore, odore e aspetto generale del prodotto. Le valutazioni sensoriali sono state effettuate in condizioni controllate di umidità, luce e temperatura, ed ai giudici è stato chiesto di esprimere per ciascun parametro un giudizio di gradimento su scala Likert a 9 punti. La scala adoperata ha previsto una valutazione massima (9) per un prodotto eccellente, a seguire veramente buono (8), buono (7), discreto (6), non buono (5) acquisito come limite di accettabilità, non gradevole (4), brutto (3), molto brutto (2) ed infine con 1 viene indicato un prodotto completamente inaccettabile [169]. La distribuzione dei campioni è avvenuta in modo casuale tra i diversi membri della commissione giudicatrice.

Risultati e discussione

1. Analisi della stabilità strutturale dei peptidi e delle miscele da impiegare per la funzionalizzazione dei polimeri per le diverse tipologie di prodotto alimentare

La valutazione dell'efficienza di una molecola antimicrobica di natura peptidica passa in prima istanza dalla determinazione della sua struttura. Quest'ultima è dipendente dalla composizione amminoacidica ed influenza strettamente la sua attività biologica. Pertanto, l'esecuzione di studi volti a definire la conformazione che le molecole peptidiche assumono in soluzione è alla base della verifica della loro possibile conformazione bioattiva. Come ampiamente dimostrato, i peptidi antimicrobici sono molecole in grado di strutturarsi prevalentemente quando interagiscono con la membrana batterica, quindi, per poter determinare il modo in cui essi si riarrangiano nello spazio tridimensionale, nonché monitorare gli eventuali cambiamenti conformazionali che si verificano nel tempo, è necessario dapprima indurre il *folding*. Nelle analisi spettroscopiche, per simulare tale processo, viene usualmente aggiunto alla soluzione peptidica il Sodio Dodecil Solfato (SDS), in quanto tale composto è in grado di mimare la composizione anionica della superficie esterna delle membrane batteriche. Nella **Figura 14** è possibile osservare le significative variazioni degli spettri di un generico peptide antimicrobico in presenza di SDS.

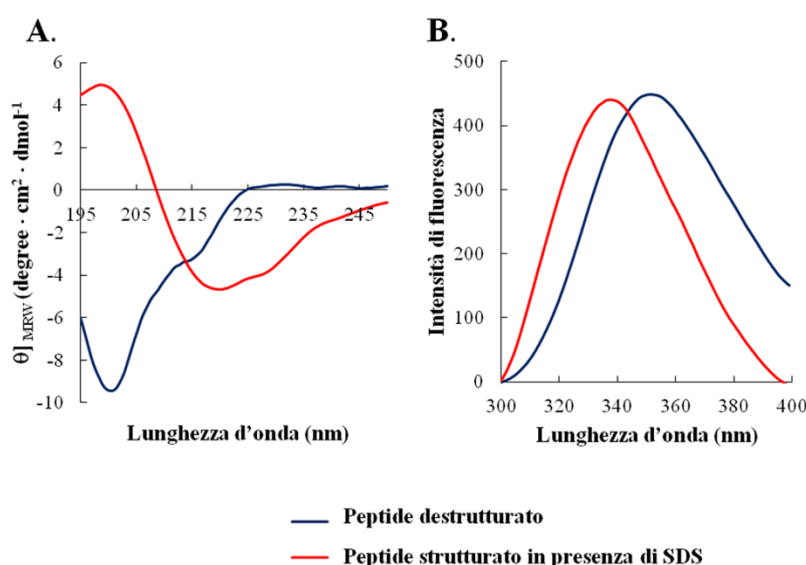


Figura 14. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) di un peptide strutturato e destrutturato

Un possibile uso di peptidi antimicrobici a livello industriale, che potrebbe implicare un loro coinvolgimento in contesti in grado di minare la loro funzione, rende necessario valutarne la stabilità conformazionale in diverse condizioni ambientali. Nello specifico, poiché la loro struttura può essere influenzata da parametri fisici quali pH, salinità e temperatura, è di fondamentale importanza la verifica degli effetti indotti dall'esposizione a queste condizioni. In questo studio, per valutare il potenziale applicativo dei peptidi 1018-K6 e MTP1, sono state condotte analisi spettroscopiche, mediante tecniche quali il dicroismo circolare (CD) e la fluorescenza, a diverse condizioni ambientali di pH e temperatura in presenza di una concentrazione pari a 3mM di SDS.

Il dicroismo circolare rappresenta una delle tecniche d'elezione per l'analisi degli elementi di struttura secondaria di peptidi in soluzione. La spettroscopia CD utilizza la luce polarizzata per la rilevazione delle proprietà ottiche delle molecole in esame. Per lo studio del *folding* delle molecole nei diversi contesti ambientali, ci si è inoltre avvalsi della spettroscopia di fluorescenza sfruttando la presenza in entrambe le sequenze di un aminoacido intrinsecamente fluorescente, il triptofano.

Per verificare gli effetti del pH su entrambe le molecole [MTP1 (**Figura 15**) e 1018-K6 (**Figura 16**)], le stesse sono state incubate ad una temperatura di 25 °C per 24h a tre diverse condizioni di pH 2.0, 7.0 e 10.0.

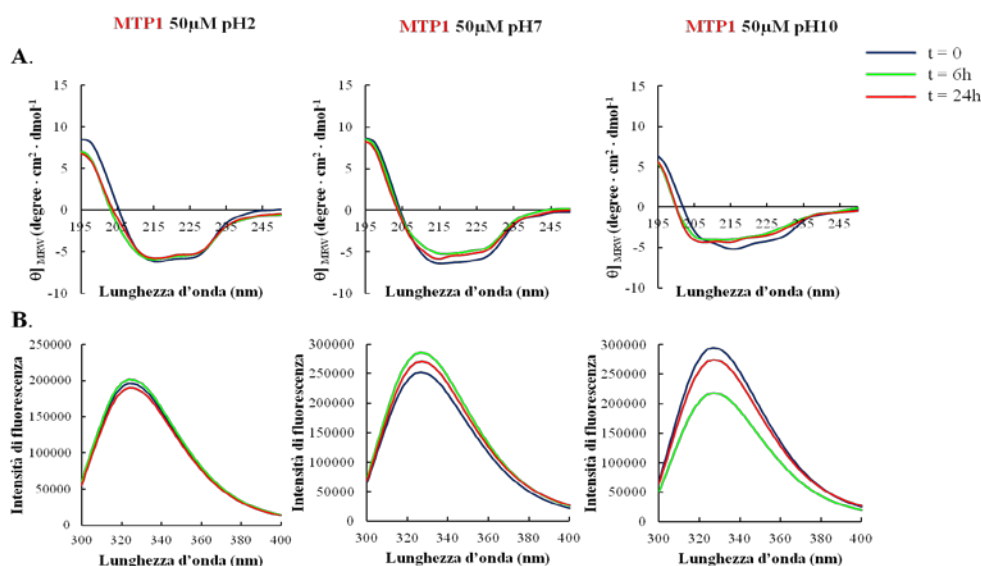


Figura 15. Effetti del pH sulla struttura del peptide MTP1. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L di peptide nei diversi buffer (10 mM glicina HCl pH 2.0, 10 mM Tris HCl pH 7.0 e 10 mM glicina NaOH pH 10.0) in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h di incubazione a 25 °C.

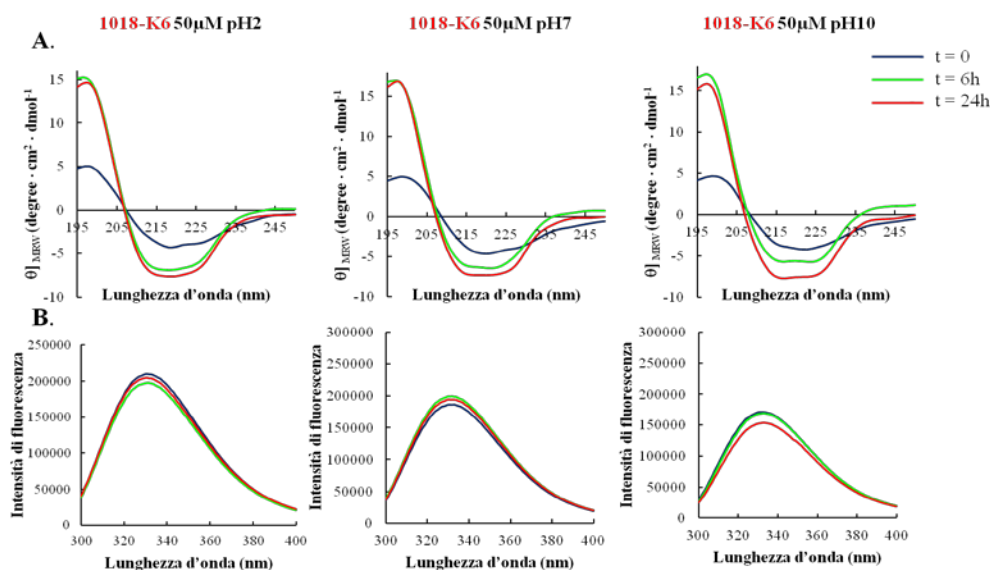


Figura 16. Effetti del pH sulla struttura del peptide 1018-K6. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L di peptide nei diversi buffer (10 mM glicina HCl pH 2.0, 10 mM Tris HCl pH 7.0 e 10 mM glicina NaOH pH 10.0) in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h di incubazione a 25 °C.

Dagli spettri dicroici riportati in **Figura 15 A** e **Figura 16 A**, è possibile notare che per entrambi i peptidi, le strutture risultanti non sono ascrivibili a quelle canoniche, non presentando i caratteristici minimi negativi dell' α -elica a 223 e 209 nm e del β -sheet a 219 nm, il che le identifica come strutture miste α -elica/ β -sheet. Malgrado ciò, è possibile osservare negli spettri di MTP1 (**Figura 15 A**) una prevalenza di elementi di struttura secondaria di tipo α -elica essendo ben evidenti i due segnali tipici dicroici, mentre in 1018-K6 (**Figura 16 A**) le due strutture risultano più equamente rappresentate. In termini di stabilità, in tutte le diverse condizioni di pH investigate, appare chiaro che almeno nel corso delle 24 h di incubazione, le conformazioni vengono conservate per entrambi i peptidi anche se 1018-K6 risulta essere maggiormente soggetto a riarrangiamenti conformazionali (**Figura 16 A**).

Le stesse indagini spettroscopiche sono state effettuate per valutare l'influenza della temperatura sulla struttura dei due AMPs e quale fosse la loro risposta ad un'esposizione estensiva a tali condizioni. Pertanto i peptidi MTP1 (**Figura 17**) e 1018-K6 (**Figura 18**) sono stati incubati per 24 h a tre diverse temperature 4, 37 e 90 °C.

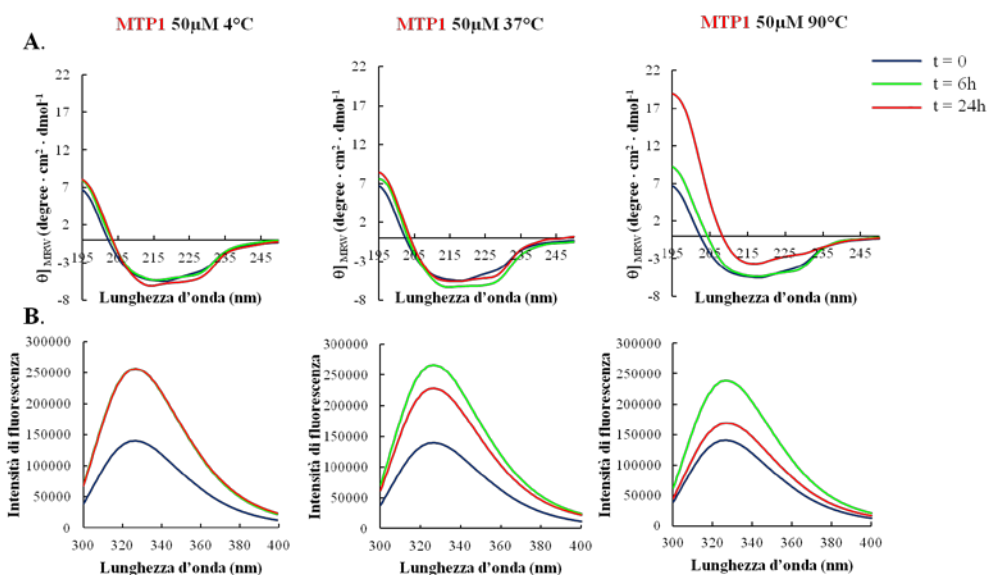


Figura 17. Effetti della temperatura sulla struttura del peptide MTP1. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L di peptide in 10 mM Tris HCl pH 7.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h di incubazione della soluzione peptidica a tre diverse temperature (4 -37 e 90 °C).

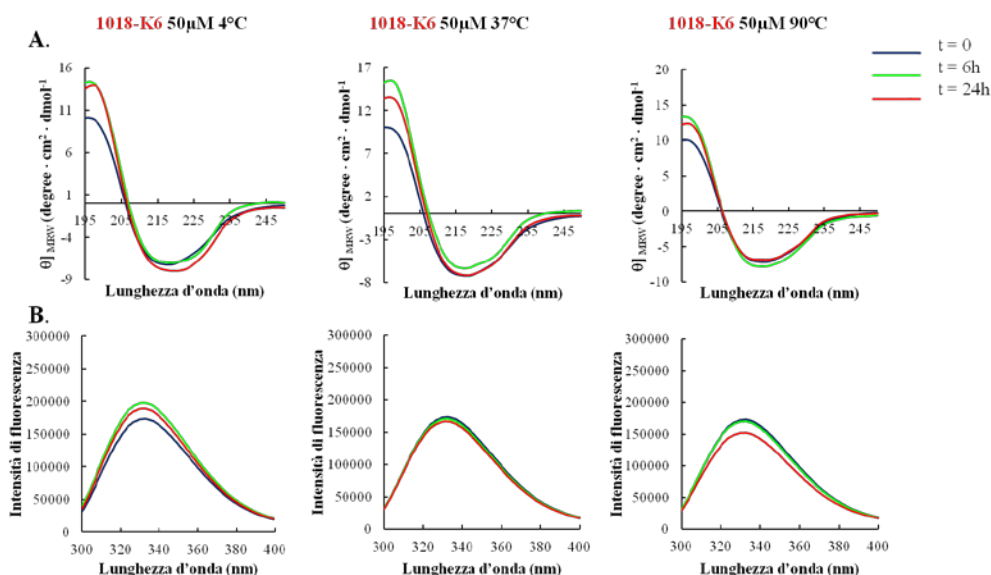


Figura 18. Effetti della temperatura sulla struttura del peptide 1018-K6. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L di peptide in 10 mM Tris HCl pH 7.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h di incubazione della soluzione peptidica a tre diverse temperature (4 -37 e 90 °C).

In merito all'effetto della temperatura, le analisi al CD (**Figura 17 A e 18 A**) mostrano una chiara incidenza sulla struttura per entrambi. A dispetto di quanto osservato per il pH, alle tre diverse temperature, 1018-K6 (**Figura 18 A**) esibisce una conformazione più marcatamente *β -sheet* come evidenziato dall'analisi degli spettri in cui si osserva un segnale negativo intorno ai 219 nm. Per il peptide MTP1 (**Figura 17 A**), a seconda della temperatura considerata, sono evidenti degli *shifts* strutturali che a 90 °C sembrano ribaltare totalmente gli equilibri a favore degli elementi di struttura secondaria di tipo *β -sheet*.

Per quanto concerne gli effetti nel tempo, è possibile notare che nel corso dell'incubazione di 24 h alle tre temperature considerate, le due molecole rivelano un'elevata stabilità conformazionale, con un'apparente perdita di elementi di struttura secondaria per il solo MTP1 a 90 °C (**Figura 17 A**).

Da uno studio preliminare, finalizzato a confermare che le sequenze progettate presentassero l'attività antimicrobica suggerita dai *software* predittivi è emerso che le due molecole mostravano una preferenza verso *target* microbici diversi. Sulla scorta di questa evidenza si è pensato di formulare una miscela dei due peptidi, che consentisse di avere in un'unica soluzione un più ampio spettro d'azione, agendo sia nei confronti di microrganismi deterioranti, che verso batteri patogeni. Di conseguenza, si è proceduto con l'identificazione di tre miscele (Mix) di AMPs, che contenessero i peptidi 1018-K6 e MTP1 in un diverso rapporto, quali la Mix1 (50% 1018-K6: 50% MTP1); la Mix2 (75% 1018-K6: 25% MTP1) ed infine la Mix3 (25% 1018-K6: 75% MTP1).

Le diverse miscele sono state incubate in tamponi ai diversi pH selezionati per i singoli peptidi e monitorate per 24 h mediante tecniche spettroscopiche di Dicroismo circolare e Fluorescenza.

I singoli spettri CD mostrati in **Figura 19 A, 20 A e 21 A**, danno indicazioni circa il contenuto totale degli elementi di struttura secondaria attribuibili ai due diversi peptidi adoperati nella miscela. Secondo quanto si osserva per ciascuna Mix, l'esposizione ai diversi pH fino ad un massimo di 24 h non comporta alcuna perdita di struttura, non essendo stato registrato alcuno spostamento dei segnali a lunghezze d'onda inferiori a 200 nm (come accade per un peptide con una struttura *unfolded*). I diversi spettri di fluorescenza riportati in **Figura 19 B, 20 B e 21 B**, in accordo con quanto osservato al dicroismo, confermano la stabilità delle diverse Mix non essendo stato evidenziato alcuno spostamento nell'intensità di emissione del triptofano caratteristico di un processo di destrutturazione.

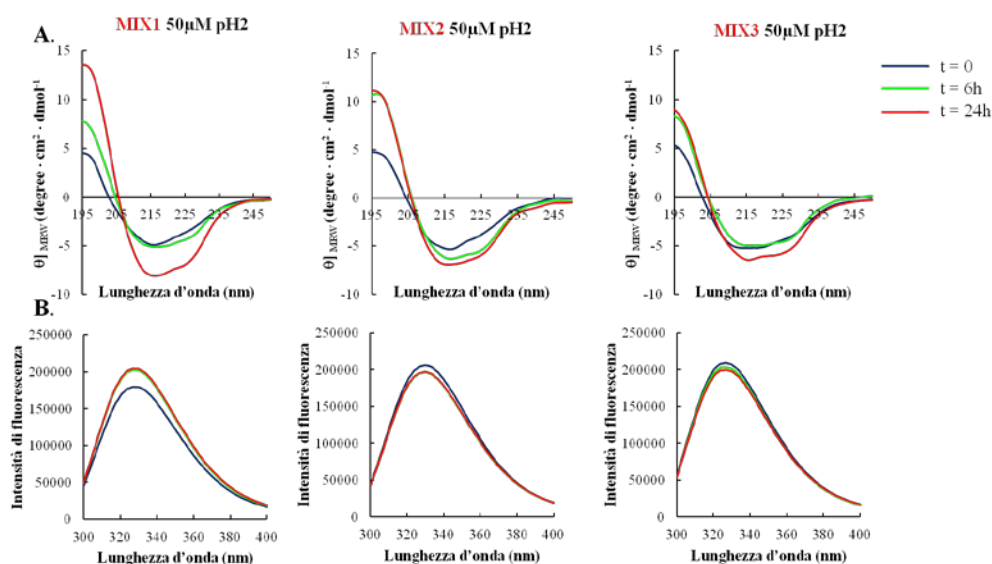


Figura 19. Effetti del pH 2.0 sulla struttura delle tre miscele [Mix1 (50% 1018-K6: 50% MTP1); la Mix2 (75% 1018-K6: 25% MTP1) ed infine la Mix3 (25% 1018-K6: 75% MTP1)]. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L delle tre miscele in 10 mM glicina HCl pH 2.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h di incubazione a 25 °C.

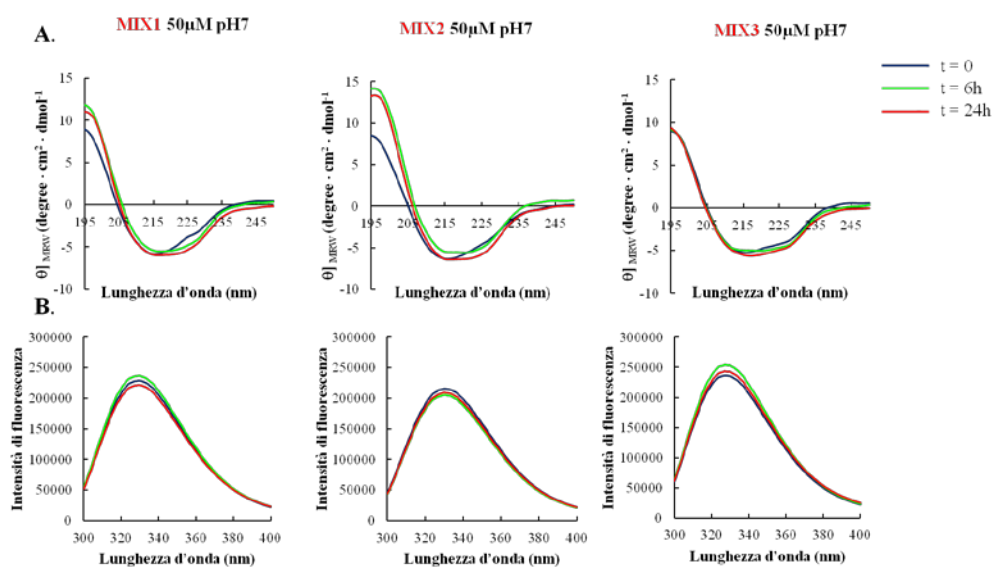


Figura 20. Effetti del pH 37.0 sulla struttura dei peptidi costituenti le tre miscele [Mix1 (50% 1018-K6: 50% MTP1); la Mix2 (75% 1018-K6: 25% MTP1) ed infine la Mix3 (25% 1018-K6: 75% MTP1)]. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L delle tre miscele in 10 mM Tris HCl pH 7.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h di incubazione a 25 °C.

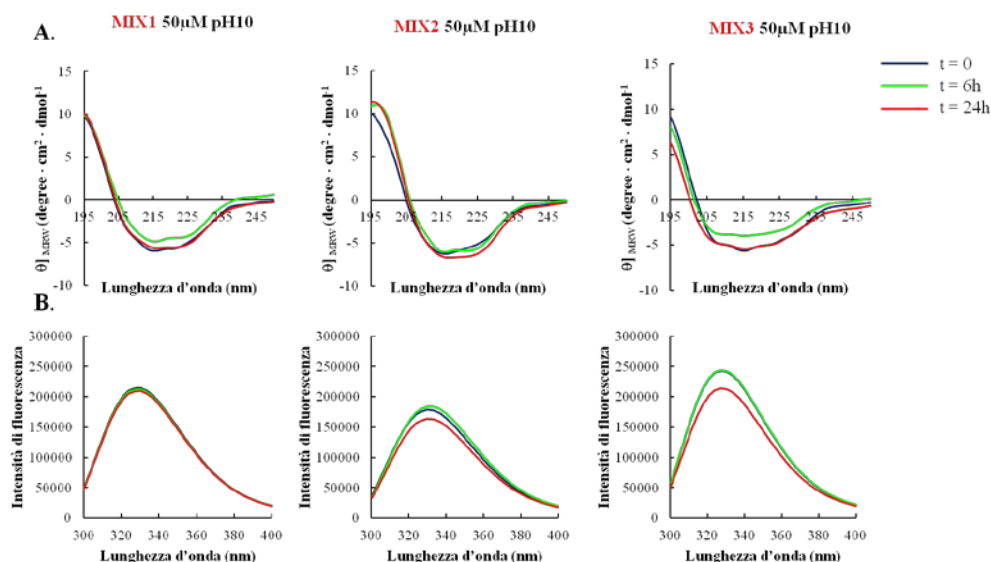


Figura 21. Effetti del pH 10.0 sulla struttura dei peptidi costituenti le tre miscele [Mix1 (50% 1018-K6; 50% MTP1); la Mix2 (75% 1018-K6; 25% MTP1) ed infine la Mix3 (25% 1018-K6; 75% MTP1)]. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L delle tre miscele in 10 mM glicina NaOH pH 10.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h di incubazione a 25 °C.

Le miscele sono state in aggiunta sottoposte alle stesse analisi spettroscopiche dopo averle tenute fino ad un massimo di 24 h a tre diverse condizioni di temperatura 4, 37 e 90 °C per verificarne la stabilità.

Per la temperatura così come per il pH, le indagini spettroscopiche a cui sono state sottoposte le tre miscele peptidiche (**Figura 22 A, 23 A e 24 A**), hanno evidenziato per tutte una buona stabilità alle diverse condizioni analizzate, che sembrano indurre esclusivamente lievi riarrangiamenti strutturali nei peptidi che le compongono nel corso delle 24 h di incubazione.

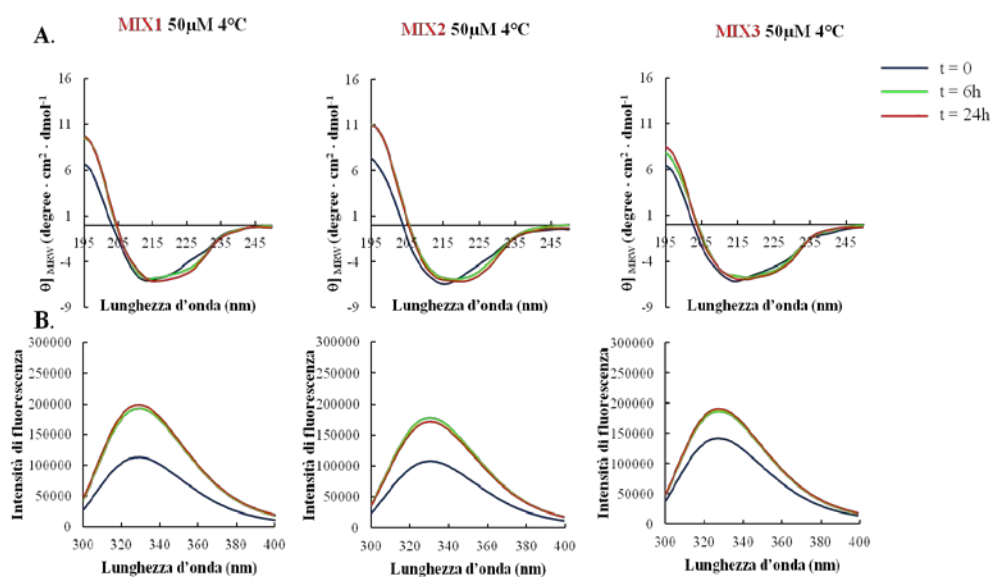


Figura 22. Effetti dell'esposizione alla temperatura di 4 °C sulla struttura dei peptidi costituenti le tre miscele [Mix1 (50% 1018-K6: 50% MTP1); la Mix2 (75% 1018-K6: 25% MTP1) ed infine la Mix3 (25% 1018-K6: 75% MTP1)]. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L delle tre miscele in 10 mM Tris HCl pH 7.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h.

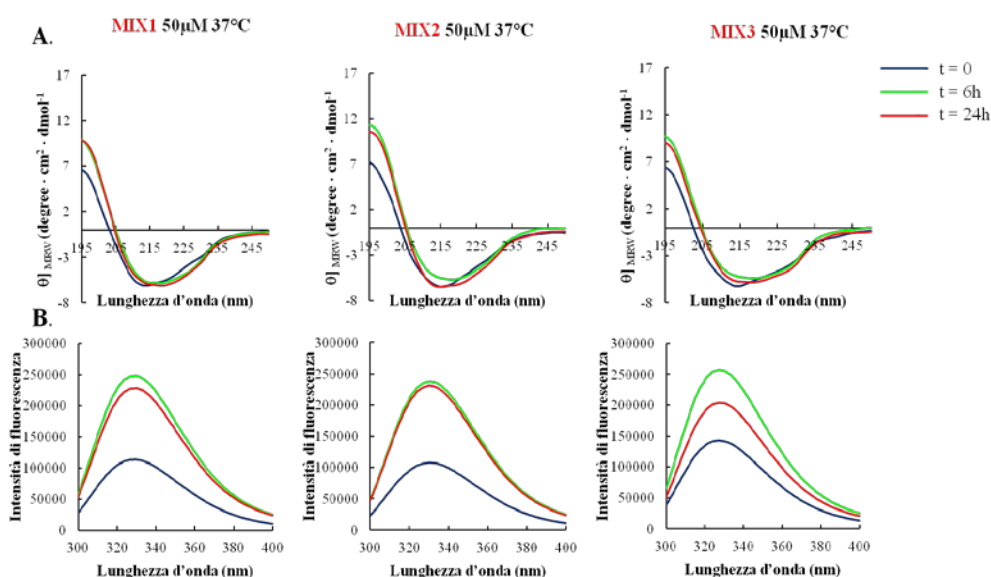


Figura 23. Effetti dell'esposizione alla temperatura di 37 °C sulla struttura dei peptidi costituenti le tre miscele [Mix1 (50% 1018-K6: 50% MTP1); la Mix2 (75% 1018-K6: 25% MTP1) ed infine la Mix3 (25% 1018-K6: 75% MTP1)]. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L delle tre miscele in 10 mM Tris HCl pH 7.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h.

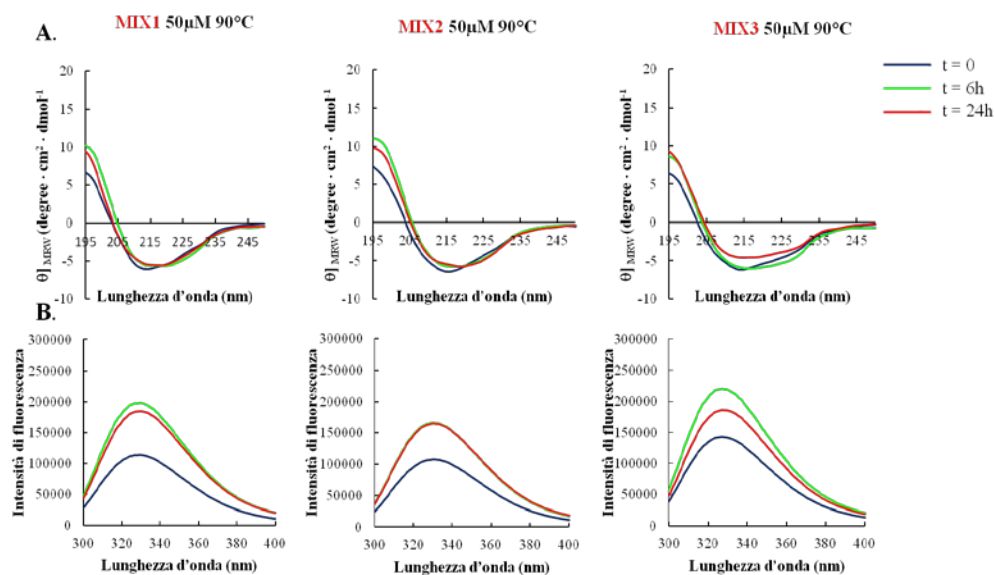


Figura 24. Effetti dell'esposizione alla temperatura di 90 °C sulla struttura dei peptidi costituenti le tre miscele [Mix1 (50% 1018-K6: 50% MTP1); la Mix2 (75% 1018-K6: 25% MTP1) ed infine la Mix3 (25% 1018-K6: 75% MTP1)]. Spettri di dicroismo circolare nel lontano UV (A) e di fluorescenza (B) ottenuti incubando 0,08 g/L delle tre miscele in 10 mM Tris HCl pH 7.0 in presenza di 3mM di SDS. Gli spettri sono stati acquisiti dopo 6 e 24 h.

Inoltre, considerando che ad oggi numerosi sono i processi alimentari che prevedono l'impiego di elevate concentrazioni saline, basti pensare alla salatura delle carni da stagionatura o ai vari procedimenti di salamoia, si è reso necessario lo studio della stabilità dei peptidi anche in presenza di sale. La sensibilità al sale delle molecole oggetto di indagine, 1018-K6 e MTP1, è stata determinata ponendoli per 24 h in una soluzione salina contenente una concentrazione di NaCl pari a 1 M ed analizzando successivamente i campioni mediante cromatografia a fase inversa eseguita su fase colonna C18 con sistema HPLC.

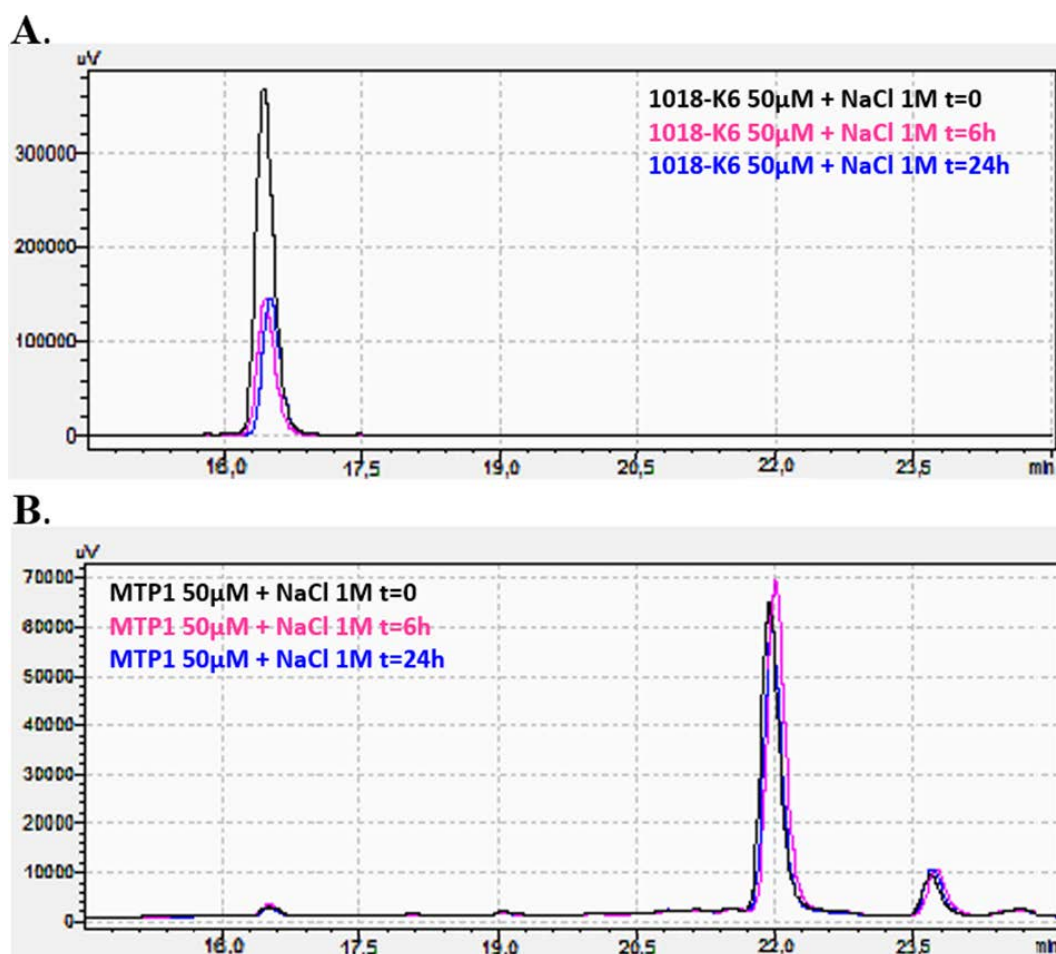


Figura 25. Stabilità in soluzione salina dei peptidi 1018-K6 (A) e MTP1 (B) determinata mediante cromatografia a fase inversa eseguita su colonna C18 con un sistema HPLC.

I due peptidi alla concentrazione finale di 50 μ M sono stati incubati in presenza di NaCl (1M) fino a 24 h alla temperatura di 25 °C. Le soluzioni peptidiche sono state recuperate a 6 e 24 h e analizzate mediante RP-HPLC. Come controllo è stata utilizzata la soluzione al tempo 0 ($t = 0$). I cromatogrammi riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Dai profili cromatografici mostrati in **Figura 25** si evince un diverso comportamento dei due peptidi in presenza di sale. Nel dettaglio, per 1018-K6 (**Figura 25 A**) appare evidente la presenza di un fenomeno di precipitazione nelle prime 6 h di incubazione, con una perdita di concentrazione del peptide in soluzione che ammonta a circa il 60% rispetto al tempo 0, restando poi invariata fino a 24 h. Per quanto riguarda MTP1, si è osservata al contrario un'estrema stabilità in tali condizioni non essendo stata evidenziata alcuna variazione nella sua concentrazione in tutto il periodo di incubazione considerato (**Figura 25 B**).

A seguire, le tre miscele sono state poste nelle stesse condizioni adoperate per i singoli peptidi ed analizzate tramite RP-HPLC.

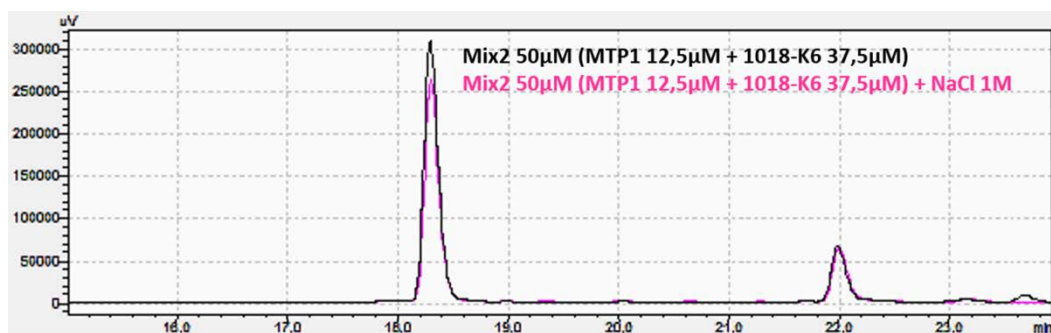


Figura 26. Stabilità in soluzione salina della miscela Mix2 determinata mediante cromatografia a fase inversa eseguita su colonna C18 con un sistema HPLC. La soluzione peptidica avente una concentrazione finale di 50 μ M è stata incubata in presenza di NaCl (1 M) (linea rosa). Come controllo è stata utilizzata la soluzione peptidica in assenza di sale (linea nera).

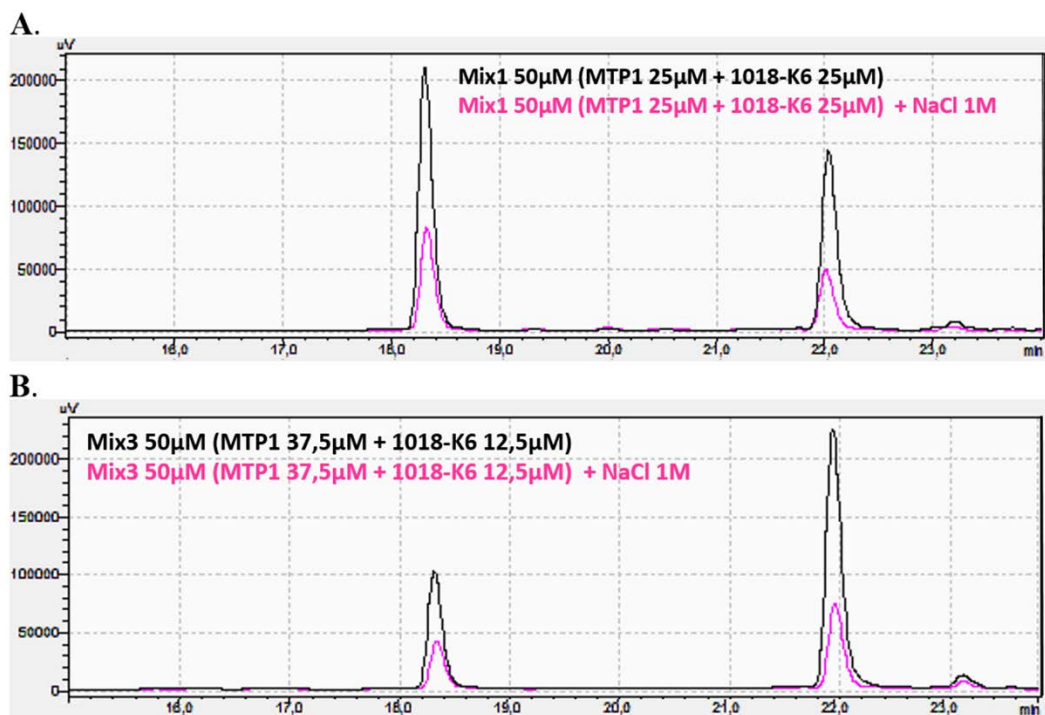


Figura 27. Stabilità in soluzione salina delle miscele Mix1 (A) e Mix3 (B) determinata mediante cromatografia a fase inversa eseguita su colonna C18 con un sistema HPLC. Le soluzioni peptidiche aventi una concentrazione finale di 50 μ M sono state incubate in presenza di NaCl (1 M) (linea rosa). Come controllo è stata utilizzata la soluzione peptidica in assenza di sale (linea nera).

Delle tre diverse miscele solo la Mix2 costituita da un eccesso del peptide 1018-K6 (**Figura 26**) ha mostrato una buona resistenza quando posta in presenza del sale, di contro per la Mix1 (**Figura 27 A**) si è osservata una riduzione della concentrazione del 62% per 1018-K6 e del 68% per MTP1, mentre nella Mix3 (**Figura 27 B**) del 60% per 1018-K6 e per il 68% per MTP1.

Alla luce dei risultati ottenuti si è deciso di selezionare la Mix2 per proseguire le indagini di resistenza al sale a diversi tempi di incubazione fino ad un massimo di 24 h (**Figura 28**), dimostrando che nella miscela dopo 6 e 24 h di incubazione in NaCl 1 M si ottiene una riduzione di concentrazione del 47,5% per 1018-K6 e del 37% per MTP1.

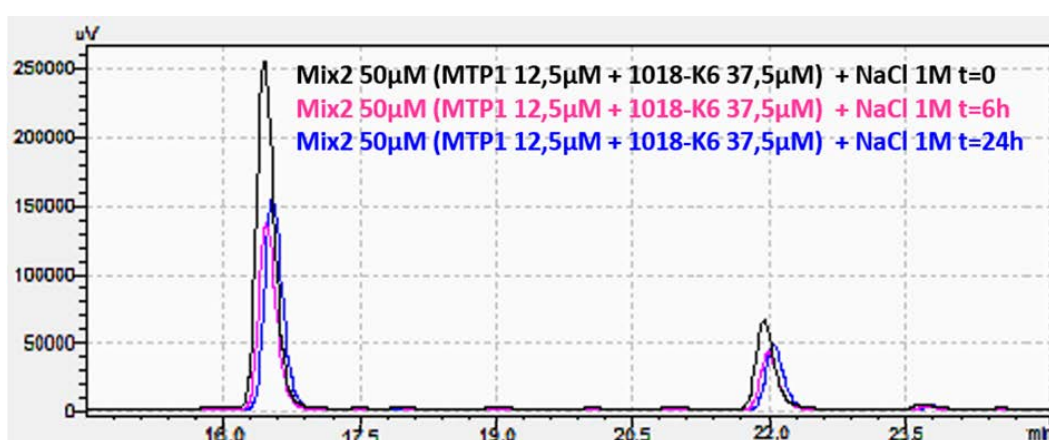


Figura 28. Stabilità in soluzione salina della miscela Mix2 determinata mediante cromatografia a fase inversa eseguita su colonna C18 con un sistema HPLC.

La soluzione peptidica avente una concentrazione finale di 50 μ M è stata incubata in presenza di NaCl (1M) fino a 24 h alla temperatura di 25 °C. Le soluzioni peptidiche sono state recuperate a 6 e 24 h e analizzate mediante RP-HPLC. Come controllo è stata utilizzata la soluzione al tempo 0 (t = 0). I cromatogrammi riportati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

Da queste analisi è stato possibile verificare che la molecola che meglio si presta ad una esposizione a concentrazioni saline paragonabili a quelle adoperate per la conservazione di alimenti quali ad esempio il liquido di governo delle mozzarelle è MTP1. Un ulteriore dato che è emerso dal confronto del comportamento dei singoli peptidi rispetto a quello nella Mix2 è che in miscela il peptide MTP1 sembra esercitare un'azione stabilizzante sulla molecola 1018-K6 nel corso delle 24 h di incubazione in presenza di sale.

2. Analisi di attività antimicrobica dei peptidi singoli e in miscela

L'uso indiscriminato degli antibiotici negli allevamenti, per la cura o prevenzione dell'insorgenza di patologie negli animali, sta alimentando in modo preoccupante il fenomeno dell'antibiotico-resistenza. Uno dei casi più noti di batteri multiresistenti è *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA), che è causa di un ingente numero di decessi in tutto il mondo ogni anno. Considerando l'alto rischio rappresentato da tale batterio per la salute umana, si è deciso di valutare l'efficacia antimicrobica dei peptidi 1018-K6 e MTP1 verso un ceppo di *Staphylococcus aureus* MRSA isolato da carne di suino (*S. aureus* MRSA M7). Le indagini microbiologiche sono state condotte anche su altri ceppi di campo quali: *Listeria monocytogenes* 92 isolato da carne bovina, *Staphylococcus aureus* SA 4 isolato da un prodotto lattiero-caseario (Svizzera) e su lieviti. Dopo aver appurato l'elevata stabilità strutturale e conformazionale delle due molecole peptidiche nella maggior parte delle condizioni esplorate si è proceduto con la verifica dell'attività antimicrobica. Le analisi sono state effettuate seguendo il metodo della micro-diluizione in brodo (CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute) al fine di valutare la concentrazione minima battericida (MBC) delle molecole testate. La sperimentazione, condotta seguendo i protocolli standard, ha consentito di stabilire la capacità di contrastare la crescita di microrganismi alteranti e/o batteri patogeni in risposta a tre diverse concentrazioni dell'agente antimicrobico (2,5; 12,5 e 37,5 µM). I dati ottenuti dall'enumerazione delle piastre sono stati elaborati utilizzando GraphPad Prism versione 6.00 (Graph-Pad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

Le indagini microbiologiche effettuate (**Figura 29**) hanno dimostrato in maniera chiara che i due peptidi presentano un'efficacia differente a seconda del *target* microbico. Il peptide 1018-K6 sembra maggiormente attivo verso i batteri, mentre MTP1 predilige microrganismi strutturalmente diversi quali i lieviti. Nel dettaglio, come è possibile verificare nel grafico riportato in **Figura 29 A**, mentre MTP1 risulta essere completamente inefficace verso *L. monocytogenes* a tutte le concentrazioni testate, 1018-K6 è in grado di inibirne la crescita del 100% già alla concentrazione di 12,5 µM. Nei confronti di *S. aureus* SA 4 (**Figura 29 B**) è possibile osservare una minima attività per MTP1, essendo in grado di inibirne la crescita del 5% esclusivamente alla massima concentrazione testata, mentre 1018-K6 è risultato attivo già alla concentrazione di 2,5 µM riducendo del 70% la crescita batterica che viene poi inibita del 100% alla

concentrazione di 37,5 μM . In **Figura 29 C**, è riportato l'unico caso in cui MTP1 sembra essere più efficace verso batteri con un effetto di inibizione della crescita di *S. aureus* MRSA M7 pari al 20% alla massima concentrazione adoperata, in contrasto con il peptide 1018-K6 che ha mostrato una maggiore efficienza essendo in grado di inibire del 100% la crescita batterica già a 12,5 μM . Nei confronti dei lieviti alla concentrazione più alta tra quelle testate, MTP1 ha evidenziato un'inibizione della crescita del 18% mentre il peptide 1018-K6 del 12% (**Figura 29 D**).

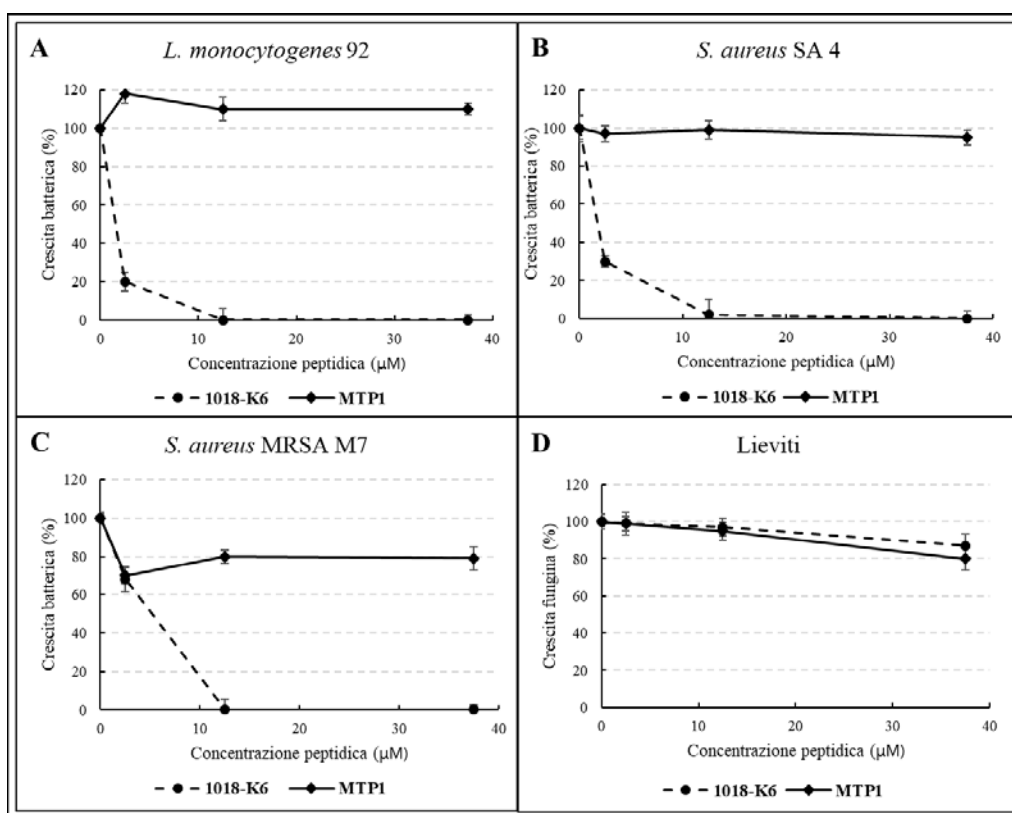


Figura 29. Attività antimicrobica dei peptidi 1018-K6 (linea tratteggiata) e MTP1 (linea continua) verso i microrganismi selezionati: *L. monocytogenes* 92 (A), *S. aureus* SA 4 (B), *S. aureus* MRSA M7 (C) e lieviti (D) come percentuale di crescita cellulare rispetto ai controlli. I dati di conta cellulare sono stati elaborati utilizzando GraphPad Prism versione 6.00 e sono presentati come media della deviazione standard (sd) di tre esperimenti separati eseguiti in triplicato.

Sulla base dei dati di stabilità strutturale raccolti per le miscele, sembra chiaro che l'unica risultata stabile a tutte le diverse condizioni prese in esame sia la Mix2. Malgrado ciò, si è scelto di sottoporre alle analisi di attività antimicrobica anche la Mix3, nell'ottica di selezionare la migliore combinazione che potesse garantire un più ampio spettro d'azione.

Le due Mix sono state analizzate a tre diverse concentrazioni (10; 20 e 50 μM) (**Figura 30**) verso i medesimi microrganismi utilizzati nello studio dei singoli peptidi.

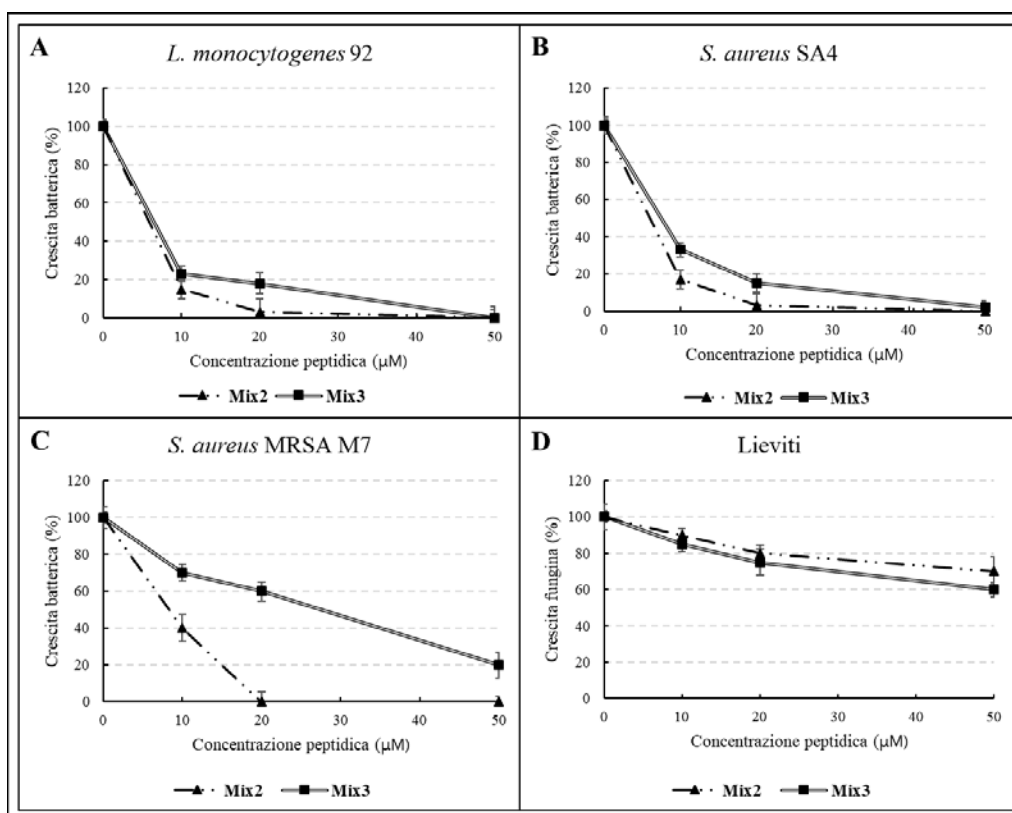


Figura 30. Attività antimicrobica delle miscele: Mix2 (linea tratteggiata) e Mix3 (linea doppia) verso i microrganismi selezionati: *L. monocytogenes* 92 (A), *S. aureus* SA 4 (B), *S. aureus* MRSA M7 (C) e lieviti (D) espressa come percentuale di crescita cellulare rispetto ai controlli. I dati di conta cellulare sono stati elaborati utilizzando GraphPad Prism versione 6.00 e sono presentati come media della deviazione standard (sd) di tre esperimenti separati eseguiti in triplicato.

I risultati conseguiti hanno evidenziato un'attività antimicrobica soddisfacente per entrambe le miscele peptidiche proposte, sia verso batteri patogeni che microrganismi alteranti quali i lieviti. Dai grafici riportati in **Figura 30** è possibile osservare come le due miscele risentano della presenza in eccesso dell'uno o dell'altro peptide se confrontati con gli andamenti dei grafici in **Figura 29**. In linea con quanto dedotto con gli studi di stabilità, anche in termini di attività antimicrobica la Mix2 sembra essere la migliore in quanto è stato registrato un discreto abbattimento della carica microbica (batteri e lieviti) già alla concentrazione di 10 μM .

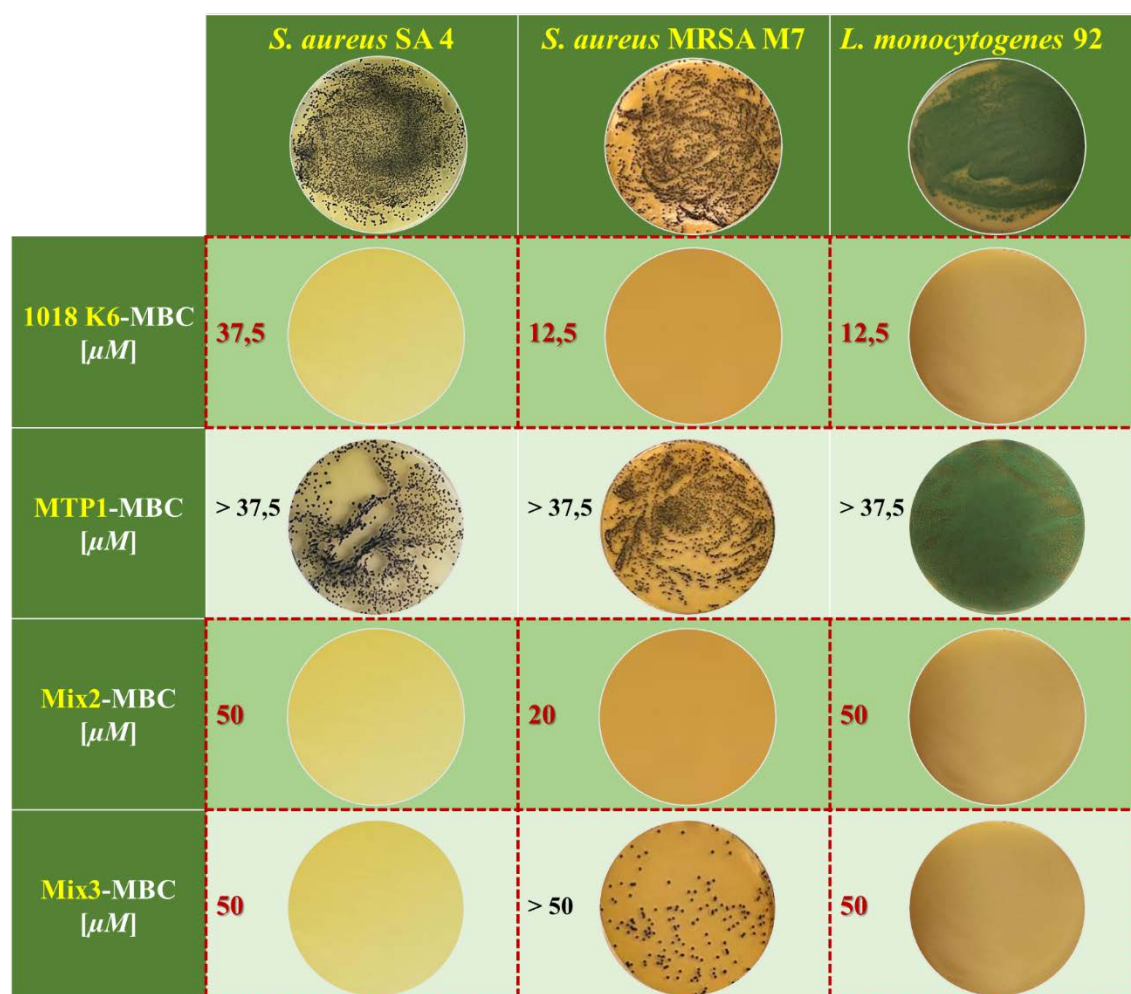


Figura 31. Valori di MBC dei peptidi 1018-K6, MTP1 e delle due miscele selezionate (Mix2 e Mix3) verso tre diversi ceppi di batteri Gram positivi quali: *L. monocytogenes* 92, *S. aureus* SA 4 e *S. aureus* MRSA M7.

Inoltre, sia per le molecole singole che per le due miscele peptidiche selezionate è stata valutata l'attività battericida sui suddetti batteri patogeni mediante la determinazione della concentrazione minima battericida (MBC), definita come la più bassa concentrazione di peptide capace di uccidere più del 99,9% dei batteri. Come riportato in **Figura 31**, i valori di MBC misurati per MTP1 sono risultati essere > 37,5 μ M su tutti i batteri patogeni considerati. Al contrario, il peptide 1018-K6 ha rivelato una pari efficacia battericida nei confronti di *S. aureus* MRSA M7 e *Listeria monocytogenes* 92 con valori di MBC di 12,5 μ M, mentre si è osservata una minore attività (37,5 μ M) su *S. aureus* SA 4. Riguardo le due miscele, esse hanno mostrato una MBC simile contro *S. aureus* SA 4 e *Listeria monocytogenes* (50 μ M), mentre la Mix2 è risultata essere la più potente nei confronti di *S. aureus* MRSA M7 con una MBC di 20 μ M.

3. Analisi dell'attività antibiofilm dei peptidi singoli e in miscela

I due batteri patogeni isolati da prodotti carnei, *L. monocytogenes* 92 e *S. aureus* MRSA M7, sono noti anche per la capacità di produrre biofilm, pertanto i peptidi 1018-K6 e MTP1 sono stati investigati valutando la percentuale di biofilm batterico formato mediante colorazione con Crystal Violet (**Figura 32**).

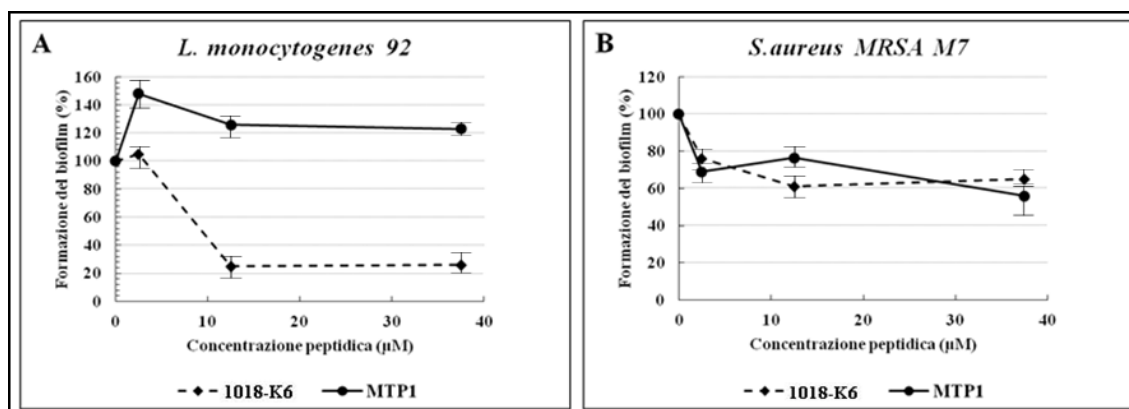


Figura 32. Attività antibiofilm dei peptidi 1018-K6 (linea tratteggiata) e MTP1 (linea continua) verso *L. monocytogenes* 92 (A), *S. aureus* MRSA M7 (B) espressa come percentuale di crescita cellulare rispetto ai controlli. I dati di assorbanza a 630 nm sono stati elaborati utilizzando GraphPad Prism versione 6.00 e sono presentati come media della deviazione standard (sd) di tre esperimenti separati eseguiti in triplicato

Ancora una volta il comportamento dei due peptidi sembra essere nettamente differente, infatti in **Figura 32 A** è evidente l'effetto del peptide 1018-K6 che risulta in grado di inibire del 70% la formazione del biofilm di *L. monocytogenes* 92 già ad una concentrazione di 12,5 μM, mentre MTP1 appare del tutto inattivo alle diverse concentrazioni impiegate. Solo nei confronti di *S. aureus* MRSA M7 (**Figura 32 B**) entrambi i peptidi evidenziano un'efficacia simile nel contrastare la formazione del biofilm con un abbattimento del 40% alla massima concentrazione testata. Come per i peptidi 1018-K6 e MTP1, le due Mix sono state saggiate per determinare quali fossero gli effetti sulla formazione del biofilm di *L. monocytogenes* 92 e *S. aureus* MRSA M7.

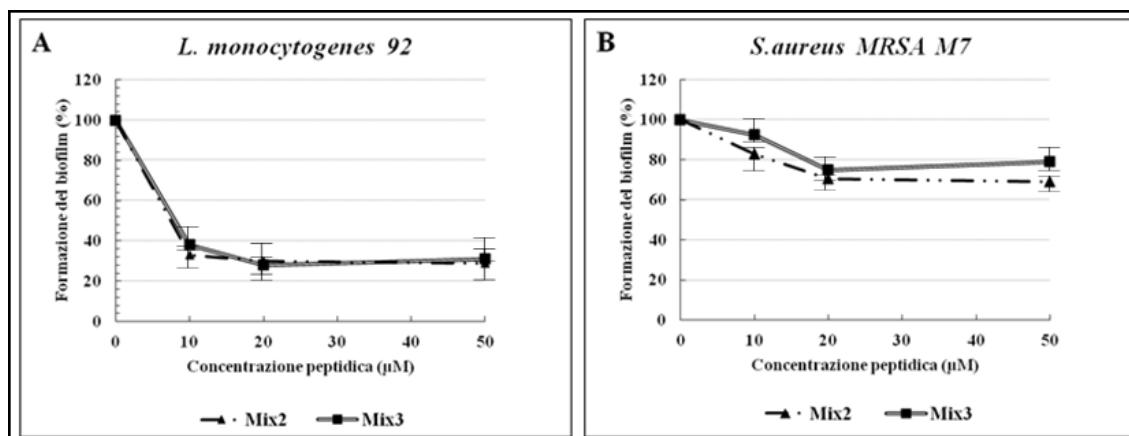


Figura 33. Attività antibiofilm delle miscele: Mix2 (linea tratteggiata) e Mix3 (linea doppia) verso *L. monocytogenes* 92 (A), *S. aureus* MRSA M7 (B) espressa come percentuale di crescita cellulare rispetto ai controlli. I dati di assorbanza a 630 nm sono stati elaborati utilizzando GraphPad Prism versione 6.00 e sono presentati come media della deviazione standard (sd) di tre esperimenti separati eseguiti in triplicato.

Come si può osservare nel grafico riportato in **Figura 33 A** ambedue le miscele (Mix2 e Mix3) hanno mostrato un effetto inibitorio del 70% già ad una concentrazione di 10 μM sulla formazione del biofilm di *L. monocytogenes* 92. L'aspetto più interessante riguarda la Mix3, composta per il 75% dal peptide MTP1, che risulta in grado di contrastare la formazione del biofilm prodotto da *L. monocytogenes* di circa il 70% già ad una concentrazione di 10 μM, laddove il peptide singolo MTP1 appariva del tutto inefficace anche alla massima concentrazione testata (37,5 μM) (**Figura 32 A**). Risultati diversi sono stati ottenuti nei confronti del secondo patogeno testato (*S. aureus* MRSA M7), per il quale i valori di inibizione della formazione del biofilm registrati per le due miscele si discostano di poco come riportato in **Figura 33 B**, risultando la Mix2 lievemente più efficace, raggiungendo alla massima concentrazione testata (50 μM) un'inibizione di circa il 32% rispetto a Mix3 per la quale l'inibizione appare pari al 21,8%.

4. Saggi di tossicità dei peptidi e delle miscele su sistemi cellulari specifici

La proposta di molecole ad attività antimicrobica come possibili preservanti alimentari, richiede in modo imprescindibile la verifica della loro innocuità nei confronti di cellule umane. Pertanto, è necessario che esse vengano sottoposte ad opportune analisi che consentano di dimostrare la totale mancanza di citotossicità alle condizioni d'uso. A tal proposito, in questo studio sono stati condotti degli esperimenti finalizzati alla valutazione degli effetti dei peptidi 1018-K6 e MTP1 a differenti concentrazioni (0; 0,5; 1; 5; 10; 20; 40 e 50 μM) sulla proliferazione e la morfologia di diverse linee cellulari umane. In particolare, sono state utilizzate linee cellulari umane ATCC, di fibroblasti polmonari embrionali (WI38) e fetali (TIG-3-20) e due linee di adenocarcinoma, rispettivamente di colon-rettale umano (Caco-2) e di pancreas (BxPC-3) (**Figura 34**).

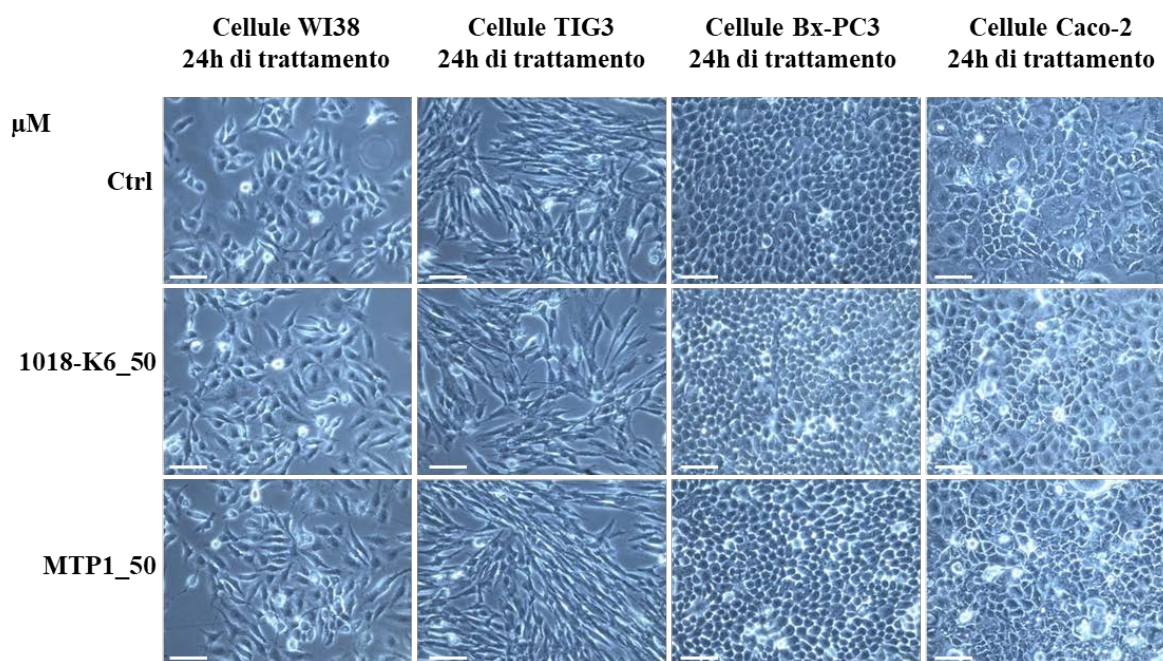


Figura 34. Immagini in contrasto di fase di quattro diverse linee cellulari umane fibroblasti polmonari embrionali (WI38) e fetali (TIG3) e di adenocarcinoma di pancreas (Bx-PC-3) e colon-rettale (Caco-2) trattate con i peptidi 1018-K6 e MTP1. Le diverse linee cellulari sono state incubate a 37 °C per 24 h in assenza (CTRL) o in presenza di 1018-K6 e MTP1 alla massima concentrazione testata (50 μM). Le immagini al microscopio sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. La barra è uguale a 100 μm .

A seguito del trattamento di 24 h, le cellule sono state fotografate attraverso l'uso di un microscopio ottico a contrasto di fase per valutare se ci fossero state delle modifiche

rispetto alle cellule controllo. Dai risultati mostrati in **Figura 34** si evince che tutte le diverse linee cellulari incubate per 24 h con i due AMPs (per semplicità il dato è relativo alla massima concentrazione testata ovvero 50 μ M) non mostrano alterazioni morfologiche rispetto alle cellule non trattate.

Dopo aver verificato la mancanza di anomalie morfologiche delle cellule esposte all'azione dei singoli peptidi, la stessa sperimentazione è stata effettuata per le due miscele selezionate (Mix2 e Mix3) ad un'unica concentrazione pari a 50 μ M (**Figura 35**).

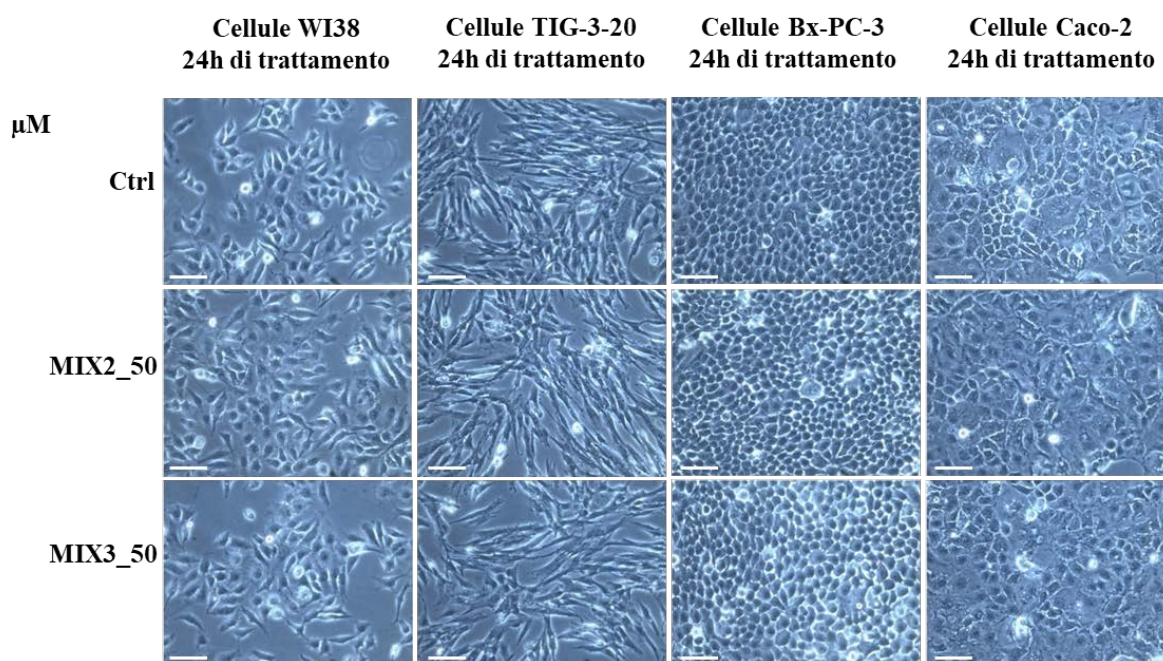


Figura 35. Immagini in contrasto di fase di quattro diverse linee cellulari umane fibroblasti polmonari embrionali (WI38) e fetali (TIG3) e di adenocarcinoma di pancreas (Bx-PC-3) e colon-rettale (Caco-2) trattate con le due miscele selezionate (Mix2 e Mix3). Le diverse linee cellulari sono state incubate a 37 °C per 24 h in assenza (CTRL) o in presenza le miscele (Mix2 e Mix3) alla concentrazione di 50 μ M. Le immagini al microscopio sono rappresentative di tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. La barra è uguale a 100 μ m.

Le immagini riportate in **Figura 35**, dimostrano chiaramente che, anche per le miscele peptidiche selezionate, il trattamento di 24 h con una concentrazione pari a 50 μ M, non determina alcuna alterazione strutturale delle linee cellulari umane testate.

Oltre alle prove di citotossicità in microscopia, sono stati condotti esperimenti di vitalità cellulare con l'ausilio del CELL COUNTING kit-8. Per la quantificazione delle cellule vitali, il kit utilizza una soluzione contenente un sale idrosolubile di tetrazolio che solo

in presenza di cellule vive, per mezzo delle deidrogenasi cellulari, viene ridotto in formazano, sviluppando una colorazione gialla, che viene misurata spettrofotometricamente a 450 nm. I valori riportati in **Tabella 1** indicano l'assenza di differenze significative fra le colture cellulari cresciute in assenza o in presenza dei peptidi 1018-K6 e MTP1 e delle due miscele investigate, confermando quanto già osservato mediante microscopia e cioè l'assenza di citotossicità in tutte le condizioni analizzate.

% cellule vitali				
	WI38	TIG3	Caco-2	BXPC-3
NT	100	100	100	100
1018-K6 50 μ M	93	102	112	98
MTP1 50 μ M	115	108	192	96
MIX2 50 μ M	98	88	109	93
MIX3 50 μ M	113	98	94	98

Tabella 1: Analisi della vitalità di diverse linee cellulari umane mediante l'uso del Cell Counting Kit. I valori riportati si riferiscono alle OD lette a 450 nm dei campioni cellulari dopo il trattamento per 24 h con le soluzioni peptidiche (singole ed in miscela) sottratti dei rispettivi controlli [cellule incubate in assenza peptide (NT)] ed espresse come valore percentuale. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti eseguiti in triplicato.

I risultati ottenuti dimostrano chiaramente, che la capacità delle molecole singolarmente e in miscela di contrastare la proliferazione batterica non corrisponde ad un altrettanto effetto nocivo nei confronti di linee cellulari umane. Ciò conferma quanto atteso, in virtù della rilevante differenza chimica e strutturale esistente tra la membrana di cellule procariotiche ed eucariotiche. Nello specifico, la membrana nei batteri è costituita da un *bilayer* lipidico carico negativamente, al contrario di quella presente negli organismi eucariotici che risulta strutturalmente diversa e elettricamente neutra. Tale sperimentazione ha suggerito una buona biocompatibilità delle molecole antimicrobiche alle concentrazioni testate, presentandole come ottimi candidati per applicazioni biotecnologiche nel settore dell'industria alimentare.

5. Attivazione e immobilizzazione dei singoli peptidi e loro miscele su polimeri di polipropilene attraverso la tecnologia Openair-Plasma®

Il *food packaging* è un settore in continua evoluzione in seguito alla crescente richiesta di un imballaggio che sia in grado di migliorare la sicurezza degli alimenti oltre che di prolungarne la *shelf life*. Uno dei polimeri plastici più ampiamente adoperati nel settore alimentare è il polipropilene (PP) che, in virtù della bassa densità che lo contraddistingue appare molto più leggero degli altri film, caratteristica che si traduce, tra l'altro, in un più basso costo a metro quadrato (o a confezione). Negli ultimi anni, una delle tecniche più promettenti che consente di modificare la superficie di polimeri plastici è il trattamento al plasma. Questa tecnologia è in grado di generare sulla superficie del materiale trattato dei gruppi funzionali (-OH e -COOH) chimicamente reattivi, i quali possono rappresentare dei siti di interazione e di ancoraggio per i gruppi amminici delle biomolecole adoperate nei processi di funzionalizzazione. In questo studio ci si è avvalsi di una particolare tipologia di trattamento al plasma, l'Openair-Plasma® che, a differenza della tecnologia a plasma a bassa pressione, offre il vantaggio di non rendere necessario un sistema a camere separato. Al fine di ottenere un polimero plastico legante le molecole antimicrobiche selezionate e strutturalmente caratterizzate, dischi di PP del diametro di 5 cm sono stati sottoposti a trattamento al plasma atmosferico. Nello specifico, l'attivazione al plasma è stata ottenuta impiegando l'aria come gas di trattamento che è stata scaricata sulla superficie del film plastico con una potenza di 440 Watt ad una velocità di 10 mm/sec, mantenendo l'ugello circolare ad una distanza di 3 cm dal disco di PP. L'effettiva modifica della superficie polimerica in termini di tensione superficiale post-trattamento è stata verificata per mezzo di particolari inchiostri, forniti dalla stessa casa produttrice dello strumento (Plasmatreat). Pertanto, a seguito della procedura di attivazione, per appurare la mutata bagnabilità della superficie e per poter stimare di quanto sia variata, sono stati stesi sulla plastica trattata e su quella non trattata, usata come controllo, due liquidi caratterizzati da una diversa tensione superficiale (48 mN/m e 72 mN/m). Tale metodica prevede che, se a seguito della pennellata sulla superficie, i margini dell'inchiostro restano intatti per 2 secondi, la tensione superficiale del materiale è pari a quella dell'inchiostro. Come mostrato in **Figura 36**, a differenza del polimero controllo, su quello trattato con sistema Openair-Plasma®, il liquido avente un più elevato valore di tensione

superficiale (72 mN/m) si distende completamente per un tempo pari a due secondi confermando l'incremento del potere idrofilico della superficie.

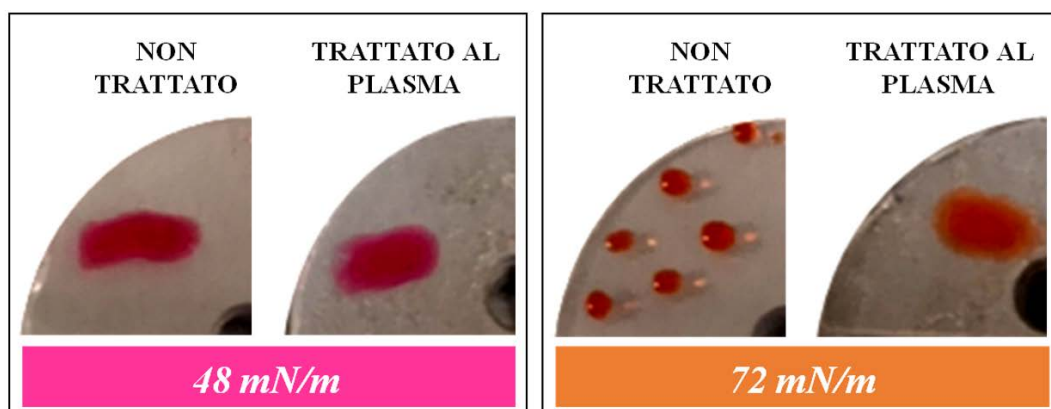


Figura 36. Confronto della bagnabilità superficiale tramite applicazione degli inchiostri Plasmatrete (48 e 72 mN/m) su superficie di polipropilene trattata e non con la tecnologia l'Openair-Plasma®

Successivamente, i dischi pretrattati al plasma sono stati immersi nelle soluzioni peptidiche composte sia degli AMPs singoli (1018-K6 e MTP1) che dalla loro miscela (Mix2). Per poter verificare l'effettiva presenza del peptide sulle superfici trattate, nonché ottenere informazioni circa la distribuzione superficiale, i dischi di polipropilene funzionalizzati e i dischi controllo, non leganti quindi l'agente antimicrobico, sono stati analizzati mediante stereomicroscopia di superficie e microscopia confocale in fluorescenza. Nel primo caso, l'ausilio dello stereomicroscopio ha permesso di raccogliere informazioni circa le proprietà meccaniche e strutturali di superficie del polimero, sfruttando la luce riflessa dal campione. Come è possibile osservare dalle immagini riportate in **Figura 37 A** e **37 B**, le due tipologie di campioni polimerici presentano notevoli differenze in termini di "rugosità" evidenziate dalle numerose rigature e solchi, del materiale in esame. In particolare, la presenza del peptide non solo determina una chiara riduzione della rugosità del film plastico, ma modifica anche la rifrazione della luce rispetto al polimero attivato ma non funzionalizzato, confermando ulteriormente il completo 'coverage' delle superfici polimeriche dopo la reazione di coniugazione. Nel secondo caso, l'impiego dei peptidi di interesse marcati con fluorofori, nello specifico si tratta di una molecola di fluorescina isotiocianato (FITC) che quando eccitata tra i 490 – 495 nm mostra un segnale di fluorescenza giallo-verde, ha consentito l'ottenimento mediante microscopia confocale di immagini della

superficie del polimero ad alta risoluzione. In **Figura 37 D**, il segnale verde omogeneamente distribuito sull'intera superficie è ascrivibile alla presenza del peptide legato, condizione completamente assente nei dischi controllo (**Figura 37 C**).

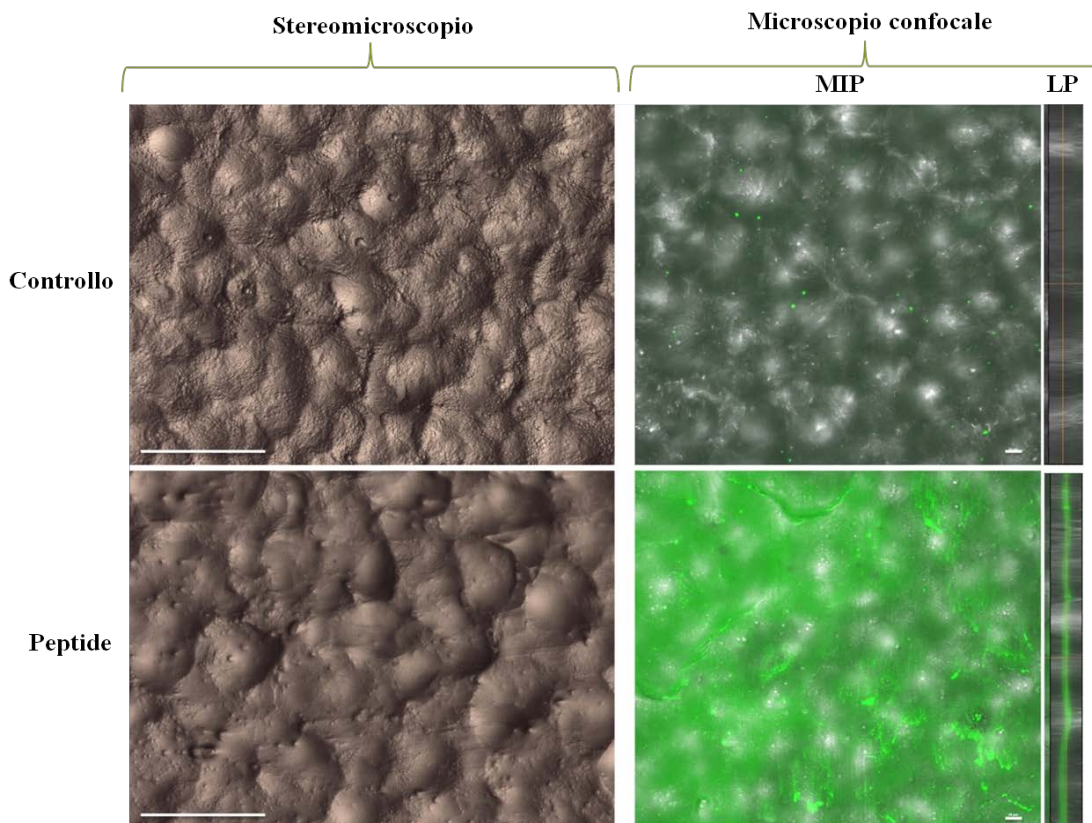


Figura 37: Analisi di superficie dei PP-AMPs mediante tecniche microscopiche. A sinistra sono riportate le immagini ottenute allo stereomicroscopio dei dischi in assenza (A) e presenza (B) del peptide dopo la procedura di immobilizzazione, mentre sulla destra le foto ottenute mediante microscopia confocale della stessa superficie plastica non trattata (C) e trattata (D) con il peptide marcato con fluoresceina. LP: immagini al confocale della sezione laterale dei dischetti di PP.

6. Resa e rilascio dei peptidi post funzionalizzazione

Diversi sono i fattori da considerare nello sviluppo di un efficiente *packaging* antimicrobico, primo tra tutti è la selezione di molecole che detengano un ampio spettro di attività ma, non meno importante, è trovare le condizioni ottimali per il loro legame stabile alla superficie del materiale di imballaggio. A tal fine, è necessario che la coniugazione si realizzi con una resa elevata e che venga mantenuta la capacità dei peptidi di strutturarsi. Nella seguente sperimentazione, la resa di legame a polimeri di

polipropilene dei peptidi 1018-K6 (**Figura 38**) e MTP1 (**Figura 39**) a diverse concentrazioni (50, 100 e 200 μM) è stata determinata in modo indiretto attraverso analisi cromatografica su colonna C18 a fase inversa per sistema HPLC.

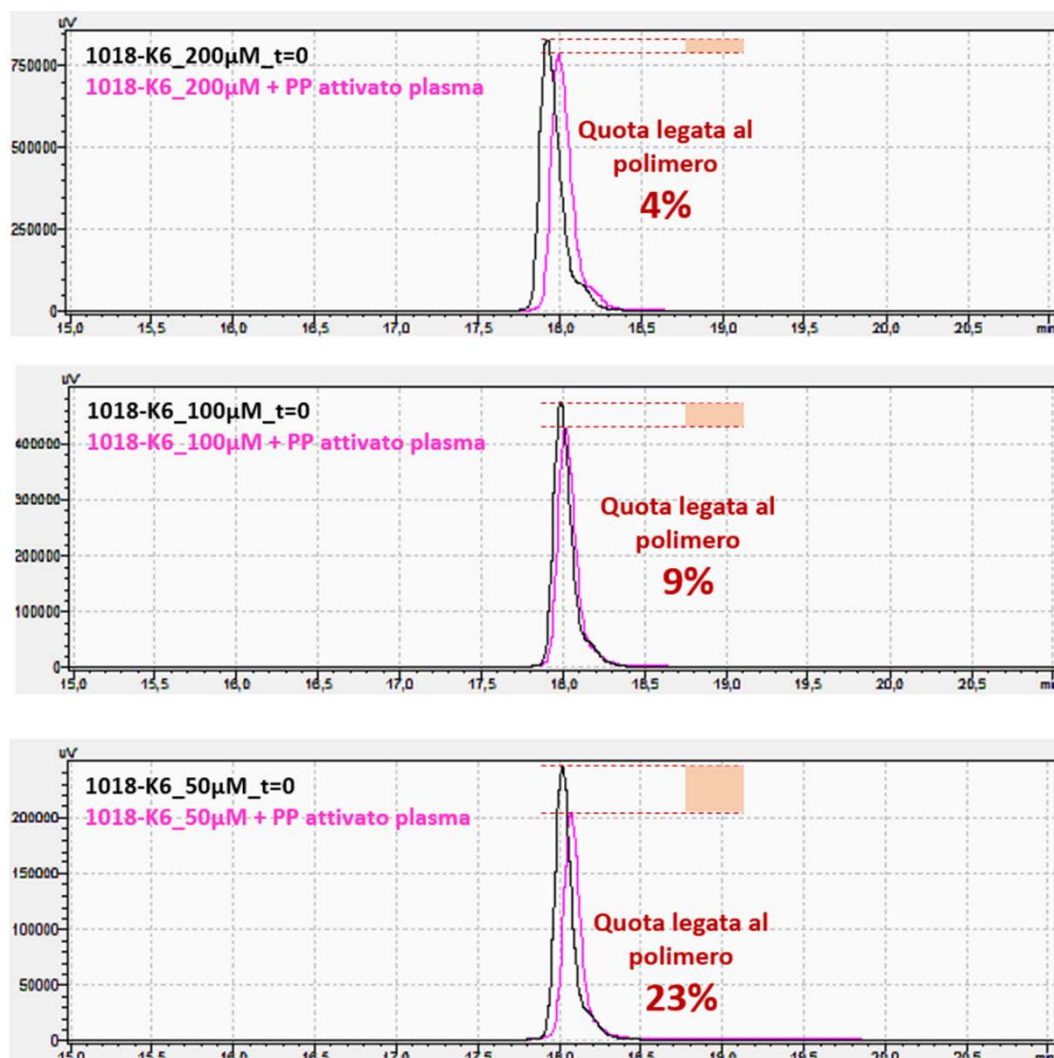


Figura 38. Profili cromatografici del peptide 1018-K6. Resa di immobilizzazione del peptide 1018-K6 su superfici di PP in funzione della concentrazione, determinate mediante cromatografia a fase inversa su colonna C18 per sistema HPLC prima e dopo la reazione di bio-coniugazione. I film pre-attivati sono stati incubati in presenza di tre diverse concentrazioni (50, 100 e 200 μM) come da procedura descritta nella sezione Materiali e Metodi. Terminata l'incubazione le soluzioni peptidiche sono state recuperate e analizzate mediante RP-HPLC e come controllo è stata utilizzata la soluzione posta a contatto con il polimero pre-attivato al tempo 0 ($t = 0$). I cromatogrammi sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

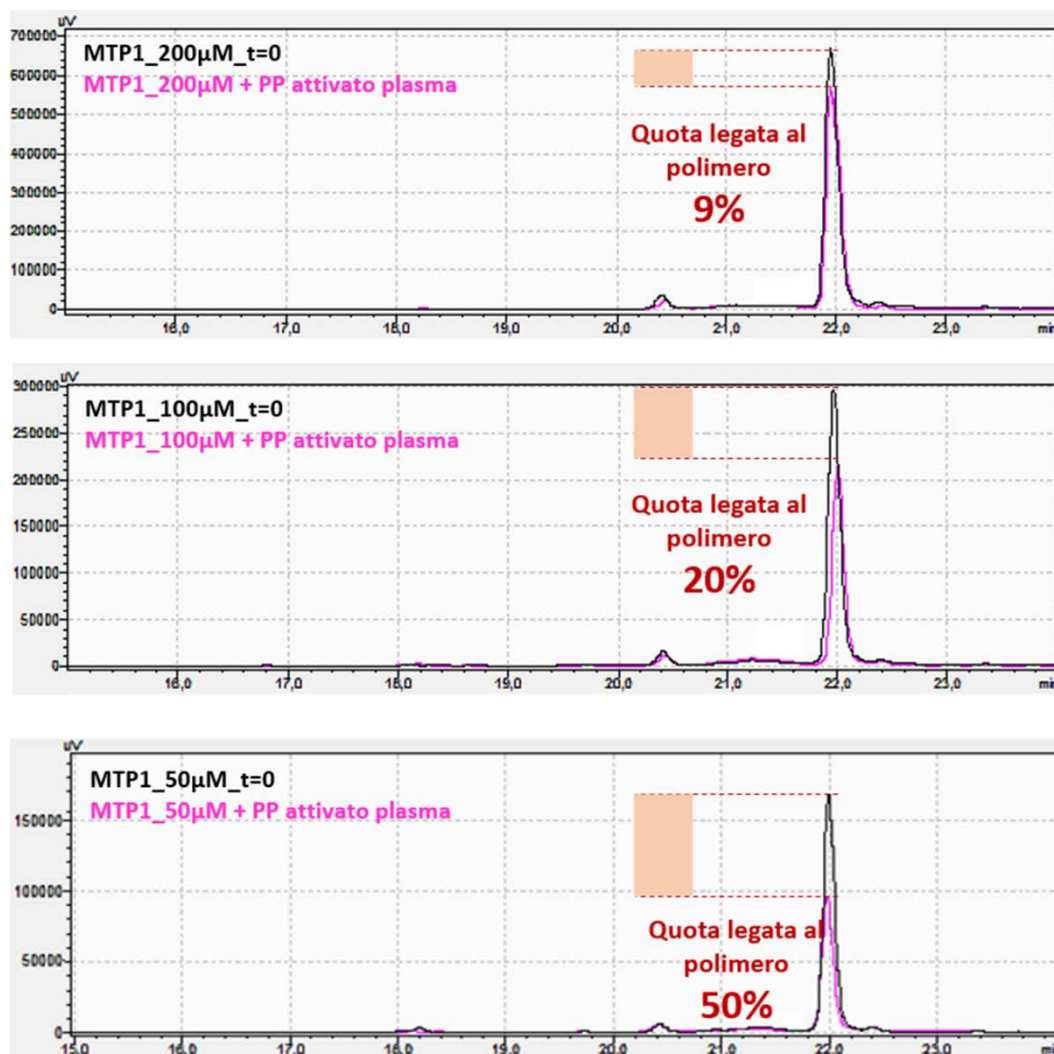


Figura 39. Profili cromatografici del peptide MTP1. Resa di immobilizzazione del peptide MTP1 su superfici di PP in funzione della concentrazione, determinate mediante cromatografia a fase inversa su colonna C18 per sistema HPLC prima e dopo la reazione di bio-coniugazione. I film pre-attivati sono stati incubati in presenza di tre diverse concentrazioni (50, 100 e 200 μM) come da procedura descritta nella sezione Materiali e Metodi. Terminata l'incubazione le soluzioni peptidiche sono state recuperate e analizzate mediante RP-HPLC e come controllo è stata utilizzata la soluzione posta a contatto con il polimero pre-attivato al tempo 0 ($t = 0$). I cromatogrammi sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

La procedura ha previsto il recupero della soluzione peptidica a contatto con il film plastico dopo un'incubazione di 24 h e successiva analisi RP-HPLC per determinare la quantità di peptide non legata. La resa di legame è stata stimata confrontando l'area del picco relativa al campione dopo bio-coniugazione con quella della soluzione peptidica di partenza ($t=0$). I risultati ottenuti hanno mostrato che i due peptidi presentano una diversa resa di immobilizzazione, che per MTP1 risulta essere quasi doppia rispetto a

quella registrata per 1018-K6. Inoltre, per entrambe le molecole è evidente una seppur lieve riduzione della resa di funzionalizzazione all'aumentare della concentrazione peptidica usata nella reazione di coniugazione. Nello specifico, per il peptide 1018-K6 è stata osservata una resa massima di legame del 23% utilizzando una concentrazione di 50 μM , corrispondente a una copertura superficiale di 2,9 nmol/cm^2 , laddove per MTP1 a parità di concentrazione i risultati hanno mostrato una resa del 50% corrispondente a 6,4 nmol/cm^2 . Le rese di immobilizzazione sono state ulteriormente validate usando una curva di calibrazione costruita utilizzando concentrazioni note di entrambi i peptidi e determinando la quantità di peptide legata per interpolazione sulle rette ottenute.

Dopo aver messo a punto il protocollo sperimentale per ottenere un'elevata coniugazione dei peptidi alla superficie polimerica, si è proceduto con la valutazione mediante analisi cromatografica RP-HPLC della resa di immobilizzazione dei peptidi 1018-K6 e MTP1, sia singolarmente che in miscela (Mix2), su dischi PP pre-attivati al plasma. Come precedentemente descritto, i dischi di polipropilene sono stati messi a contatto con le soluzioni peptidiche aventi una concentrazione finale pari a 50 μM sia per i peptidi singoli che per la miscela selezionata.

Le analisi effettuate hanno dimostrato che i due peptidi, quando co-presenti in miscela (**Figura 40 C**), si coniugano alla superficie plastica mantenendo costante il loro rapporto essendo stata registrata una resa di legame pari al 38% (3,6 nmol/cm^2) per il peptide 1018-K6 e al 54 % (1,7 nmol/cm^2) per MTP1.

Un'ulteriore caratteristica che deve detenere un imballaggio rivestito di AMPs è la stabilità del legame dei peptidi immobilizzati. Per verificare se tale requisito fosse rispettato anche dal modello sviluppato di *active packaging* prodotto in questo studio, i dischi di polipropilene funzionalizzati sono stati incubati in una soluzione salina in grado di simulare una salamoia (NaCl all'1%) per 24 h a 4 e 25 °C. Successivamente, le soluzioni sono state analizzate mediante RP-HPLC e come mostrato nei cromatogrammi riportati in **Figura 40** non si evidenzia alcun fenomeno di rilascio dei peptidi dai supporti polimerici funzionalizzati.

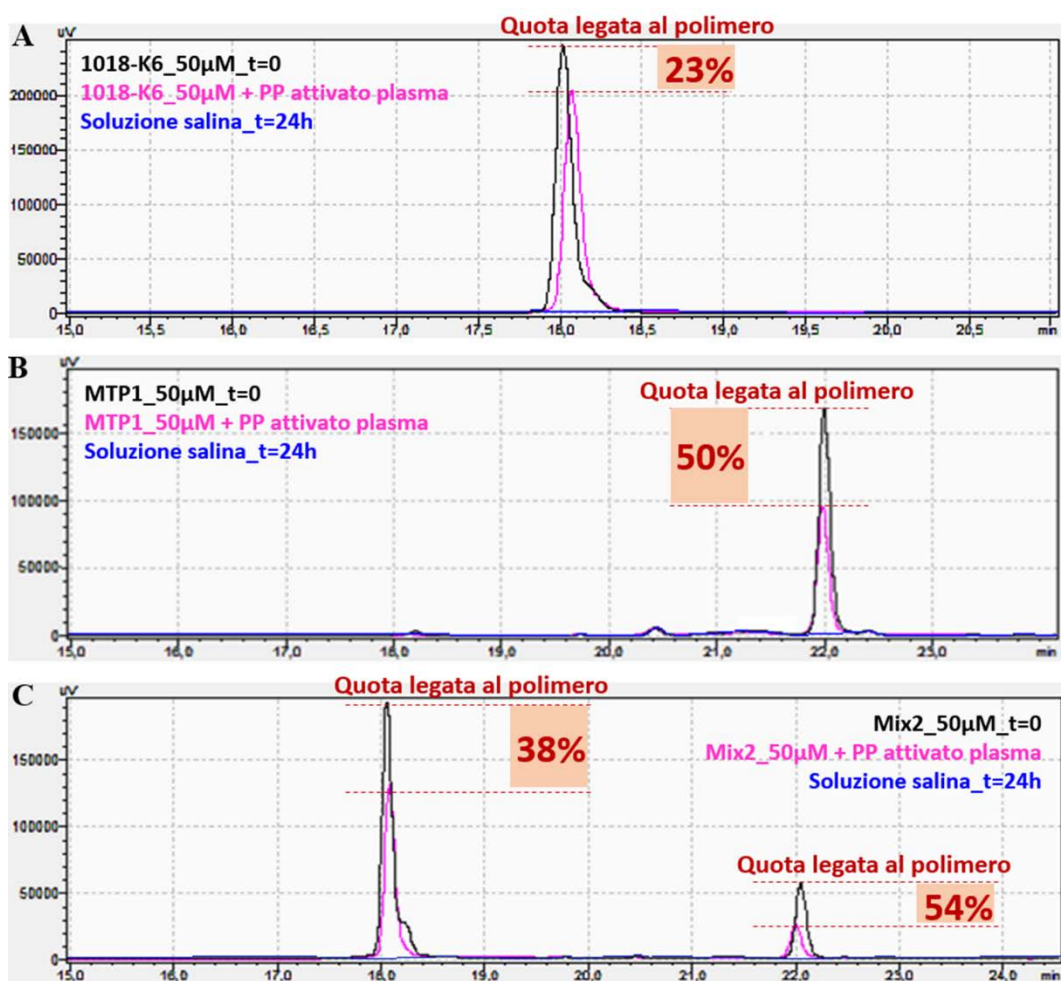


Figura 40. Profili cromatografici dei peptidi singoli e in miscela. RESA di legame (rosa) e RILASCIO in soluzione salina all'1% di NaCl (blu) dei peptidi 1018-K6 (A), MTP1 (B) e Mix2 (C) determinata mediante analisi RP-HPLC su colonna C18. I film pre-attivati sono stati incubati in presenza delle tre soluzioni peptidiche selezionate alla concentrazione di 50μM e sottoposti a procedura di funzionalizzazione come descritto nella sezione Materiali e Metodi. Terminata l'incubazione le soluzioni peptidiche sono state recuperate e analizzate mediante RP-HPLC e come controllo è stata utilizzata la soluzione posta a contatto con il polimero pre-attivato al tempo 0 (t = 0). I cromatogrammi sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

7. Analisi della popolazione microbica delle diverse matrici alimentari (lattiero-casearia, carnea e ittica) conservate con polimeri di polipropilene coniugati a peptidi antimicrobici

I prodotti lattiero caseari a causa della loro composizione rappresentano un ottimo substrato per lo sviluppo di microrganismi alteranti. Tra questi i più rappresentativi sono: batteri Gram-negativi psicrotrofi aerobici, lattobacilli, batteri sporigeni, lieviti e

muffe. L'alterazione della matrice alimentare ad opera dei funghi si manifesta con un'ampia varietà di prodotti metabolici che provocano perdita di odori e sapori, oltre a cambiamenti visibili in colore e struttura. Il deterioramento può esser causato anche indirettamente da enzimi microbici quali proteasi, fosfolipasi e lipasi, la cui attività può perdurare nell'alimento anche in seguito all'eliminazione del microrganismo [170]. Tra i prodotti lattiero caseari, la ricotta è un formaggio che deriva da un processo di coagulazione delle proteine del siero del latte mediante un trattamento termico (85-90 °C), dopo l'aggiunta di agenti acidificanti [171]. La sua conservazione è strettamente correlata al processo produttivo, ad esempio per una ricotta prodotta in strutture industriali di piccole o medie dimensioni viene considerata una *shelf-life* di circa 7 giorni. La facile deperibilità di tali prodotti sta spingendo sempre più le aziende alimentari alla ricerca di soluzioni che possano aumentarne la conservabilità. Nel presente studio, per verificare l'efficienza del *packaging* antimicrobico sviluppato, i dischi di polipropilene leganti le molecole antimicrobiche selezionate (1018-K6, MTP1 e Mix2) sono stati messi a contatto con fettine di ricotta e conservate a 4 °C per un tempo superiore a 5 giorni (**Figura 41**), che rappresenta il termine ultimo di conservabilità fissato dall'Operatore del Settore Alimentare (OSA).

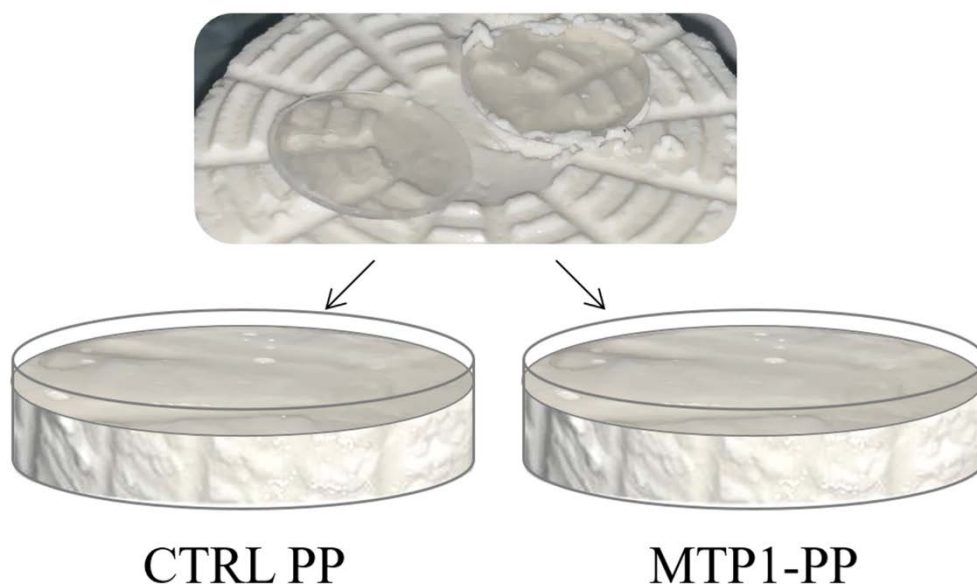


Figura 41. Rappresentazione dell'allestimento dei campioni di ricotta conservati in presenza dei film di polipropilene funzionalizzati e non a 4 °C fino ad un massimo di 10 giorni.

Dei tre polimeri bio-coniugati, solo i campioni MTP1-PPs hanno mostrato una riduzione significativa di 0,8 log ($p < 0,01$) nei confronti di *Pseudomonas* spp. e di 1,2 log verso i lieviti (**Tabella 2**) rispetto ai campioni non trattati al decimo giorno di conservazione, suggerendo una possibile estensione della *shelf-life* di circa 5 giorni.

			Riduzione log	Riduzione %		Riduzione log	Riduzione %
CBT 30 °C	CTRL-PP	4,08±0,01*			6±0,01**		
	MTP1-PP	3,72±0,02*	0,4	9,8	6,78±0,04**	0	0
<i>E.coli</i>	CTRL-PP	NA**			NA**		
	MTP1-PP	NA**	NA	NA	NA**	NA	NA
ENTEROBATTERI	CTRL-PP	3±0,01*			NA**		
	MTP1-PP	3±0,01*	0	0	NA**	NA	NA
LATTOBACILLI	CTRL-PP	NA**			3,4±0,03*		
	MTP1-PP	NA**	NA	NA	4,48±0,02*	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp.	CTRL-PP	4,4±0,05**			4,82±0,07*		
	MTP1-PP	3,91±0,07**	0,5	11,4	3,98±0,08**	0,8	16,6
LIEVITI	CTRL-PP	3±0,03**			3,18±0,01**		
	MTP1-PP	2±0,02**	1,0	33,3	1,95±0,03**	1,2	37,7
MUFFE	CTRL-PP	NA**			NA**		
	MTP1-PP	NA**	NA	NA	NA**	NA	NA
			4 giorni		10 giorni		

Tabella 2. Valutazione del profilo microbiologico di campioni di ricotta fresca di bufala dopo 4 e 10 giorni di conservazione in presenza di dischi di PP controllo (CTRL) o coniugati con il peptide MTP1. I livelli di significatività dei trattamenti sono riportati con: ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$.

I risultati ottenuti dimostrano che l'imballaggio sviluppato eserciti un interessante azione preservante nei confronti *Pseudomonas* che, come suggerito da diversi studi, per la produzione di enzimi lipolitici e proteolitici, rientra tra le specie batteriche principalmente responsabili del decadimento delle caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti lattiero-caseari. Non meno importante è l'effetto riscontrato verso i lieviti giacché costituiscono la tipologia microbiologica che maggiormente incide sulla *shelf-life* di questa categoria di prodotti, sebbene non siano stati fissati limiti dalle norme europee.

Un'altra tipologia di prodotto ascrivibile tra quelli più altamente deperibili è la carne. Si tratta di una delle componenti fondamentali dell'alimentazione umana, rappresentando una delle principali fonti energetiche, ma soprattutto di proteine e ferro. Tra i diversi tipi di carne, quella bovina è caratterizzata da un contenuto proteico molto elevato (il 20% della porzione commestibile) e un quantitativo variabile di lipidi e acqua, che dipende dall'età dell'animale e dal taglio. Le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche della carne la rendono terreno fertile per la colonizzazione di un gran numero di microrganismi. Le popolazioni microbiche che generalmente contaminano la carne cruda raccolgono una grande varietà di specie quali: batteri lattici, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Psychrobacter*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Chromobacterium*, *Brochothrix thermosphacta*, *Bacillus*, lieviti e muffe. Nel nostro studio, le prove di *shelf-life* in presenza dell'imballaggio antimicrobico, sono state effettuate su diversi tagli pregiati di carne bovina, quali lo scamone (**Figura 42**) ed il filetto (**Figura 43**), conservati sottovuoto.

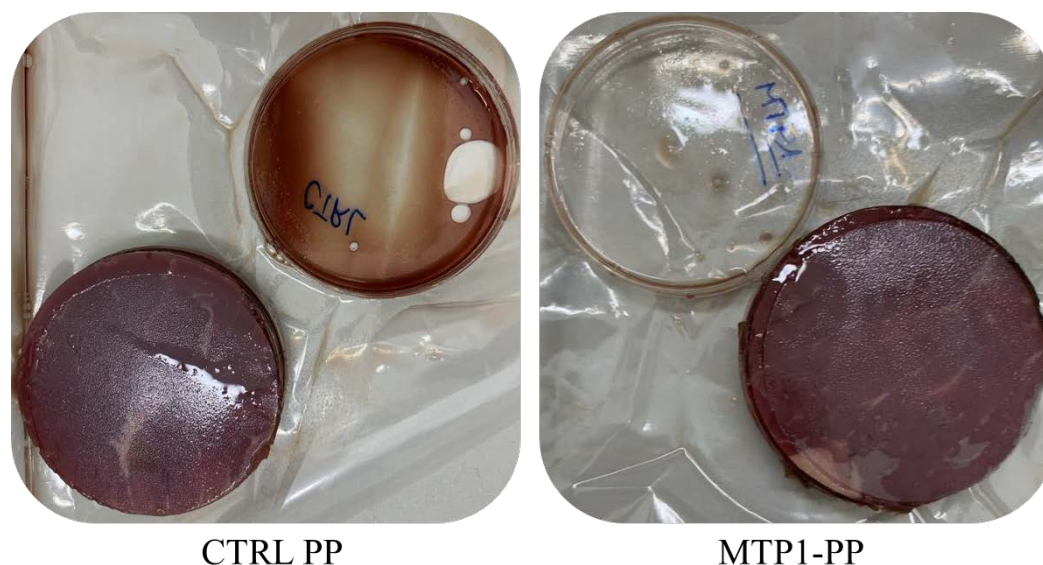


Figura 42. Campioni di scamone messi in contatto con dischi di polipropilene coniugati al peptide MTP1 o dischi controllo e conservati per 14 giorni ad una temperatura di refrigerazione di 4 °C.

Secondo quanto stabilito dall'OSA, per tale categoria di prodotto la durata massima di conservazione è di 10 giorni. Per verificare se fosse possibile incrementare la conservabilità dei prodotti selezionati con l'imballaggio antimicrobico, entrambe le matrici alimentari sono state sottoposte ad analisi microbiologiche dopo 14 giorni di

conservazione, ovvero considerando 4 giorni in più rispetto alla loro effettiva data di scadenza.



Figura 43. Tagli di filetto bovino conservati in presenza di film plastici funzionalizzati con peptide MTP1 e non a 4 °C per 14 giorni.

Nella preparazione dei campioni, le porzioni di entrambi i tagli bovini sono stati rimossi dal sottovuoto, messi a contatto con i polimeri funzionalizzati e posti nuovamente sottovuoto. La valutazione del possibile effetto preservante operato dai dischi funzionalizzati è stato calcolato dal confronto dei valori di crescita registrati sulle matrici trattate con quelli delle matrici controllo (polimero non funzionalizzato). In entrambi i casi l'unico film plastico ad aver mostrato un'effettiva capacità di rallentare la crescita di talune specie microbiche è stato quello coniugato al peptide MTP1.

Nei prodotti conservati sottovuoto è necessario considerare che, la presenza di un confezionamento che rimuove l'ossigeno intorno alla superficie dell'alimento è in grado essa stessa di rallentare nonché selezionare le specie microbiche in grado di colonizzare l'alimento. La microflora batterica in grado di svilupparsi in simili condizioni è generalmente dominata dai batteri dell'acido lattico [172].

Per lo scamone (**Tabella 3**) l'azione antimicrobica più significativa è stata riscontrata su tre diverse specie batteriche, nel dettaglio, è possibile osservare una riduzione di 0,4 log ($p < 0,01$) della popolazione dei coliformi, un totale abbattimento di *E.coli* e una riduzione di 0,6 log ($p < 0,05$) a carico dei batteri dell'acido lattico.

Non meno importante è stato l'effetto riscontrato sui lieviti dove si assiste ad un azzeramento dei valori di crescita al 14° giorno di conservazione.

			Riduzione log	Riduzione %
CBT 30 °C	CTRL-PP	8±0,05*		
	MTP1-PP	8±0,04*	0,0	0,0
CBT 5 °C	CTRL-PP	8±0,03*		
	MTP1-PP	8,3±0,03*	0,0	0,0
COLIFORMI	CTRL-PP	5,3±0,02**		
	MTP1-PP	4,9±0,02**	0,4	7,5
<i>E.coli</i>	CTRL-PP	1,4±0,02*		
	MTP1-PP	<1	>1,4	100
ENTEROBATTERI	CTRL-PP	6±0,01**		
	MTP1-PP	6,6±0,01**	0,0	0,0
LATTOBACILLI	CTRL-PP	8,3±0,02*		
	MTP1-PP	7,7±0,02*	0,6	7,2
<i>Pseudomonas</i> spp.	CTRL-PP	6,7±0,04**		
	MTP1-PP	6,4±0,08**	0,3	4,5
LIEVITI	CTRL-PP	2,6±0,01*		
	MTP1-PP	<2	>2,6	100
MUFFE	CTRL-PP	3,4±0,09*		
	MTP1-PP	3,4±0,07*	0,0	0,0
			14 giorni	

Tabella 3. Analisi microbiologiche effettuate su campioni di scamone all'apertura del sistema sottovuoto dopo 14 giorni di conservazione a 4 °C in presenza di dischi di PP controllo (CTRL) o coniugati con peptide MTP1. I livelli di significatività dei trattamenti sono riportati con: ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$.

Anche per i tagli di filetto bovino le analisi microbiologiche sono state condotte al quattordicesimo giorno di conservazione. Dai risultati ottenuti (**Tabella 4**), si conferma quanto già osservato per lo scamone, ovvero un netto effetto su specifiche tipologie microbiche. Tra queste vi sono i coliformi, verso i quali è stata osservata una considerevole riduzione della crescita pari a 1,5 log ($p < 0,01$); i batteri dell'acido lattico per i quali è evidente una decrescita di 0,2 log ($p < 0,05$) e infine i lieviti la cui presenza non viene più rivelata in seguito al trattamento. Sul filetto, è inoltre stata osservata una capacità del *packaging* attivo ridurre la crescita delle *Enterobacteriaceae* di 0,7 log ($p < 0,01$), queste specie microbiche non è raro ritrovarle sulla carne conservata sottovuoto, dove sono responsabili del caratteristico odore di solfito.

			Riduzione log	Riduzione %
CBT 30 °C	CTRL-PP	8,1±0,01*	0,0	0,0
	MTP1-PP	8,1±0,02*		
CBT 5 °C	CTRL-PP	8,3±0,02**	0,0	0,0
	MTP1-PP	8,9±0,05**		
COLIFORMI	CTRL-PP	3,8±0,02**	1,5	39,4
	MTP1-PP	2,3±0,04**		
<i>E.coli</i>	CTRL-PP	<1**	0,0	0,0
	MTP1-PP	<1**		
ENTEROBATTERI	CTRL-PP	4,5±0,01**	0,7	15,5
	MTP1-PP	3,8±0,01**		
LATTOBACILLI	CTRL-PP	8±0,02*	0,2	2,5
	MTP1-PP	7,8±0,02**		
<i>Pseudomonas</i> spp.	CTRL-PP	3,4±0,05*	0,0	0,0
	MTP1-PP	3,4±0,07*		
LIEVITI	CTRL-PP	<2**	0,0	0,0
	MTP1-PP	<2**		
MUFFE	CTRL-PP	<2**	0,0	0,0
	MTP1-PP	<2**		
		14 giorni		

Tabella 4. Analisi microbiologiche effettuate su campioni di filetto bovino conservati sottovuoto a 4 °C per 14 giorni, in presenza di dischi di PP controllo (CTRL) o coniugati con il peptide MTP1. I livelli di significatività dei trattamenti sono riportati con: ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$.

Un'altra tipologia di prodotto carneo verso cui è stata sperimentata l'efficacia del *packaging* da noi sviluppato è la carne macinata. L'alta deperibilità di questo prodotto è direttamente correlata al suo processo di lavorazione, giacché con la macinazione si ha la rottura delle diverse barriere quali, membrana cellulare, tessuto connettivo e grasso di copertura, che normalmente si oppongono alla penetrazione dei microrganismi. Vi sono anche altri fattori che concorrono al più facile deterioramento di questa categoria di prodotto, essi sono sempre collegati al processo di lavorazione e sono la maggiore disponibilità di nutrienti a seguito della rottura delle cellule e un incremento della superficie esposta all'aria. La sperimentazione ha previsto la conservazione degli hamburger di carne bovina con i film di polipropilene coniugati alle diverse molecole antimicrobiche selezionate e conservati fino a 12 giorni, assicurandosi di mantenerli ad una temperatura costante di 4 °C (**Figura 44**).

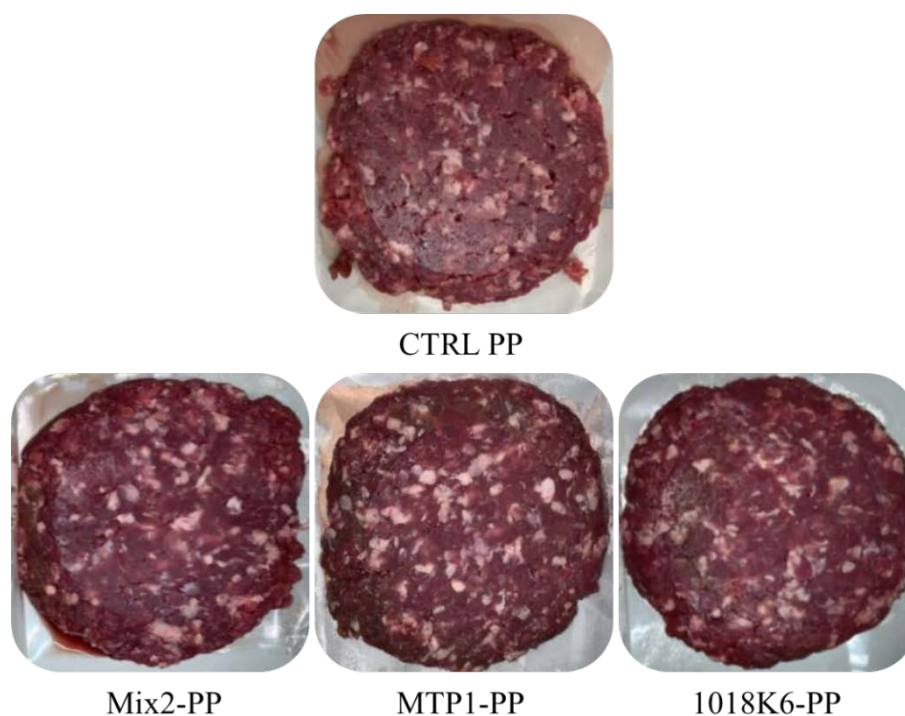


Figura 44. Campioni di hamburger bovino conservati in presenza di film plastici controllo e coniugati ai peptidi MTP1, 1018K6 e Mix2 per 12 giorni a 4 °C.

In questo caso è stata osservata un’ottima risposta di tutte le tre soluzioni sviluppate con una apparente specificità dei film funzionalizzati per talune specie microbiche rispetto ad altre. Nei confronti della carica batterica totale monitorata a 30 °C, sono stati ottenuti risultati incoraggianti con entrambi i polimeri coniugati ai singoli peptidi con una riduzione della crescita di 1,3 log ($p < 0,01$) con il sistema 1018K6-PP e di 0,4 log ($p < 0,01$) con i polimeri MTP1-PP. Verso *E.coli* è stato inoltre osservato un effetto della miscela (Mix2-PP) con una diminuzione della crescita microbica di 0,6 log ($p < 0,01$). Nei confronti delle *Enterobacteriaceae* come già analizzato su una delle matrici alimentari descritte in precedenza, i migliori risultati sono stati riscontrati con il polimero di polipropilene funzionalizzato con il peptide MTP1, che ha determinato una riduzione di 0,9 log ($p < 0,01$). La crescita di *Pseudomonas* è stata invece rallentata dall’azione dei film polimerici MTP1-PP e Mix2-PP con una riduzione di 0,7 log ($p < 0,01$) nel primo caso e di 0,8 log ($p < 0,01$) nel secondo caso. Infine, tutti e tre i sistemi polimerici “attivati” con i peptidi hanno mostrato un’azione antimicrobica, sebbene con un’efficienza differente, nei confronti di lieviti, muffe e *Staphylococcus coagulase positive*. Se MTP1-PP ha determinato una riduzione di 0,4 log ($p < 0,01$) verso i lieviti e

di 1,2 log ($p < 0,01$) verso le muffe e stafilococchi, il sistema 1018K6-PP ha rivelato una capacità di abbattimento di 0,6 e 0,7 log ($p < 0,01$) rispettivamente verso lieviti e muffe, mentre di 1,2 log ($p < 0,01$) verso stafilococchi. Il polimero Mix2-PP ha invece esibito una considerevole attività nei confronti di muffe con una riduzione 2,1 log ($p < 0,01$) e ed un'efficienza antimicrobica inferiore nei confronti di lieviti e stafilococchi un decremento rispettivamente di 0,5 e 0,9 log ($p < 0,01$) (**Tabella 5**).

A.			Riduzione log	Riduzione %		Riduzione log	Riduzione %
CBT 30 °C	CTRL-PP	7,87±0,05*			8,53±0,02*		
	MTP1-PP	6,99±0,02**	0,9	11,4	7,26±0,02**	1,3	15,2
	1018K6-PP	6,56±0,01**	1,3	16,5	8,12±0,02**	0,4	4,7
	Mix2-PP	7,5±0,02*	0,4	5,0	8,44±0,03*	0,1	1,2
CBT 5 °C	CTRL-PP	7,56±0,02*			7,58±0,01*		
	MTP1-PP	7,88±0,04*	0,0	0,0	7,31±0,01**	0,3	3,5
	1018K6-PP	6,74±0,10*	0,8	10,6	7,68±0,02**	0,0	0,0
	Mix2-PP	7,07±0,08*	0,5	6,6	7,38±0,05*	0,2	2,6
COLIFORMI	CTRL-PP	6,34±0,03*			6,33±0,06*		
	MTP1-PP	5,91±0,02*	0,4	6,3	6,09±0,02*	0,2	3,1
	1018K6-PP	5,23±0,01**	1,1	17,3	6,29±0,02**	0,04	0,6
	Mix2-PP	5,66±0,05**	0,7	11,0	5,75±0,01**	0,6	9,5
<i>E.coli</i>	CTRL-PP	NA**			NA**		
	MTP1-PP	NA**	0,0	0,0	NA**	0,0	0,0
	1018K6-PP	NA**	0,0	0,0	NA**	0,0	0,0
	Mix2-PP	NA**	0,0	0,0	NA**	0,0	0,0
ENTEROBATTERI	CTRL-PP	4,96±0,12*			6,04±0,02*		
	MTP1-PP	5,86±0,06*	0,0	0,0	5,11±0,03**	0,9	14,9
	1018K6-PP	5,63±0,09**	0,0	0,0	6,02±0,03*	0,02	0,3
	Mix2-PP	5,1±0,03*	0,0	0,0	5,76±0,02**	0,3	5,0
			5 giorni		12 giorni		

B.			Riduzione log	Riduzione %		Riduzione log	Riduzione %
LATTOBACILLI	CTRL-PP	7,82±0,02**			5,96±0,01**		
	MTP1-PP	6,74±0,01*	1,1	14,0	6±0,08**	0,0	0,0
	1018K6-PP	6,74±0,04*	1,1	14,0	6,22±0,06*	0,0	0,0
	Mix2-PP	7,36±0,05*	0,5	6,4	6,05±0,01**	0,0	0,0
	<i>Pseudomonas</i> spp.	CTRL-PP			7,71±0,02*		
		MTP1-PP	0,8	11,7	6,98±0,05**	0,7	9,1
		1018K6-PP	0,7	10,2	7,37±0,02**	0,3	3,9
		Mix2-PP	1,3	18,9	6,89±0,03**	0,8	10,4
	LIEVITI	CTRL-PP			4,2±0,01**		
		MTP1-PP	0,6	14,7	3,76±0,04**	0,4	9,5
		1018K6-PP	0,9	22,0	3,57±0,05**	0,6	14,2
		Mix2-PP	0,0	0,0	3,7±0,02**	0,5	11,9
MUFFE	CTRL-PP	4,69±0,01*			5,28±0,02**		
	MTP1-PP	4,57±0,03**	0,1	2,1	4,11±0,02**	1,2	22,7
	1018K6-PP	3,95±0,03**	0,7	14,9	4,56±0,01**	0,7	13,2
	Mix2-PP	3,96±0,01**	0,7	14,9	3,15±0,02**	2,1	39,8
	<i>Staph. coagulase positive</i>	CTRL-PP			4,53±0,04**		
		MTP1-PP	0,6	11,5	3,36±0,02**	1,2	26,5
		1018K6-PP	0,9	17,2	3,37±0,02**	1,2	26,5
		Mix2-PP	0,3	5,7	3,63±0,01**	0,9	19,9
			5 giorni		12 giorni		

Tabella 5 (A e B). Analisi microbiologiche effettuate su campioni di hamburger bovino conservati fino ad un massimo di 12 giorni ad una temperatura di refrigerazione di a 4 °C. I diversi campioni sono stati messi in contatto con i film non funzionalizzati (CTRL) o funzionalizzati con i diversi peptidi (MTP1-PP; 1018K6-PP e Mix2-PP). I livelli di significatività dei trattamenti sono riportati con: ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$.

Oltre quelle già citate, un'altra categoria di matrici alimentari caratterizzata da una facile deperibilità è rappresentata dai prodotti ittici. La loro predisposizione ad alterazione, risiede nella composizione stessa delle loro carni, nella carenza di barriere fisiche a causa della presenza di un esiguo tessuto connettivo e nell'elevata umidità superficiale. Le specie ittiche ospitano normalmente, sulla cute e nelle branchie, una flora microbica autoctona composta da batteri presenti nelle acque marine

(*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Moraxella* e *Flavobacterium*) la cui pericolosità è correlata esclusivamente ai processi di degradazione *post-mortem* del prodotto. Per tal motivo, l'immediata refrigerazione del pescato è una pratica necessaria per rallentare i processi di trasformazione chimico-fisici e biologici, che danno inizio alle reazioni di degradazione. Generalmente, al secondo/terzo giorno di stoccaggio in condizioni refrigerate iniziano a proliferare batteri Gram-negativi psicrofili aerobi, noti come *fish-spoilage*, quali Enterobatteriaceae, *Alteromonas* e *Pseudomonas*, l'ultimo dei quali può arrivare a costituire più dell'80% della microflora con il prolungarsi della conservazione [173]. In questa fase sperimentale, per esaminare la capacità dell'*active-packaging* sviluppato di incrementare la *shelf-life* dei prodotti della pesca, i polimeri di polipropilene coniugati ai peptidi sono stati impiegati per confezionare tranci di salmone fresco. I campioni così allestiti sono stati conservati per 7 giorni ad una temperatura di refrigerazione di 4 °C, al fine di valutare un'eventuale estensione della conservabilità di almeno 3 giorni, rispetto alla data di scadenza fissata all'OSA (**Figura 45**). In questo caso, gli unici polimeri funzionalizzati a mostrare un'azione antimicrobica e preservante sono stati quelli coniugati al peptide 1018-K6.

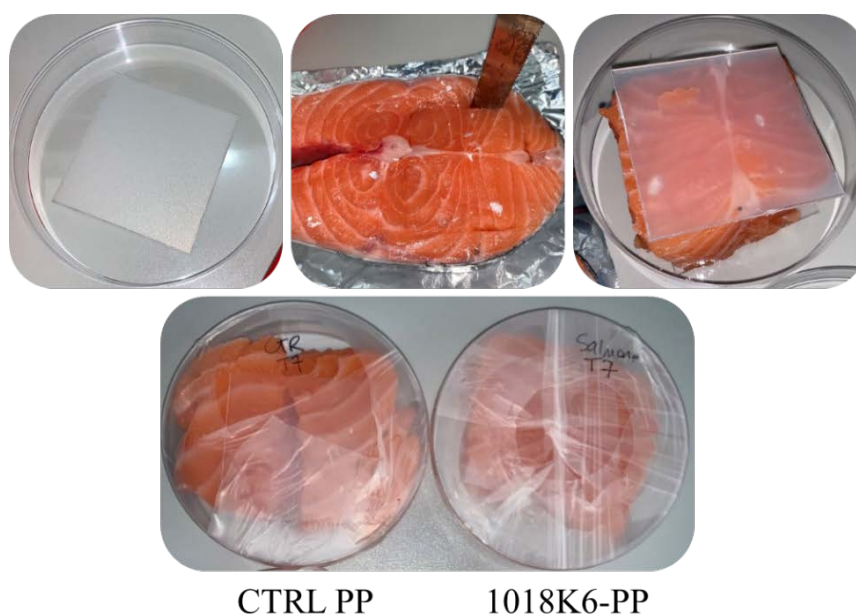


Figura 45. Tranci di salmone conservati per 4 e 7 giorni con dischi 1018K6-PP o polimeri controllo ad una temperatura costante di 4 °C

Dalle analisi microbiologiche effettuate al 7° giorno di conservazione e riportate in **Tabella 6**, è evidente l'effetto del film polimerico funzionalizzato sulla crescita

batterica determinando una riduzione di 2,9 log ($p < 0,05$) su *E.coli*, di 0,3 log ($p < 0,01$) sugli enterococchi fecali, di 0,5 log ($p < 0,01$) su *Pseudomonas*, di 1,4 log ($p < 0,01$) su *Brochothrix thermosphacta* ed infine di 1,2 log ($p < 0,01$) sugli stafilococchi coagulasi positivi.

			Riduzione log	Riduzione %		Riduzione log	Riduzione %
CBT 30 °C	CTRL-PP	6,77±0,07**			6,89±0,02**		
	1018K6-PP	6,73±0,01**	0,0	0,0	6,88±0,01**	0,0	0,0
CBT 7 °C	CTRL-PP	4,24±0,01**			5,32±0,04**		
	1018K6-PP	4,56±0,04**	0,0	0,0	5,28±0,04**	0,0	0,0
COLIFORMI	CTRL-PP	3,91±0,04*			3,44±0,19*		
	1018K6-PP	3,56±0,07**	0,3	7,7	3,44±0,18**	0,0	0,0
<i>E.coli</i>	CTRL-PP	2,07±0,09**			2,95±0,03**		
	1018K6-PP	NA**	2,07	100	NA*	2,9	100
ENTEROBATTERI	CTRL-PP	3,86±0,07**			3,07±0,04**		
	1018K6-PP	3,66±0,04**	0,2	5,2	3,96±0,04**	0,0	0,0
ENTEROCOCCI FECALI	CTRL-PP	3,96±0,01**			5,07±0,12**		
	1018K6-PP	2,96±0,12**	1,0	25,2	4,74±0,06**	0,3	5,9
<i>Pseudomonas</i> spp.	CTRL-PP	7,32±0,10**			7,44±0,16**		
	1018K6-PP	6,28±0,05**	1,0	13,7	6,91±0,04**	0,5	6,7
<i>B. thermosphacta</i>	CTRL-PP	5,98±0,03**			7,36±0,14**		
	1018K6-PP	6,81±0,04**	0,0	0,0	5,96±0,19**	1,4	19,0
<i>Staph. coagulase positive</i>	CTRL-PP	2,26±0,09**			3,19±0,05**		
	1018K6-PP	NA**	2,26	100	1,96±0,02**	1,2	37,6
		4 giorni			7 giorni		

Tabella 6. Analisi microbiologiche effettuate sui tranci di salmone conservati per 4 e 7 giorni a 4 °C. I diversi campioni sono stati messi in contatto con dischi di polipropilene non funzionalizzati (CTRL) o funzionalizzati con il peptide 1018K6. I livelli di significatività dei trattamenti sono riportati con: ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$.

La verifica dell'importante azione di contenimento dello sviluppo dei microrganismi alteranti responsabili del deterioramento nelle diverse matrici alimentari investigate, quando trattate con i polimeri funzionalizzati con i peptidi antimicrobici selezionati, suggerisce l'alto potenziale applicativo di tale tecnologia innovativa.

8. CHALLENGE TEST su hamburger bovino e salmone fresco

Quando ci si trova dinanzi alla prospettiva di estendere la vita commerciale di un prodotto alimentare attraverso l'impiego di una strategia innovativa, quale appunto un *packaging* antimicrobico, risulta particolarmente importante verificarne il mantenimento dei criteri di sicurezza e quindi valutare che impatto abbia sulla crescita di microrganismi patogeni. Un valido strumento per analizzare la sensibilità di un agente patogeno alla tecnologia proposta è rappresentato dai *challenge test*. Nella sperimentazione condotta su due diverse matrici alimentari conservate in presenza dei polimeri funzionalizzati, i *challenge test* sono stati eseguiti per *Listeria monocytogenes*, in quanto, nonostante le listeriosi presentino una bassa incidenza rispetto ad altre tossinfezioni alimentari, la gravità della patologia e gli alti tassi di mortalità stanno diventando un problema sempre più importante per la sanità pubblica in tutto il mondo. Secondo quanto riportato nel parere scientifico formulato dal CNSA (Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare) in data 20 gennaio 2021, tra gli alimenti per cui è stata riscontrata la possibilità di ottenere esito positivo alla ricerca della *Listeria* con metodo qualitativo a valori superiori all'1% rientra la carne macinata con un valore pari al 5%. Dato l'alto rischio accertato per tale categoria di prodotti alimentari, una delle due matrici selezionate per valutare l'efficacia del sistema di packaging attivo sviluppato è rappresentata dal macinato bovino, il quale è stato conservato in presenza dei diversi polimeri funzionalizzati (1018K6-PP; MTP1-PP e Mix2-PP) o dei film controllo (CTRL PP) ad una temperatura di refrigerazione di 4 °C fino ad un massimo di 72 h (**Figura 46**). In accordo con quanto raccomandato per l'esecuzione di questi studi, sono stati impiegati dei ceppi "di campo" ovvero isolati da matrici alimentari, in quanto si ritiene che possano meglio rappresentare il comportamento di ceppi contaminanti naturali. In aggiunta, al fine di garantire il mantenimento del requisito di sicurezza alimentare, scongiurando la possibilità che un particolare ceppo batterico la comprometta, la sperimentazione è stata condotta utilizzando colture miste di due ceppi di *L. monocytogenes* isolati da matrice carnea ad una concentrazione di circa 150 CFU/mL. Il valore di contaminazione adoperato è rappresentativo di un livello di contaminazione naturale comunemente riscontrato in alimenti freschi, tenendo conto che, come si legge nel regolamento (CE) n. 2073/2005, il valore limite imposto per tale batterio correlabile ad un basso rischio di causare listeriosi è di 100 CFU/g.

Controllo negativo	CTRL-PP	AMPs-PP		
			MTP1-PP	24 h/5 °C
			1018K6-PP	
			Mix2-PP	
			MTP1-PP	72 h/5 °C
			1018K6-PP	
			Mix2-PP	

Figura 46. *Challenge tests* effettuati su hamburger bovino con ceppi di *Listeria monocytogenes* conservati per 24 e 72 h a 5 °C. **Controllo negativo:** hamburger bovino non trattato; **CTRL PP:** hamburger bovino trattato con polimero non funzionalizzato; **AMPs-PP:** hamburger bovino trattato con polimeri funzionalizzati.

Un'ulteriore categoria di prodotto considerata ad alto rischio di contaminazione microbiologica a causa della sua origine, nonché della modalità di lavorazione, è rappresentata dai prodotti ittici. Per queste matrici alimentari è stato verificato un aumento del tasso di incidenza di listeriosi considerata la capacità di tale batterio di crescere anche a temperature di refrigerazione. Per valutare la capacità del polimero 1018K6-PP di contrastare la crescita di *Listeria monocytogenes*, sono stati selezionati filetti di salmone, che sono stati conservati per 72 h a 5 °C (**Figura 47**) con i polimeri funzionalizzati e non. La scelta del sistema 1018K6-PP è stata dettata dai risultati delle analisi microbiologiche descritte nel precedente paragrafo, che ne hanno evidenziato una maggiore efficacia antimicrobica rispetto alle altre soluzioni sviluppate, probabilmente in relazione alla differente composizione della matrice alimentare analizzata. Come per il macinato bovino, anche nel caso dei tranci di salmone è stato impiegato un inoculo di 150 CFU/mL di colture miste, nel caso specifico la miscela è stata preparata con tre ceppi di *L. monocytogenes* isolati da matrice ittica.

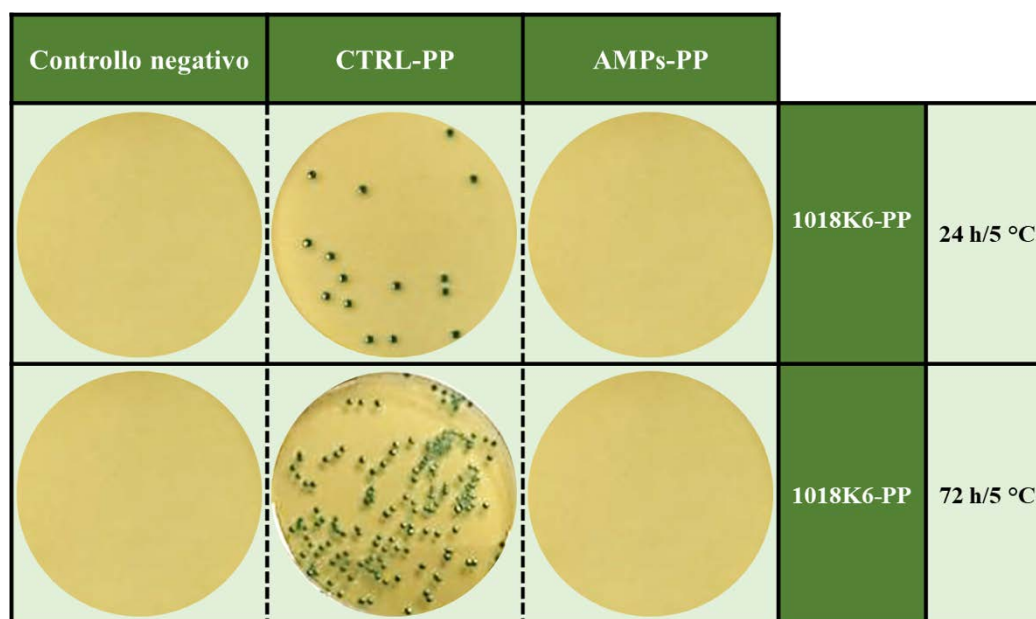


Figura 47. Challenge tests effettuati su tranci di salmone con ceppi di *Listeria monocytogenes* conservati per 24 e 72 h a 5 °C con polimeri funzionalizzati 1018-K6 nei confronti di *Listeria monocytogenes* su. **Controllo negativo:** tranci di salmone non trattati; **CTRL-PP:** tranci di salmone trattati con polimero non funzionalizzato; **AMPs-PP:** tranci di salmone trattati con polimero funzionalizzato.

Per entrambi i prodotti alimentari selezionati, i dati ottenuti hanno evidenziato una straordinaria capacità da parte del polimero 1018K6-PP di contrastare la crescita e la

sopravvivenza dell'agente microbico considerato, sulla superficie dell'alimento durante tutta la durata dello stoccaggio, se confrontato con il polimero non funzionalizzato. Nel caso del macinato bovino, il risultato positivo registrato anche per il film plastico legante la miscela peptidica e la totale mancanza di effetto osservata per i polimeri MTP1-PP, ha permesso di correlare l'efficacia del sistema al peptide 1018-K6 ugualmente presente sul polimero Mix2-PP anche se in percentuale minore. Nel dettaglio, per i polimeri 1018-K6 e Mix2-PP, si è osservata una completa inibizione della crescita di *L. monocytogenes* dopo le 72 h di incubazione, ponendo tale sistema progettato come possibile candidato tra le soluzioni innovative per preservare la sicurezza dei prodotti ad alto rischio durante il periodo di conservazione.

9. Analisi colorimetrica strumentale dei tranci di salmone conservati in presenza dell'imballaggio innovativo

Il principale requisito che un prodotto alimentare deve possedere per accattivare il consumatore spingendolo all'acquisto è la vivacità del colore, essendo quest'ultimo direttamente correlato al concetto di freschezza. La carne del salmone è contraddistinta da un colore caratteristico che, se non presente, può essere spia di un prodotto qualitativamente inadatto. Considerando l'importante impatto del colore sulla valutazione della qualità dell'alimento in questione, si è deciso di implementare le informazioni sulle potenzialità del *packaging* antimicrobico sviluppato, anche in termini di capacità di mantenere invariata la colorazione nel corso dell'intera durata del periodo di conservazione. Il metodo adoperato per tale valutazione è il modello colorimetrico $L^*a^*b^*$, anche conosciuto con il nome di CIELab, che è stato elaborato nel 1976 dalla Commissione Internazionale dell'Illuminazione (CIE) per uniformare le differenze di colore in relazione alla percezione visiva. La modalità Lab, ampiamente diffusa per la misurazione della colorazione delle matrici alimentari, individua il colore in base a tre parametri di cui "L" indica la luminosità ed è espressa in percentuale (0 per il nero e 100 per il bianco), ed "a" e "b" che indicano due gamme di colori che vanno rispettivamente dal verde al rosso e dal blu al giallo con dei valori compresi nell'intervallo -120 a +120. Dalle analisi effettuate sui tranci di salmone i cui valori sono riportati in **Tabella 7**, l'unico parametro a risentire in modo significativo del trattamento è stato la luminosità (L^*), sebbene tale caratteristica non abbia influenzato in modo evidente l'aspetto generale del prodotto.

L*	CTR-PP	43,5±1,5**	45,9±0,6a,*	48,2±0,7**
	1018K6-PP	43,5±1,5*	36,1±1,9*	44,5±1,5*
a*	CTR-PP	16,8±0,8	19,7±1,4	15,9±1,4
	1018K6-PP	16,8±0,8	20,0±1,2**	16,6±0,6**
b*	CTR-PP	21,1±1,7	23,5±2,9	15,9±2,0
	1018K6-PP	21,1±1,7	24,4±3,4	17,0±1,6
Chroma	CTR-PP	27,0±1,8	30,8±3,1	22,5±2,4
	1018K6-PP	27,0±1,8	31,6±3,3	23,8±1,5
Hue angle	CTR-PP	51,5±1,0*	49,7±1,6**	44,8±0,9**
	1018K6-PP	51,5±1,0**	50,1±2,9	45,4±2,0**
ΔE	CTR-PP		6,3±2,3	7,2±0,9
	1018K6-PP		9,5±1,4	6,4±1,8
Δa*	CTR-PP		3,0±1,9	-0,8±0,6
	1018K6-PP		3,2±1,5	-0,1±1,2
Δb*	CTR-PP		2,4±3,1a	-5,2±0,7**
	1018K6-PP		3,2±2,5	-4,1±3,3
		0	4	7
		Giorni		

Tabella 7. Variazioni degli indici di colore dei filetti di salmone conservati in presenza dei film di polipropilene controllo (CTRL-PP) e funzionalizzati (1018K6-PP) ai diversi tempi di conservazione. I livelli di significatività dei trattamenti sono riportati con: ** $p \leq 0,01$ e * $p \leq 0,05$.

Infatti, i valori relativi al colore sono simili a quelli registrati per i tranci di salmone conservati in presenza del solo polimero plastico (CTRL-PP) a tutti i tempi di campionamento su cui sono state eseguite le analisi. Nel dettaglio, per quanto concerne il colore, i campioni confezionati con i 1018K6-PPs sono risultati leggermente più carichi nelle tinte del rosso (a*) e giallo (b*) rispetto a quelli di controllo. Secondo diversi autori [174-176] il principale fattore da considerare per questa famiglia di pesci è il rosso, in quanto è associato alla preferenza e all'accettabilità del consumatore. Le variazioni del valore a* nel salmone sono dovute all'aggiunta di carotenoidi, come astaxantina e cantaxantina, che conferiscono una colorazione rosata ai salmonidi. Tuttavia, la comunità scientifica non è d'accordo all'unanimità, infatti, secondo quanto dimostrato da Yeşilayer *et al.* [177] per filetti di salmone atlantici d'allevamento alimentati con mangimi contenenti carotenoidi, all'analisi del colore sono stati riscontrati alti valori di giallo, dimostrando che ad influenzare la colorazione tipica rosso-arancio concorrano entrambi i colori. Infine, è importante sottolineare che per i

valori di a^* e b^* non si apprezza una differenza significativa tra tutti i campioni ai diversi tempi considerati, da cui ne consegue l'ottenimento di valori di ΔE (differenze di colore totali), Δa^* e Δb^* simili. I risultati ottenuti dimostrano un impatto positivo sul prolungamento della *shelf-life* del salmone da parte dei polimeri antimicrobici, preservandone l'aspetto.

10. Valutazione dell'effetto del *packaging* antimicrobico sui parametri chimici nei tranci di salmone

Un altro fattore che influenza il consumatore nell'acquisto di un prodotto alimentare è il suo odore. La comparsa di odori sgradevoli durante il deterioramento delle matrici alimentari è dovuto alla produzione di sostanze volatili ad opera del metabolismo batterico che prolifera sulla sua superficie. Pertanto, alcuni dei caratteristici composti organici volatili (VOC) prodotti dai batteri, possono essere utilizzati come potenziale indice di deterioramento chimico (CSI) [178]. Nel presente studio, per valutare la capacità della tecnologia proposta di preservare l'integrità chimica del salmone, sono stati monitorati due indici che, essendo i prodotti finali della degradazione delle proteine, svolgono un ruolo chiave nella valutazione della qualità dell'alimento, si tratta dell'azoto basico volatile totale (TVB-N) e dell'azoto trimetilammina (TMA-N) (**Figura 48**) [179]. Il TVB-N è espressione del contenuto dei composti azotati basici volatili come trimetilammina (TMA), dimetilammina (DMA) e altre sostanze azotate, che sono prodotte da enzimi batterici o tissutali dalla deaminazione degli aminoacidi. Dai risultati riportati nei grafici (**Figura 47 A**), rispetto al contenuto iniziale di TVB-N pari a $7,89 \pm 0,21$ mg/100 g, al quarto giorno di conservazione sono state osservate differenze significative ($p < 0,01$) tra i campioni di salmone confezionati con le due tipologie di imballaggi (CTRL-PP e 1018K6-PP). In particolare, l'imballaggio antimicrobico sembra rallentare indirettamente la degradazione proteica nei filetti di salmone attraverso il controllo delle crescite microbiche. Infatti, la grande quantità di aminoacidi liberi nei pesci [180;181] viene utilizzata dal metabolismo batterico come substrato per la produzione di acidi organici, composti solforati, ammoniaci e ammine biogene (BA) [182;183]. È importante sottolineare che, sebbene l'impiego del film 1018K6-PP abbia evidenziato una spiccata capacità di ridurre la degradazione proteica durante l'intero periodo di conservazione, i valori di TVB-N non hanno mai raggiunto e superato il limite legislativo di 35 mg/100 g specificato dalla UE 2019/627 per questa

tipologia di pesce [184]. Il TMA-N deriva dalla decomposizione dell'N-ossido di trimetilammina (TMAO), che nei prodotti ittici conservati a temperatura di refrigerazione è utilizzato dai batteri come donatore di molecole di ossigeno nel loro metabolismo respiratorio [185-187]. A causa della considerevole quantità di TMAO nel tessuto muscolare del *Salmo salar* che ne è naturalmente ricco, si può desumere che esista una stretta correlazione tra la concentrazione di TMA-N e la specie di pesce [188]. Nella **Figura 47 B** è possibile osservare come i campioni confezionati con 1018K6-PPs hanno mostrato i valori più bassi di TMA-N ($p < 0.01$) sia a 4 che a 7 giorni di conservazione in accordo con i valori sopra riportati di TVB-N, rafforzando così l'ipotesi che l'imballaggio sviluppato influenzi la proliferazione delle comunità microbiche alteranti. Sebbene il TMA sia considerato un buon indicatore per i processi di deterioramento alimentare, non sono stati definiti limiti legislativi massimi per le concentrazioni di TMA. Tuttavia, secondo il limite di accettabilità per il pesce proposto da Shumilina *et al.* [189] di 4,2 mg/100 g, la freschezza è stata preservata solo nei filetti di salmone messi a contatto con 1018K6-PP, per i quali il valore di TMA è risultato inferiore a 5 mg/100 g. Inoltre, al fine di valutare lo stato di ossidazione lipidica, di cui è nota la grande influenza sulla qualità degli alimenti, in particolare di quelli contenenti grassi altamente insaturi come il pesce [190;191], sono state eseguite misurazioni delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) espresse come livelli di Malonildialdeide (MDA). Come mostrato nella **Figura 47 C**, contrariamente a quanto osservato per i filetti conservati in presenza dei polimeri funzionalizzati (1018K6-PP), i valori TBARS nei filetti di controllo hanno mostrato un considerevole incremento durante lo stoccaggio in condizioni refrigerate. In base alla attività antimicrobica evidenziata per il polimero 1018K6-PP, la sua comprovata proprietà antiossidante non desta alcuna sorpresa data la ben nota correlazione esistente tra ossidazione lipidica e contaminazione batterica [192].

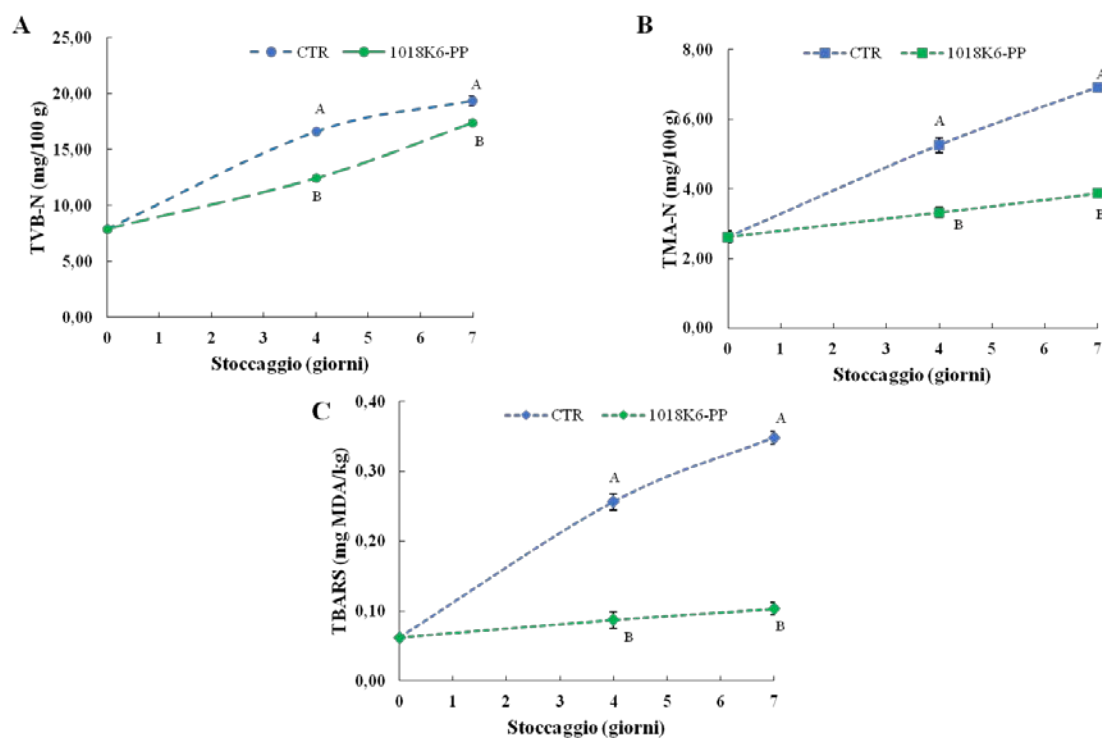


Figura 48. Effetti dei polimeri funzionalizzati 1018K6-PP sulla qualità chimica dei filetti di salmone. (A) Cambiamenti in TVB-N di filetti di salmone confezionati in film attivi 1018K6-PP durante lo stoccaggio; (B) Cambiamenti in TMA-N di filetti di salmone confezionati in film attivi 1018K6-PP durante lo stoccaggio a 4 °C; (C) Cambiamenti nei valori di TBARS di filetti di salmone confezionati in film 1018K6-PP attivi durante lo stoccaggio. CTR (linee blu): film in PP senza 1018K6; 1018K6-PP (linee verdi): film in PP funzionalizzati con 1018K6

Nel complesso, le analisi complete dei parametri microbiologici e chimici hanno evidenziato due aspetti principali: il ruolo chiave di TVB-N, TMA e MDA come indici di deterioramento chimico negli alimenti deperibili e l'efficacia del sistema di *packaging* 1018K6-PP nell'estensione della durata di conservazione dei filetti di salmone. Come riportato da Prabhakar *et al.* [193], l'ipotesi dell'interconnessione tra le concentrazioni batteriche e la produzione di metaboliti chimici è già consolidata così come il legame tra i livelli di TVB-N/TMA e la *shelf-life*. Pertanto, i nostri risultati hanno confermato questo forte legame e candidato 1018K6-PP come preziosa tecnologia di confezionamento in grado di garantire una maggiore durata per alimenti altamente deperibili come il salmone crudo.

11. Analisi sensoriali su tranci di salmone conservati con *packaging* antimicrobico

Il salmone è un prodotto che, secondo le ultime stime elaborate dal CAR (Centro Agroalimentare Roma), presenta un trend in salita dei prezzi di mercato a causa della crescente domanda a fronte di un'offerta limitata. L'elevato valore di mercato che lo contraddistingue pone tale alimento in cima alla classifica degli alimenti da preservare in termini di qualità e sicurezza. Come noto, lo strumento attraverso il quale i consumatori scelgono il cibo in un punto vendita, è rappresentato dalla percezione sensoriale, questi infatti confidando nei propri sensi, li adottano come sistema immediato e facile per valutarne freschezza e qualità [194]. Pertanto, i tranci di salmone conservati con la tecnologia di confezionamento sviluppata, sono stati sottoposti alla valutazione delle caratteristiche organolettiche. L'analisi sensoriale è stata effettuata da un gruppo di assaggiatori esperti (panel) che, seguendo una procedura standardizzata, ha emesso un giudizio sul prodotto in questione. La commissione si è espressa su parametri quali colore, odore e aspetto generale attribuendo a ciascuno di essi un punteggio numerico sulla base della scala di valutazione Likert a 9 punti, consentendo di definire la qualità dell'alimento analizzato. Come si evince dai grafici riportati in **Figura 49**, le caratteristiche sensoriali analizzate sembrano essere parzialmente influenzate dal *packaging* antimicrobico evidenziando un'importante riduzione nello sviluppo di odori sgradevoli. Nonostante l'elevata qualità di tutti i campioni all'acquisto, i filetti di salmone appartenenti ai gruppi di controllo hanno mostrato segni di deterioramento già a partire dal 4° giorno di conservazione in condizioni controllate di refrigerazione. Secondo il parere dei giudici, i campioni di controllo sono stati classificati come prodotti di " scarsa qualità in termini di freschezza", a causa del punteggio ottenuto sui i parametri di odore e aspetto generale durante l'intero periodo di stoccaggio. Al contrario, i campioni trattati hanno mantenuto nel tempo buone caratteristiche sensoriali. Inoltre, i punteggi relativi all'aspetto generale dei campioni trattati hanno evidenziato l'assenza di influenze negative del nuovo *packaging* attivo sulle caratteristiche sensoriali, a causa della natura incolore e inodore della molecola 1018-K6.

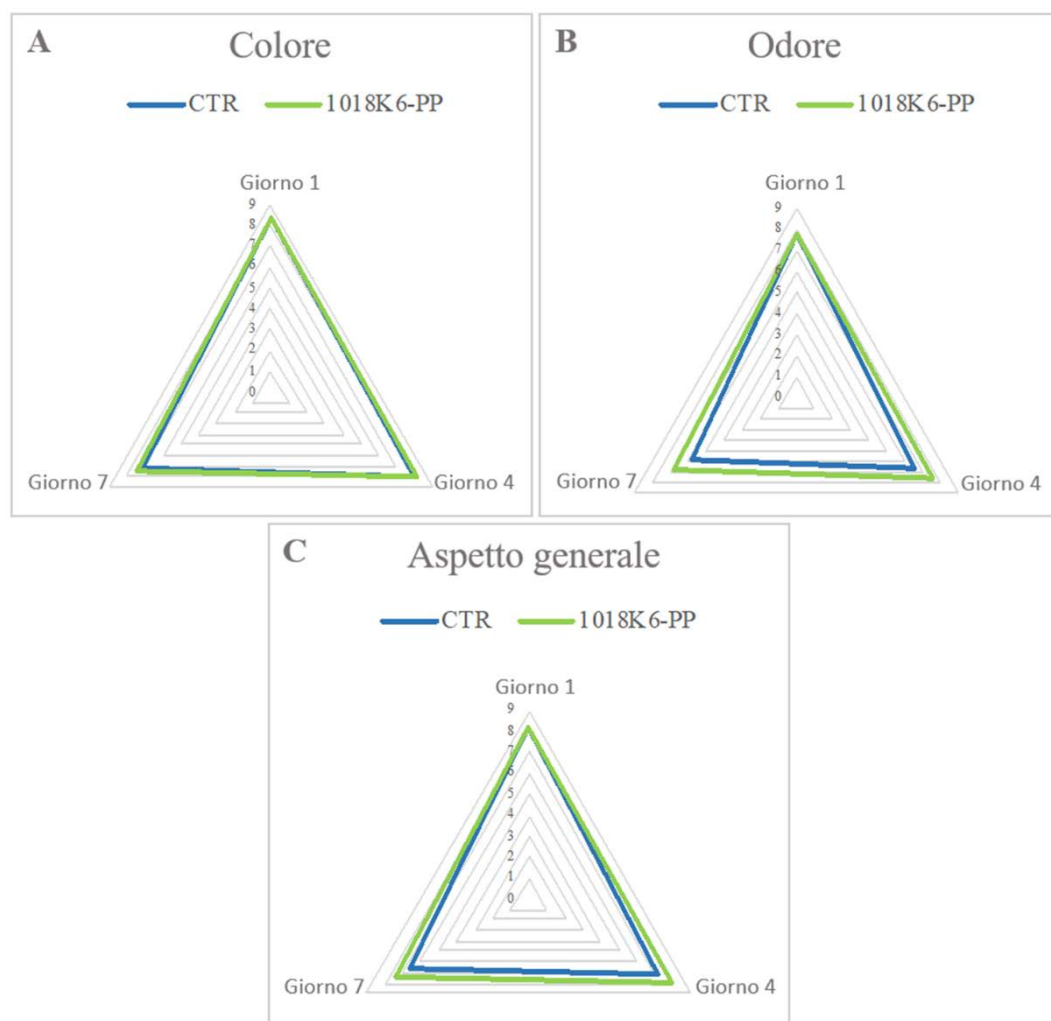


Figura 49. Analisi sensoriale in termini di variazione nel colore (A), odore (B) e aspetto generale (C) effettuata su tranci di salmone durante il periodo di stoccaggio con polimeri di polipropilene funzionalizzati o non con il peptide antimicrobico selezionato. CTRL (linea blu): tranci di salmone trattati con polimero non funzionalizzato; 1018K6-PP (linea verde): tranci di salmone trattati con polimero coniugato al peptide 1018K6.

Conclusioni

Secondo l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) un terzo di tutti i prodotti alimentari a livello mondiale (1,3 miliardi di tonnellate edibili) vengono perduti a causa di alterazioni o sprecati ogni anno lungo l'intera catena di approvvigionamento, con conseguente perdita economica. La prevenzione degli sprechi di cibo potrebbe quindi contribuire a recuperare le perdite economiche e potrebbe risolvere l'intero problema della fame nel mondo. In tale contesto, i processi di deterioramento dei prodotti alimentari, che comportano un'alterazione delle caratteristiche organolettiche attraverso modifiche sia chimiche che biologiche, stanno assumendo un'importanza rilevante a livello mondiale e necessitano di interventi risolutivi immediati [195].

Oltre al mantenimento del requisito di qualità, si fa sempre più sentito il bisogno di preservare il cibo in termini di sicurezza. Infatti, secondo stime recenti, le infezioni operate da microrganismi resistenti agli antibiotici sono responsabili ogni anno di più di 700.000 decessi e tale numero sembra essere destinato a crescere ulteriormente. Per tal motivo, organismi internazionali, quali l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) e il POST (Ufficio Parlamentare della Scienza e della Tecnologia), sono impegnati attivamente nella ricerca di soluzioni per frenare l'avanzata di questa emergenza mondiale. Tra gli approcci attualmente adottati, grande interesse è rivolto allo sviluppo di nuovi antimicrobici e terapie antimicrobiche alternative. Nel grande fermento della ricerca su questa categoria di composti si inserisce il mio progetto di dottorato, che ha avuto come uno degli obiettivi principali, lo studio delle *performance* sia in termini di stabilità strutturale che di attività antimicrobica, di due piccoli peptidi progettati *in silico* denominati MTP1 e 1018-K6. A fronte di una comparabile stabilità conformazionale mostrata da entrambe le molecole, la diversa capacità antimicrobica dei due peptidi verso i microrganismi sia patogeni che deterioranti impiegati in queste analisi, ha fornito ulteriori indicazioni su un loro potenziale utilizzo in miscela. L'evidenza che i peptidi mantenessero invariato il loro alto potenziale antimicrobico quando co-presenti nella formulazione, in aggiunta alla loro stabilità in determinate condizioni ambientali, come in presenza di un'elevata concentrazione salina, in cui si evidenzia un effetto di cooperazione positiva tra le due molecole come risulta per la Mix2, getta le basi per un potenziale impiego di tali soluzioni come possibili preservanti alimentari.

A seguito della valutazione della mancanza di tossicità su linee cellulari umane, i due biocomposti sia singolarmente che in miscela, sono stati impiegati per la messa a punto di una strategia di funzionalizzazione di uno dei più comuni polimeri di imballaggio alimentare, al fine di sviluppare un *packaging* antimicrobico. Nel campo della tecnologia alimentare, l'imballaggio innovativo rappresenta una soluzione emergente che può conferire numerosi vantaggi di conservazione su molti prodotti alimentari. I risultati di questo studio hanno dimostrato la potenziale applicabilità nel settore alimentare dei materiali polimerici funzionalizzati con peptidi antimicrobici, sulla base dell'evidente capacità di inibire la crescita di microrganismi deterioranti in prodotti alimentari altamente deperibili come la ricotta, diversi tagli di carne bovina e un prodotto del pescato che sono caratterizzati da una breve conservabilità. Durante la conservazione, tali alimenti sono soggetti a diversi cambiamenti qualitativi deteriorati, in particolare nella consistenza, nel colore e nel sapore, che ne limitano la 'vita commerciale'. Nello specifico, i risultati ottenuti hanno dimostrato che i polimeri funzionalizzati contribuiscono a preservare la qualità chimica e microbica delle suddette tipologie di prodotti alimentari durante la loro conservazione, prolungandone la data di scadenza. Pertanto, l'imballaggio attivo proposto può rappresentare un'opzione eccellente e promettente per aumentare la *shelf-life* di alimenti freschi grazie alle sue proprietà antimicrobiche, non tossiche e di riutilizzo, riducendo il verificarsi di malattie di origine alimentare.

Bibliografia

1. <https://www.epicentro.iss.it/alimentazione/sicurezza>
2. A. Cassini, S. Hathaway, A. Havelaar, M. Koopmans, K. Koutsoumanis, W. Messens, G. Muller-Seitz, B. Nørrung, Va. Rizzi and F. Scheutz. Microbiological risk assessment. doi: 10.2903/j.efsa.2016.s0507
3. WHO Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group. WHO Estimates of the global burden of foodborne diseases. (2007-2015). Geneva: World Health Organization, 2015.
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf?sequence=1.
4. European Food Safety Authority. “The European Union One Health 2019 Zoonoses Report”. EFSA Journal (2021). doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406
5. Olaimat AN., Holley R.A. “Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review”. Food Microbiol. (2012 Oct): 32(1):1-19. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.016.
6. Määttä J., Lehto M., Kuisma R., Kymäläinen H.R., Mäki M. “Microbiological quality of fresh-cut carrots and process waters”. J Food Prot. (2013 Ju): 76(7):1240-4. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-550
7. Bacon RT, Sofos JN (2003) Characteristics of Biological Hazards in Foods, In: Schmidt RH, Rodrick GE, Editors, *Food Safety Handbook*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 157–195.
8. Humphrey T, O’Brien S, Madsen M (2007) Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int J Food Microbiol* 117: 237–257.
9. Arun K. Bhunia Foodborne Microbial Pathogens Mechanisms and Pathogenesis Second Edition. Springer New York, 22 mag 2018
10. Schaffner N, Zumstein J, Parriaux A (2004) Factors influencing the bacteriological water quality in mountainous surface and groundwaters. *Acta Hydroch Hydrob* 32: 225–234.
11. Garcia A, Fox JG, Besser TE (2010) Zoonotic enterohemorrhagic *Eschericia coli*: A one health perspective. *ILAR J* 51: 221–232.
12. Jemmi T, Stephen R (2006) *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev Sci Tech* 25: 571–580.
13. Ghandhi M, Chikindas ML (2007) Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol* 113: 1–15.

14. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, et al. (2011) Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17: 7–15.
15. Buchanan RL, Goris LGM, Hayman MM, et al. (2017) A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75: 1–13.
16. Bacon RT, Sofos JN (2003) Characteristics of Biological Hazards in Foods, In: Schmidt RH, Rodrick GE, Editors, *Food Safety Handbook*, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 157–195.
17. FDA, Bad Bug Book, Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins, Second Edition, 2012. Available from: <https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/>.
18. CDC, Multistate Outbreak of *Salmonella* Bareilly and *Salmonella* Nchanga Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (Final Update), 2012. Available from: <https://www.cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/>.
19. Fitzgerald DJ, Stratford M, Gasson MJ, and Narbad A. 2005. Structure-function analysis of the vanillin molecule and its antifungal properties. *J Agr Food Chem* 53:1769–1775.
20. Hozbor MC, Saiz AI, Yeannes MI, and Fritz R. 2006. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudopercis semifasciata*). *Lwt-Food Sci Technol* 39:99–104.
21. Martin, N. H., Murphy, S. C., Ralyea, R. D., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2011). When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. *Journal of Dairy Science*, 94, 3176e3183
22. Ogier, J. C., Son, O., Gruss, A., Tailliez, P., & Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3691e3701.
23. Pisano, M. B., Scano, P., Murgia, A., Cosentino, S., & Caboni, P. (2016). Metabolomics and microbiological profile of Italian mozzarella cheese produced with buffalo and cow milk. *Food Chemistry*, 192, 618e624
24. Scatamburlo, T. M., Yamazi, A. K., Cavicchioli, V. Q., Pieri, F. A., & Nero, L. A. (2015). Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *Journal of Dairy Science*, 98, 759e764.
25. Caputo, L., Quintieri, L., Bianchi, D. M., Decastelli, L., Monaci, L., Visconti, A., et al. (2015). Pepsin-digested bovine lactoferrin prevents Mozzarella cheese blue discoloration caused by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Microbiology*, 46, 15e24.

26. Cenci-Goga, B. T., Karama, M., Sechi, P., Iulietto, M. F., Novelli, S., & Mattei, S. (2014). Evolution under different storage conditions of anomalous blue coloration of Mozzarella cheese intentionally contaminated with a pigment-producing strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Dairy Science*, 97, 6708e6718
27. Carrascosa, C., Millan, R., Jaber, J. R., Lupiola, P., del Rosario-Quintana, C., Mauricio, C., et al. (2015). Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Food Control*, 54, 95e102.
28. Cherif-Antar, A., Moussa-Boudjemaa, B., Didouh, N., Medjahdi, K., Mayo, B., & Florez, A. B. (2016). Diversity and bio film-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Science & Technology*, 96, 27e38.
29. Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D'Orio, V., Vergara, A., Conter, M., et al. (2008). Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 1552e1561.
30. Victoria OA, Tajudeen O I. Crystal Violet Binding Assay for Assessment of Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. on Wood, Steel and Glass Surfaces. *Global Veterinaria*. 2011;6(1):6-10.
31. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(2):95-108.
32. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2003;2(1):22-32.
33. Mogha KV, Shah NP, Prajapati JB, et al. Biofilm - A threat to dairy industry. *Indian J Dairy Sci*. 2014;67(6).
34. Nyenje ME, Odjadjare CE, Tanih NF, et al. Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: public health implications. *Int J Environ Res Public Health*. 2012;9(8):2608-19.
35. Marine C, Hernandiz A, Lainez M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poult Sci*. 2009;88(2):424-31.
36. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2012. Multistate Outbreak of *Salmonella* bareilly and *Salmonella* nchanga. Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (accessed, 02.10.12.). <http://www.cdc.gov/salmonella/bareilly-04-12/index.html>

37. Butt AA, Aldridge KE, Sanders CV. Infections related to the ingestion of seafood Part 1: viral and bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2004;4(4):201-12.
38. Shikongo-Nambabi MNN, Shoolongela A, Schneider M. Control of bacterial contamination during marine fish processing. *J Biol Life Sci.* 2012;3(1):1-17.
39. Flood JA, Ashbolt NJ. Virus-sized particles can be entrapped and concentrated one hundred fold within wetland biofilms. *Adv Environ Res.* 2000;3(4):403-11.
40. Food and Drug Administration (FDA). *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Aeromonas hydrophila.* 2013.
41. Aberoum A, Jooyandeh H. A review on occurrence and characterization of the *Aeromonas* species from marine fishes. *World J Fish Mar Sci.* 2010;2(6):2078e4589.
42. Grim CJ, Kozlova EV, Sha J, et al. Characterization of *Aeromonas hydrophila* wound pathotypes by comparative genomic and functional analyses of virulence genes. *MBio.* 2013;4(2): e00064 -13.
43. Blackstone GM, Nordstrom JL, Bowen MD et al. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay. *J Microbiol Methods.* 2007;68(2):254-9.
44. Suner J, Ross T. A semi-quantitative seafood safety risk assessment. *Int J Food Microbiol.* 2002;77(1-2):55-9.
45. Jahid IK, Han N, Ha SD. Inactivation kinetics of cold oxygen plasma depends on incubation conditions of *Aeromonas hydrophila* biofilm on lettuce. *Food Res Int.* 2014;55:181-9.
46. Limsowtin GKY, Powell IB. Milk quality for cheese making. *Aust J Dairy Technol.* 1996;51:98-100.
47. Sharma M, Anand SK, Prasad DN. In vitro propagation of mixed species biofilms using online consortia for dairy processing lines. *Milchwissenschaft.* 2003;58:270-273.
48. Salo S, Ehavald H, Raaska L et al. Microbial surveys in Estonian dairies. *LWT Food Sci Tech.* 2006;39(5):460-71.
49. Shaheen R, Svensson B, Andersson MA et al. Persistence strategies of *Bacillus cereus* spores isolated from dairy silotanks. *Food Microbiol.* 2010;27(3):347-55.
50. Malfeito-Ferreira, M. (2011). Yeasts and wine off-flavours: A technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61(1), 95–102. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0098-0>
51. Fröhlich-Wyder, M.-T., Arias-Roth, E., & Jakob, E. (2019). Cheese yeasts. *Yeast*, 36(3), 129–141. <https://doi.org/10.1002/yea.3368>
52. Sathe, S. J., Nawani, N. N., Dhakephalkar, P. K., & Kapadnis, B. P. (2007). Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *Journal of*

- Applied Microbiology, 103(6), 2622–2628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03525.x>
53. Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>
 54. Medina, L. M., & Jordano, R. (1993). Growth of fungal contamination in fermented milk containing bifidobacteria and *Lactobacillus addophtus*. *Journal of Food Quality*, 16 (6), 471–477. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.1993.tb00272.x>
 55. Roostita, R., & Fleet, G. H. (1996). Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology*, 31(1–3), 205–219. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)00999-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)00999-3)
 56. Gourama H, Bullerman LB, Bianchini A (2015). Toxigenic fungi and fungal toxins. In: Salfinger Y, Tortorello ML (eds) *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association, Washington, DC, pp 583–594
 57. Sanzani, S.M.; Reverberi, M.; Geisen, R. Mycotoxins in harvested fruits and vegetables: Insights in producing fungi, biological role, conducive conditions, and tools to manage postharvest contamination. *Postharvest Biol. Technol.* 2016, 122, 95–105.
 58. Rahman MS (eds). *Handbook of food preservation*. 2nd ed. Food science and technology. Boca Raton: CRC Press; 2007.
 59. Nummer BA. Historical origins of food preservation. 2002. http://nchfp.uga.edu/publications/nchfp/factsheets/food_pres_hist.html
 60. Blum D. Food that lasts forever, in *TIME Magazine*. 2012.
 61. Rahman R. Food preservation. 2014. http://en.banglapedia.org/index.php?title=Food_Preservation.
 62. Michael Davidson P, Sofos JN, Larry Branen A. *Antimicrobials in Food*, 3rd ed. Food Science and Technology. CRC Press; 2005
 63. Frank A, Paine HYP. *Food handbook of food packaging*. 2nd ed. New York: Springer; 1993.
 64. Mursalat M, Rony AH, Rahman AHMS, Islam MN, Khan MS. A critical analysis of artificial fruit ripening: Scientific, legislative and socio-economic aspects. *ChE Thoughts*. 2013;4(1):6–12
 65. De Man JM. *Principles of food chemistry*. 3rd ed. 1999, New York:Springer
 66. Cardoso LAC, Kanno KYF, Karp SG (2017b). Microbial production of carotenoids—A review. *Afr. J. Biotechnol.* 16(4):139-146

67. Zhang G, Ma Y (2013). Spectroscopic studies on the interaction of sodium benzoate, a food preservative, with calf thymus DNA. *Food Chem.* 141(1):41-47.
68. Toledo MCF, Tfouni SAV (2002). Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Cont.* 13(2):117-123.
69. Turkoglu S (2007). Genotoxicity of five preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutat. Res.* 626(1-2):4-14.
70. Varela P, Fiszman SM (2013). Exploring consumer's knowledge and perceptions of hydrocolloids used as food additives and ingredients. *Food Hydrocoll.* 30(1):477-484.
71. Adams MR, Moses MO. *Food microbiology*. 3rd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2008, p. 98–99.
72. Martyn, DM, McNulty, BA, Nugget, AP, Gibney MJ (2013). Food additives and preschool children. *Proc. Nutr. Soc.* 72(1):109-116
73. Pongsavee M (2015). Effect of sodium benzoate preservative on micronucleus induction, chromosome break, and Ala40Thr superoxide dismutase gene mutation in lymphocytes, *Biomed. Res. Int.* 2015:1-5.
74. Lennerz BS, Vafai SB, Delaney NF, Clish AB, Deik AA, Pierce KA, Ludwig DS, Mootha VK (2015). Effect of sodium benzoate, a widely used food preservative, on glucose homeostasis and metabolic profiles in humans. *Mol. Genet. Metab.* 114(1):73-79
75. Akintonwa A, Awodele O, Emeka PM, Osajare O (2007). The mutagenic potentials of potassium bromate and some commonly used food additives. *Afr. J. Biotechnol.* 6(8):1004-1006.
76. Di Sotto A, Maffei F, Hrelia P, Di Giacomo S, Pagano E, Borrelli F, Mazzanti G (2014). Genotoxicity assessment of some cosmetic and food additives. *Regul Toxicol Pharmacol.* 68:16-22.
77. Antunes SC, Nunes B, Rodrigues S, Nunes R, Fernandes J, Correia AT (2016). Effects of chronic exposure to benzalkonium chloride in *Oncorhynchus mykiss*: cholinergic neurotoxicity, oxidative stress, peroxidative damage and genotoxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 45:115-122.
78. Mellado-García P, Maisanaba S, Puerto M, Prieto AI, Marcos R, Pichardo S, Camean AM. In vitro toxicological assessment of an organosulfur compound from *Allium* extract: Cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity studies. *Food Chem. Toxicol.* 99:231- 240.
79. Ramalho VC, Jorge N (2006). Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Quím. Nova.* 29(4):755-760.
80. Berk Z. *Food process engineering and technology*. Food Science and Technology, 2nd ed. Academic Press; 2013.

81. Jay JM. Modern food microbiology. 6th ed. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000.
82. Rayaguru K, Routray W. Effect of drying conditions on drying kinetics and quality of aromatic *Pandanus amaryllifolius* leaves. J Food Sci Technol. 2010;47(6):668–73.
83. Agrahar-Murugkar D, Jha K. Effect of drying on nutritional and functional quality and electrophoretic pattern of soyflour from sprouted soybean (*Glycine max*). J Food Sci Technol. 2010;47(5):482–7.
84. Jangam SV, Law CL, Mjumder AS. Drying of foods, vegetables and fruits, vol. 1, 1st ed. Singapore; 2010.
85. Kutz M. Handbook of farm, dairy, and food machinery. 1st ed. New York: William Andrew; 2008.
86. Salvato JA, Nemerow NL, Agardy FJ. Environmental Engineering. 5th ed. New York: Wiley; 2003.
87. Bhat R, Alias AK, Paliyath G. Progress in food preservation. Hoboken: Wiley; 2012.
88. Sagar VR, Suresh P. Kumar, Recent advances in drying and dehydration of fruits and vegetables: a review. J Food Sci Technol. 2010;47(1):15–26.
89. Baker CGJ, Ranken MD, Kill RC. Food industries manual. 24th ed. New York: Springer; 1997.
90. Shenga E, Singh RP, Yadav AS. Effect of pasteurization of shell egg on its quality characteristics under ambient storage. J Food Sci Technol. 2010;47(4):420–5.
91. Laudan R. Food and nutrition: lifespan, human to pesticides. New York: Marshall Cavendish; 2009.
92. Cavazos-Garduño A, Serrano-Niño JC, Solís-Pacheco JR, Gutierrez- Padilla JA, González-Reynoso O, García HS, Aguilar-Uscanga BR. Effect of pasteurization, freeze-drying and spray drying on the fat globule and lipid profile of human milk. J Food Nutr Res. 2016;4(5):296–302.
93. Tamime AY. Dairy fats and related products. 1st ed. West Sussex: Wiley-Blackwell; 2009.
94. Rahman MS. Handbook of food preservation. 2nd ed. Boca Raton: Taylor and Francis; 2007.
95. Fellows PJ. Food processing technology: principles and practice. 3rd ed. Cambridge: Woodhead Publishing; 2009.
96. Drake MA, Drake S, Bodyfelt FW, Clark S, Costello M. The sensory evaluation of dairy products. 2nd ed. New York: Springer; 2008.
97. Indira V, Sudheer KP. Post Harvest technology of horticultural crops. In: Peter KV, editor. Horticulture science. New Delhi: New India Publishing Agency; 2007.

98. Ahvenainen, R. Active and intelligent packaging: an introduction. 2008, Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd.
99. PlasticsEurope. (2019a). Plastics – The Facts 2019. Available online at: https://www.plasticseurope.org/application/files/1115/7236/4388/FINAL_web_version_Plastics_the_facts2019_14102019.pdf (accessed December 13, 2019)
100. PlasticsEurope. (2019b). Plastics in Packaging. Available online at: <https://www.plasticseurope.org/en/about-plastics/packaging> (accessed December 13, 2019)
101. Kuorwel, K. K., Cran, M. J., Orbell, J. D., Buddhadasa, S., and Bigger, S. W. (2015). Review of mechanical properties, migration, and potential applications in active food packaging systems containing nanoclays and nanosilver. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safe.* 14, 411–430. doi: 10.1111/1541-4337.12139
102. Bassani, A., Montes, S., Jubete, E., Palenzuela, J., Sanjuan, A. P., and Spigno, G. (2019). Incorporation of waste orange peels extracts into PLA films. *Chem. Eng. Trans.* 74, 1063–1068. doi: 10.3303/CET1974178
103. Vermeiren, L., Devlieghere, F., and Debevere, J. (2002). Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Addit. Contam.* 19, 163–171. doi: 10.1080/02652030110104852
104. Brockgreitens, J., and Abbas, A. (2016). Responsive food packaging: recent progress and technological prospects. *Compr. Rev. Food Sci. Food Safe.* 15, 3–15. doi: 10.1111/1541-4337.12174
105. Cooksey K (2005) Effectiveness of antimicrobial food packaging materials. *Food Addit Contam* 22:980–987
106. Han, J. Ž2000.. Antimicrobial food packaging. *Food Technology*, 54Ž3., 56_65.
107. Zasloff, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002, 415, 389–395.
108. Hancock, R.E.; Sahl, H.G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24, 1551–1557.
109. Nguyen, L.T.; Haney, E.F.; Vogel, H.J. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends Biotechnol.* 2011, 29, 464–472.
110. Fjell, C.D.; Hiss, J.A.; Hancock, R.E.; Schneider, G. Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2012, 11, 37–51.
111. Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, 59(3), 181–196. <http://dx.doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>.

- 112.Hancock, R. E. W., & Scott, M. G. (2000). The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8856–8861. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.97.16.8856>.
- 113.Marr, A.K.; Gooderham, W.J.; Hancock, R.E. Antibacterial peptides for therapeutic use: Obstacles and realistic outlook. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006, 6, 468–472.
- 114.Mygind, P.H.; Fischer, R.L.; Schnorr, K.M.; Hansen, M.T.; Sonksen, C.P.; Ludvigsen, S.; Raventos, D.; Buskov, S.; Christensen, B.; De Maria, L.; et al. Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature* 2005, 437, 975–980.
- 115.van't Hof, W.; Veerman, E.C.; Helmerhorst, E.J.; Amerongen, A.V. Antimicrobial peptides: Properties and applicability. *Biol. Chem.* 2001, 382, 597–619.
- 116.Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2016). APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D1087–D1093. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv1278>.
- 117.Miltz, J., Rydlo, T., Mor, A., & Polyakov, V. (2006). Potency evaluation of a dermaseptin S4 derivative for antimicrobial food packaging applications. *Packaging Technology and Science*, 19(6), 345–354. <http://dx.doi.org/10.1002/pts.738>.
- 118.Bahar, A.A. & Ren, D. (2013) Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals*, 6, 1543–1575.
- 119.Tossi, A., Scocchi, M., Skerlavaj, B. & Gennaro, R. (1994) Identification and characterization of a primary antibacterial domain in CAP18, a lipopolysaccharide binding protein from rabbit leukocytes. *FEBS Letters*, 339, 108–112.
- 120.Chen, Y., Mant, C.T., Farmer, S.W., Hancock, R.E.W, Vasil, M.L. & Hodges, R.S. (2005) Rational design of α -helical antimicrobial peptides with enhanced activities and specificity/therapeutic index. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 12316–12329.
- 121.Zhu, X., Zhang, L., Wang, J., Ma, Z., Xu, W., Li, J. et al. (2015) Characterization of antimicrobial activity and mechanisms of low amphipathic peptides with different α -helical propensity. *Acta Biomaterialia*, 18, 155–167.
- 122.Oren Z. & Shai Y. (1997) Selective lysis of bacteria but not mammalian cells by diastereomers of melittin: structure–function study. *Biochemistry*, 36, 1826–1835.
- 123.Chen, Y., Vasil, A.I., Rehaume, L., Mant, C.T., Burns, J.L., Vasil, M.L. et al. (2006) Comparison of biophysical and biologic properties of α -helical enantiomeric antimicrobial peptides. *Chemical Biology & Drug Design*, 67, 162–173.
- 124.Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5449–5453.

125. Cruciani, R.A., Barker, J.L., Zasloff, M., Chen, H.-C. and Colamonici, O. (1991) Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 3792–3796.
126. Zasloff, M., Martin, B. and Chen, H.-C. (1988) Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 910–913.
127. Kumar, P., Kizhakkedathu, J.N. & Straus, S.K. (2018) Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8, 4.
128. Lee, T.H., N. Hall, K. & Aguilar, M.-I. (2016) Antimicrobial peptide structure and mechanism of action: a focus on the role of membrane structure. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 16, 25–39.
129. Edwards, I.A., Elliott, A.G., Kavanagh, A.M., Zuegg, J., Blaskovich, M.A. & Cooper, M.A. (2016) Contribution of amphipathicity and hydrophobicity to the antimicrobial activity and cytotoxicity of β -hairpin peptides. *ACS Infectious Diseases*, 2, 442–450.
130. Dong, H., Lv, Y., Zhao, D., Barrow, P. & Zhou, X. (2016) Defensins: the case for their use against mycobacterial infections. *Journal of Immunology Research*, 2016, 1–9.
131. Conibear A.C., Rosengren K.J., Harvey P.J. & Craik D.J. (2012) Structural characterization of the cyclic cystine ladder motif of θ -defensins. *Biochemistry*, 51, 9718–9726.
132. Conibear, A.C., Rosengren, K.J., Daly, N.L., Henriques, S.T. & Craik, D.J. (2013) The cyclic cystine ladder in θ -defensins is important for structure and stability, but not antibacterial activity. *Journal of Biological Chemistry*, 288(15), 10830–10840.
133. Falanga, A., Nigro, E., De Biasi, M.G., Daniele, A., Morelli, G., Galdiero, S. et al. (2017) Cyclic peptides as novel therapeutic microbicides: engineering of human defensin mimetics. *Molecules*, 22, 1217.
134. Wang, W., Cole, A.M., Hong, T., Waring, A.J. & Lehrer, R.I. (2003) Retrocyclin, an antiretroviral θ -defensin, is a lectin. *The Journal of Immunology*, 170, 4708–4716.
135. Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Menez, A. & Toma, F. (1991) Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science*, 254, 1521–1523.
136. Zhu S. & Gao B., Tytgat J. (2005) Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CS $\alpha\beta$ superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 2257–2269.
137. De Oliveira Dias, R. & Franco, O.L. (2015) Cysteine-stabilized $\alpha\beta$ defensins: from a common fold to antibacterial activity. *Peptides*, 72, 64–72.

- 138.C. Sohrabi, A. Foster and A. Tavassoli, Methods for generating and screening libraries of genetically encoded cyclic peptides in drug discovery, *Nat. Rev. Chem.*, 2020, 4(2), 90–101.
- 139.D. J. Craik, Chemistry. Seamless proteins tie up their loose ends, *Science*, 2006, 311(5767), 1563–1564.6 A.
- 140.Angelini, et al., Bicyclic peptide inhibitor reveals large contact interface with a protease target, *ACS Chem. Biol.*, 2012, 7(5), 817–821.
- 141.A. T. Bockus, C. M. McEwen and R. S. Lokey, Form and function in cyclic peptide natural products: a pharmacokinetic perspective, *Curr. ToMed. Chem.*, 2013, 13(7), 821–836.
- 142.Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 491–511. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00056-05>.
- 143.Bechinger, B., & Lohner, K. (2006). Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758(9), 1529–1539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.07.001>.
- 144.Avci, F. G., Akbulut, B. S., & Ozkirimli, E. (2018). Membrane active peptides and their biophysical characterization. *Biomolecules*, 8, 1–43. <https://doi.org/10.3390/biom8030077>
- 145.Ciumac, D., Gong, H., Hu, X., & Lu, J. R. (2019). Membrane targeting cationic antimicrobial peptides. *Journal of Colloid and Interface Science*, 537, 163–185. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.10.103>
- 146.Bocchinfuso, G., Palleschi, A., Orioni, B., Grande, G., Formaggio, F., Toniolo, C., ... Stella, L. (2009). Different mechanisms of action of antimicrobial peptides: Insights from fluorescence spectroscopy experiments and molecular dynamics simulations. *Journal of Peptide Science*, 15, 550–558. <https://doi.org/10.1002/psc.1144>
- 147.Kishore-Hazam, P., Goyal, R., & Ramakrishnan, V. (2019). Peptide based antimicrobials: Design strategies and therapeutic potential. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 142, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.08.006>
- 148.Carneiro VA, Duarte HS, Prado MG, Silva ML, Teixeira M, dos Santos YM, Vasconcelos IB, Cunha RMS (2015) Antimicrobial peptides: from synthesis to clinical perspectives. In: Méndez- Vilas A (ed) *The battle against microbial pathogens: basic science, technological advances and educational programs*, 1st edn. Formatex Research Center, Spain, pp 81–90
- 149.Hazam, P.K., Goyal, R. & Ramakrishnan, V. (2018) Peptide based antimicrobials: design strategies and therapeutic potential. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 142, 10–22.
- 150.Brogden K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238–250.

151. Gagnon, M.G., Roy, R.N., Lomakin, I.B., Florin, T., Mankin, A.S. & Steitz, T.A. (2016) Structures of proline-rich peptides bound to the ribosome reveal a common mechanism of protein synthesis inhibition. *Nucleic Acids Research*, 44, 2439–2450.
152. Mardirossian, M., Péréaskine, N., Benincasa, M., Gambato, S., Hofmann, S., Huter, P. et al. (2018). The dolphin proline-rich antimicrobial peptide Tur1A inhibits protein synthesis by targeting the bacterial ribosome. *Cell Chemical Biology*, 25, 530–539.
153. Park, C.B., Kim, H.S. & Kim, S.C. (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 244, 253–257.
154. Otvos, L., O, I., Rogers, M.E., Consolvo, P.J., Condie, B.A., Lovas, S. et al. (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry*, 39, 14150–14159.
155. Pane, K., Durante, L., Crescenzi, O., Cafaro, V., Pizzo, E., Varcamonti, M., Zanfardino A., Izzo V., Di Donato A., Notomista, E. (2017). Antimicrobial potency of cationic antimicrobial peptides can be predicted from their amino acid composition: Application to the detection of “cryptic” antimicrobial peptides. *Journal of Theoretical Biology*, 419, 254–265. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.02.012>
156. Fjell, C. D., Hiss, J. A., Hancock, R. E. W., & Schneider, G. (2012). Designing antimicrobial peptides: Form follows function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11, 37–51. <https://doi.org/10.1038/nrd3591>
157. Jindal, M. H., Le, C. F., Mohd Yusof, M. Y., & Sekaran, S. D. (2014). Net charge, hydrophobicity and specific amino acids contribute to the activity of antimicrobial peptides. *Journal of Health and Translational Medicine*, 17, 1–7. <https://doi.org/10.22452/jummecc.vol17no1.1>
158. Liu, Y., Du, Q., Ma, C., Xi, X., Wang, L., Zhou, M., Wang, H. (2019). Structure– activity relationship of an antimicrobial peptide, phylloseptin- PHa: Balance of hydrophobicity and charge determines the selectivity of bioactivities. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 447–458. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S191072>
159. Zhong, C., Zhu, N., Zhu, Y., Liu, T., Gou, S., Xie, J., Ni, J. (2020). Antimicrobial peptides conjugated with fatty acids on the side chain of Damino acid promises antimicrobial potency against multidrug-resistant bacteria. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 141, 105123. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2019.105123>
160. Ji, S., Li, W., Zhang, L., Zhang, Y., & Cao, B. (2014). Cecropin A-melittin mutant with improved proteolytic stability and enhanced antimicrobial activity against bacteria and

- fungi associated with gastroenteritis in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451, 650–655. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.08.044>
161. Tan, P., Lai, Z., Zhu, Y., Shao, C., Akhtar, M. U., Li, W., Shan, A. (2020). Multiple strategy optimization of specifically targeted antimicrobial peptide based on structure–activity relationships to enhance bactericidal efficiency. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 6, 398–414. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b00937>
 162. Lyu, Y., Yang, Y., Lyu, X., Dong, N., & Shan, A. (2016). Antimicrobial activity, improved cell selectivity and mode of action of short PMAP- 36-derived peptides against bacteria and *Candida*. *Scientific Reports*, 6, 27258. <https://doi.org/10.1038/srep27258>
 163. Strøm, M. B., Rekdal, Ø., & Svendsen, J. S. (2002b). The effects of charge and lipophilicity on the antibacterial activity of undecapeptides derived from bovine lactoferricin. *Journal of Peptide Science*, 8, 36–43. <https://doi.org/10.1002/psc.365>
 164. Wrede, P. & Schneider, G. (eds) *Concepts in Protein Engineering and Design* 281–317 (Walter-de-Gruyter, Berlin, New York, 1994).
 165. Schneider, G., Schuchhardt, J. & Wrede, P. Artificial neural networks and simulated molecular evolution are potential tools for sequence-oriented protein design. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 635–645 (1994).
 166. Mátyus, E., Kandt, C. & Tieleman, D. P. Computer simulation of antimicrobial peptides. *Curr. Med.*
 167. Ambrosio, R. L.; Smaldone, G.; Di Paolo, M.; Vollano, L.; Ceruso, M.; Anastasio, A.; Marrone, R. Effects of Different Levels of Inclusion of Apulo-Calabrese Pig Meat on Microbiological, Physicochemical and Rheological Parameters of Salami during Ripening. *Animals* 2021, 11(11), 3060.
 168. Conway, E. J.; Byrne, A. An absorption apparatus for the micro-determination of certain volatile substances: The micro-determination of ammonia. *Biochem. J.* 1933, 27(2), 419.
 169. Angiolillo, L.; Conte, A.; Del Nobile, M.A. A new method to bio-preserve sea bass fillets. *Int. J. Food Microbiol.* 2018, 271, 60–66
 170. Loralyn H., Ledenbach and Robert T. Marshal, (2009) “Microbiological Spoilage of Dairy Products”. *Food Microbiology and Food Safety*, DOI 10.1007/978-1-4419-0826-1_2.
 171. Fuselli F., A. Deluca, E. A. Montepeloso, G. Ibba, F. Tidona, L. Longo, R. M. Marianella, (2014) “Detection of fraudulent addition of bovine whey in water buffalo ricotta cheese by isoelectric focusing”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10.1002/jsfa.7019.
 172. Dainty, R.H., and Mackey, B.M. (1992). The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement*, 73, 103S-114S.

- 173.Orefice L. Contaminazione microbiologica dei prodotti ittici. In: Stacchini A (Ed.). Contaminazione chimica e biologica dei prodotti della pesca. Roma, Istituto Superiore di Sanità; 1997. (Rapporti Istisan, 97/5). p. 22-36.
- 174.Merlo, T.C.; Contreras-Castillo, C.J.; Saldana, E.; Barancelli, G.V.; Dargelio, M.D.B.; Yoshida, C.M.P.; Ribeiro Junior, E.E.; Massarioli, A.; Venturini, A.C. Incorporation of pink pepper residue extract into chitosan film combined with a modified atmosphere packaging: Effects on the shelf life of salmon fillets. *Food Res. Int.* 2019, 125, 108633.
- 175.Lerfall, J.; Bendiksen, E.A.; Olsen, J.V.; Østerlie, M. A comparative study of organic-versus conventional Atlantic Salmon. II. Fillet color, carotenoid- and fatty acid composition as affected by dry salting, cold smoking and storage. *Aquaculture* 2015, 451, 369–376.
- 176.Bjerkeng, B. Carotenoid pigmentation of salmonid fishes–recent progress 1. In: *Avances en Nutricion Acuicola V Memorias del V. Simposium Internacional de Nutricion Acuicola*. Merida, Yucatan, Mexico, 19-22 November 2000., pp. 71-89.
- 177.Yeşilayer, N. Comparison of Flesh Colour Assessment Methods for Wild Brown Trout (*Salmo trutta macrostigma*), Farmed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Pak. J. Zool.* 2020, 3, 52.
- 178.Parlapani, F.F.; Haroutounian, S.A.; Nychas, G.J.E.; Boziaris, I.S. Microbiological spoilage and volatiles production of gutted European sea bass stored under air and commercial modified atmosphere package at 2 C. *Food Microbiol.* 2015, 50, 44-53.
- 179.Azizi-Lalabadi, M.; Rafiei, L.; Divband, B.; Ehsani, A. Active packaging for Salmon stored at refrigerator with Polypropylene nanocomposites containing 4A zeolite, ZnO nanoparticles, and green tea extract. *Food Sci. Nutr.* 2020, 8(12), 6445-6456.
- 180.Bramstedt, F.; Auerbach, M. The Spoilage of Fresh-Water Fish. In: *Fish as Food*, In: Borgstram, G. (Ed.), Academic Press Inc.: San Diego, 1961, vol. 1, pp. 613–637.
- 181.Jacquot, R. Organic Constituents of Fish and Other Aquatic Animal Foods. In: *Fish as Food*, In: Borgstram, G. (Ed.), Academic Press Inc., San Diego, 1961, vol. 1, pp. 145–209.
- 182.Jorgensen, L.V., Huss, H.H., Dalgaard, P., The effect of biogenic amine production by single bacterial cultures and metabiosis on cold-smoked salmon. *J. Appl. Microbiol.* 2000, 89, 920–934.
- 183.Rodrigues, M.J.; Ho, P.; Lopez-Caballero, M.E.; Vaz-Pires, P.; Nunes, M.L. Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials. *Food Microbiol.* 2003, 20, 471–481.
- 184.Commission Implementing Regulation (EU) 2019/627 of 15 March 2019 laying down uniform practical arrangements for the performance of official controls on products of animal origin intended for human consumption in accordance with Regulation (EU)

- 2017/625 of the European Parliament and of the Council and amending Commission Regulation (EC) No 2074/2005 as regards official controls, Off. J. Eur. Union L 131/51.
185. Dalgaard, P.; Gram, L.; Huss, H.H. Spoilage and shelf life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 1993, 19, 283-294.
 186. Boskou, G.; Debevere, J. Reduction of trimethylamine oxide by *Shewanella* spp. under modified atmospheres in vitro. *Food Microbiol.* 1997, 14, 543-553.
 187. Giménez, B.; Roncalés, P.; Beltrán, J.A. The effects of natural antioxidants and lighting conditions on the quality of salmon (*Salmo salar*) fillets packaged in modified atmosphere. *J. Sci. Food Agric.* 2005, 85, 1033-1040.
 188. Chung, S.W.C.; Chan, B.T.P. Trimethylamine oxide, dimethylamine, trimethylamine and formaldehyde levels in main traded fish species in Hong Kong. *Food Addit. Contam. Part B*, 2(1), 44-51.
 189. Shumilina, E.; Slizyte, R.; Mozuraityte, R.; Dykyy, A.; Stein, T.A.; Dikiy, A. Quality changes of salmon by-products during storage: Assessment and quantification by NMR. *Food Chem.* 2016, 211, 803-811.
 190. Raeisi, M.; Tajik, H.; Aliakbarlu, J.; Mirhosseini, S.H.; Hosseini, S.M.H. Effect of carboxymethyl cellulose-based coatings incorporated with *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and grape seed extract on the shelf life of rainbow trout fillets. *LWT-Food Sci. Technol.* 2015, 64(2), 898-904.
 191. Secci, G.; Parisi, G. From farm to fork: lipid oxidation in fish products. A review. *Ital. J. Anim. Sci.* 2016, 15(1), 124-136.
 192. Remya, S.; Mohan, C.O.; Bindu, J.; Sivaraman, G.K.; Venkateshwarlu, G.; Ravishankar, C.N. Effect of chitosan based active packaging film on the keeping quality of chilled stored barracuda fish. *J. Food Sci. Technol.* 2016, 53, 685-693.
 193. Prabhakar, P.K.; Vatsa, S.; Srivastav, P.P.; Pathak, S.S. A comprehensive review on freshness of fish and assessment: Analytical methods and recent innovations. *Food Res. Int.* 2020, 133, 109157.
 194. Rasekh, J.; Kramer, A.; Finch, R. Objective evaluation of canned tuna sensory quality. *J. Food Sci.* 1970, 35(4), 417-423.
 195. FAO. 2013 Think. Eat. Save. - Lanciata una campagna mondiale per ridurre i 1,3 miliardi di tonnellate di cibo che vanno sprecati ogni anno. Disponibile al <https://www.fao.org/news/story/it/item/168670/icode/>

Publicazioni

1. L De Stefano, I Rea, P Dardano, M Balestrieri, G Palmieri, **B Agrillo**, M Terracciano, M Battisti, A Cammarano and L Nicolais. Newer Technologies, Better Healthcare. (2019) BJSTR 14, 10787-10789
2. **B. Agrillo**, M. Balestrieri, M. Gogliettino, G. Palmieri, R. Moretta, Y.T.R. Proroga, I. Rea, A. Cornacchia, F. Capuano, G. Smaldone, L. De Stefano. Functionalized Polymeric Materials with Bio-Derived Antimicrobial Peptides for “Active” Packaging. IJMS (2019); 20(3). Pii:E601.
3. M. Gogliettino, M. Balestrieri, R.L. Ambrosio, A. Anastasio, G. Smaldone, Y.T.R. Proroga, R. Moretta, I. Rea, L. De Stefano, **B. Agrillo**, G. Palmieri. Extending the Shelf-Life of Meat and Dairy Products via PET-Modified Packaging Activated With the Antimicrobial Peptide MTP1. Front Microbiol. (2020). 10:2963.
4. **Agrillo B**, Proroga YTR, Gogliettino M, Balestrieri M, Tatè R, Nicolais L, Palmieri G. A Safe and Multitasking Antimicrobial Decapeptide: The Road from De Novo Design to Structural and Functional Characterization. Int J Mol Sci. 2020 Sep 22;21(18):6952. doi: 10.3390/ijms21186952.
5. Palmieri G, Cammarano A, **Agrillo B**, Proroga YT, Gogliettino M, Balestrieri M, De Stefano L, Battisti M, De Martino S, Mercurio ME, Cummaro A, Nicolais L. New antimicrobial devices to prevent waterborne diseases BJSTR 32 (2020). (2020) doi: 10.26717/BJSTR.2020.32.005219
6. L. Falcigno, G. D'Auria, G. Palmier, M. Gogliettino, **B. Agrillo**, R. Tatè, P. Dardano, L. Nicolais, M. Balestrieri. Key Physicochemical Determinants in the Antimicrobial Peptide RiLK1 Promote Amphipathic Structures. IJMS (2021); 22(18):10011. doi: 10.3390/ijms221810011.
7. R.L. Ambrosio, M. Gogliettino, **B. Agrillo**, Y.T.R. Proroga, M. Balestrieri, L. Gratio, D. Cristiano, G. Palmieri, A. Anastasio. An active peptide-based packaging system to improve fresh-ness and safety of fish products: a case study. Foods 2022, 11(3), 338. doi.org/10.3390/foods11030338