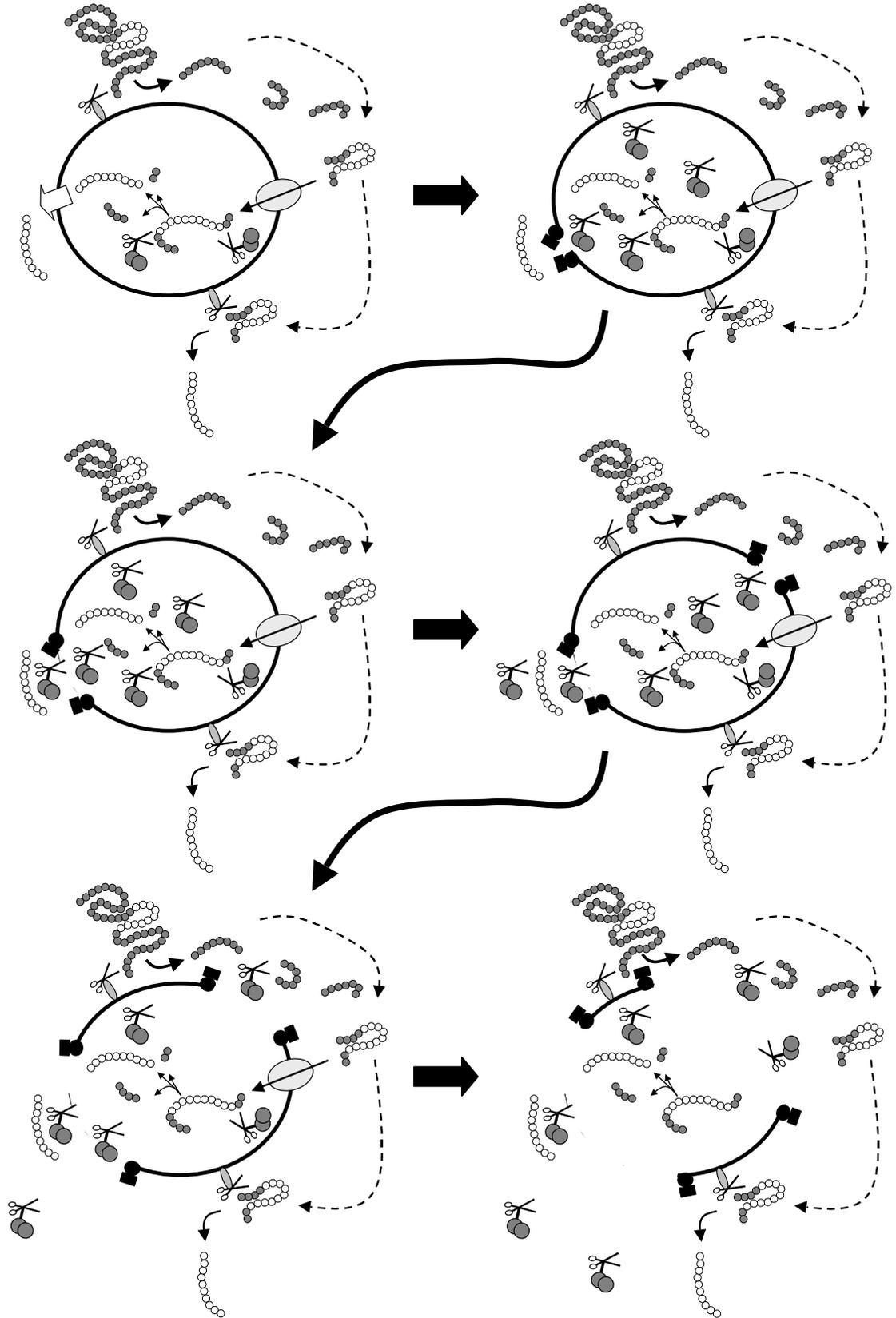
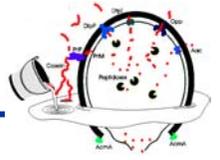
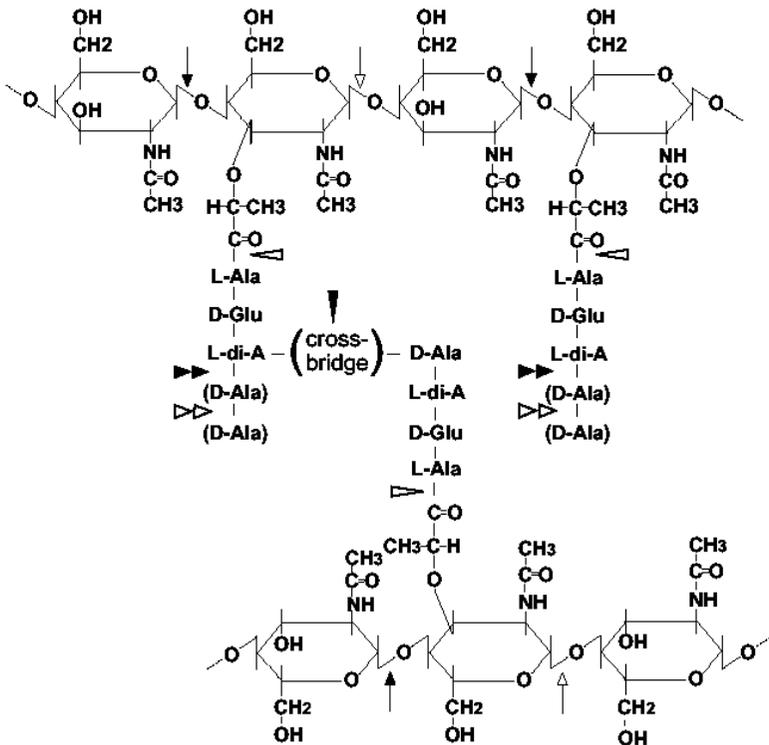
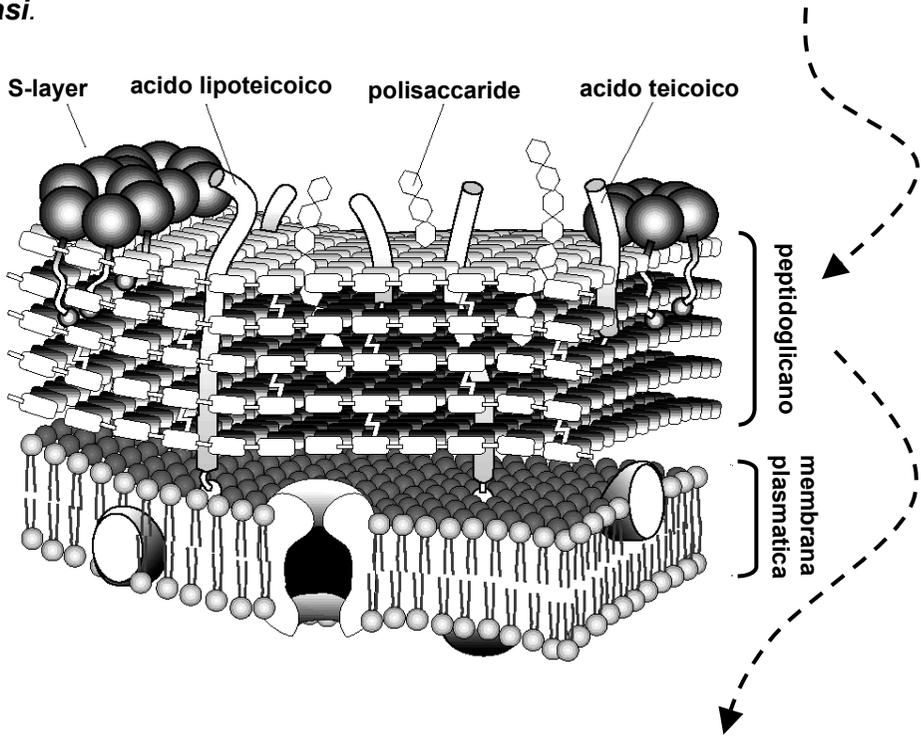


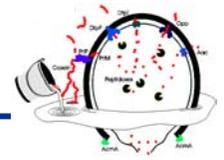
Il fenomeno dell'autolisi nei batteri lattici



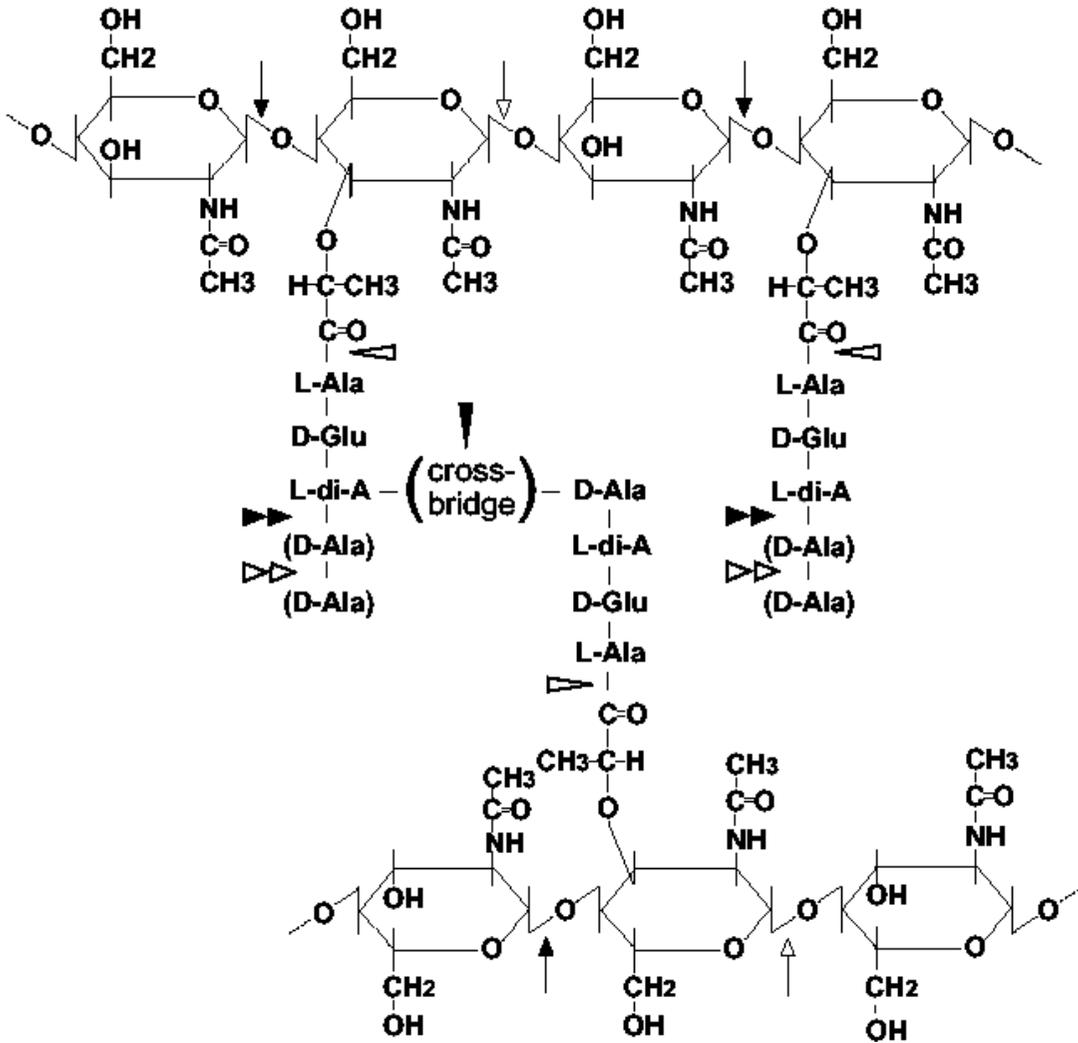


Gli enzimi responsabili del fenomeno autolitico e quindi della degradazione della parete cellulare vengono generalmente denominati **peptidoglicano idrolasi**.





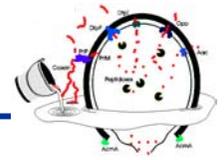
Con il nome di **peptidoglicano idrolasi** si raggruppano diverse classi di enzimi che svolgono la loro azione litica nei confronti della parete batterica.



—▷ N-acetilmuramidasi
 —▶ N-acetilglucosamidasi

▷ N-acetilmuramoil-L-alanil amidasi
 ▶ Endopeptidasi

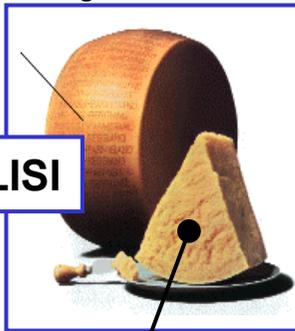
▷▷ D, D-carbossipeptidasi
 ▶▶ L, D-carbossipeptidasi



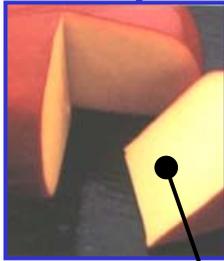
Emmental



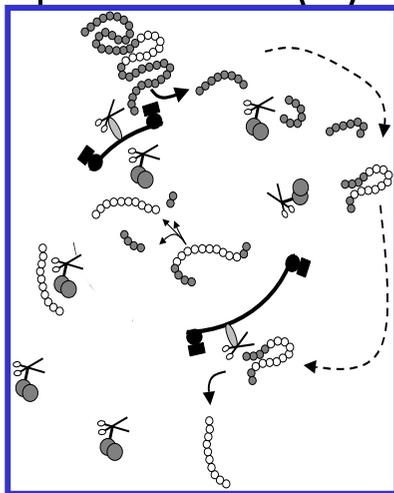
Parmigiano



AUTOLISI



Gouda



Processo di maturazione

- Sviluppo di aromi (liberazione nella matrice casearia di peptidasi e amminotransferasi);
- Effetti sullo sviluppo delle popolazioni batteriche presenti nella matrice casearia.

La durata del processo di maturazione

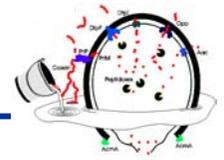
- è strettamente dipendente dall'entità del fenomeno autolitico e
- rappresenta per le aziende un "costo di produzione".

Proteasi e peptidasi e amminotransferasi

Degradazione della caseina ad opera della chimosina/rennina

Idrolisi di peptidi che generano sapori amari. Si tratta di peptidi derivati all'idrolisi della caseina a_{s1} che contengono aa idrofobici, Leu, Phe, Pro.

I principali componenti volatili dell'aroma dei formaggi sono aldeidi, acidi, alcoli, esteri e composti solforati che derivano da processi degradativi a carico di aminoacidi. Nei lattococchi caseari, la transaminazione rappresenta il primo step degradativo degli aa.



AcmA è l'autolisina principale di *Lactococcus lactis*

(Buist et al., 1995, *Journal of Bacteriology*, 177:1554-1563)

Il principale enzima responsabile dell'attività autolitica di *Lactococcus lactis* MG1363 è stato individuato in AcmA. AcmA è una N- acetilmuramidasi di 41.6 kDa. La costruzione di mutanti di delezione di AcmA ha evidenziato una forte riduzione della capacità autolitica nel ceppo MG1363acm Δ A1. Il perdurare di una residua ma significativa autolisi in questo ceppo suggerisce però la presenza di altre specie molecolari coinvolte nel processo di lisi.

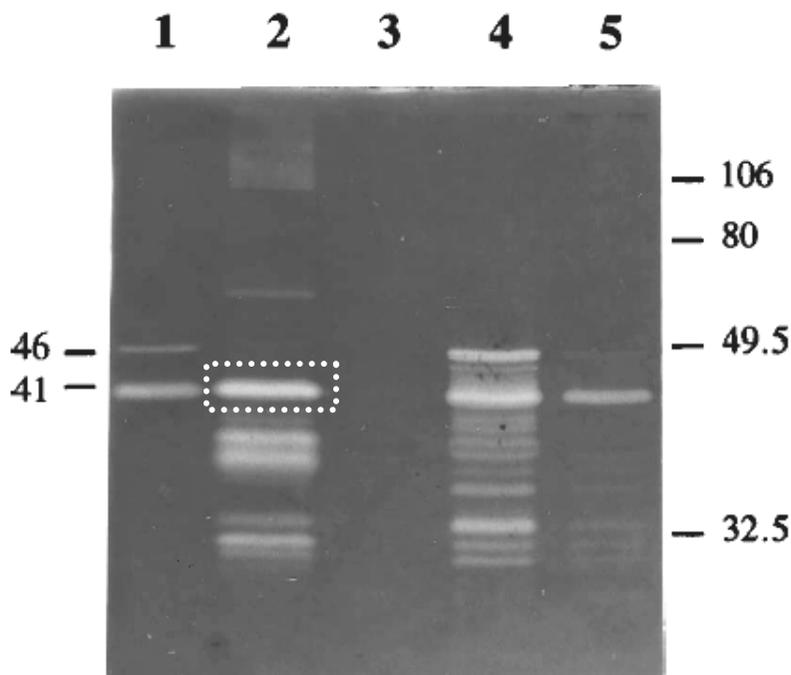
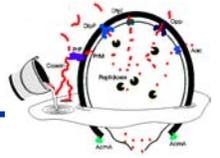
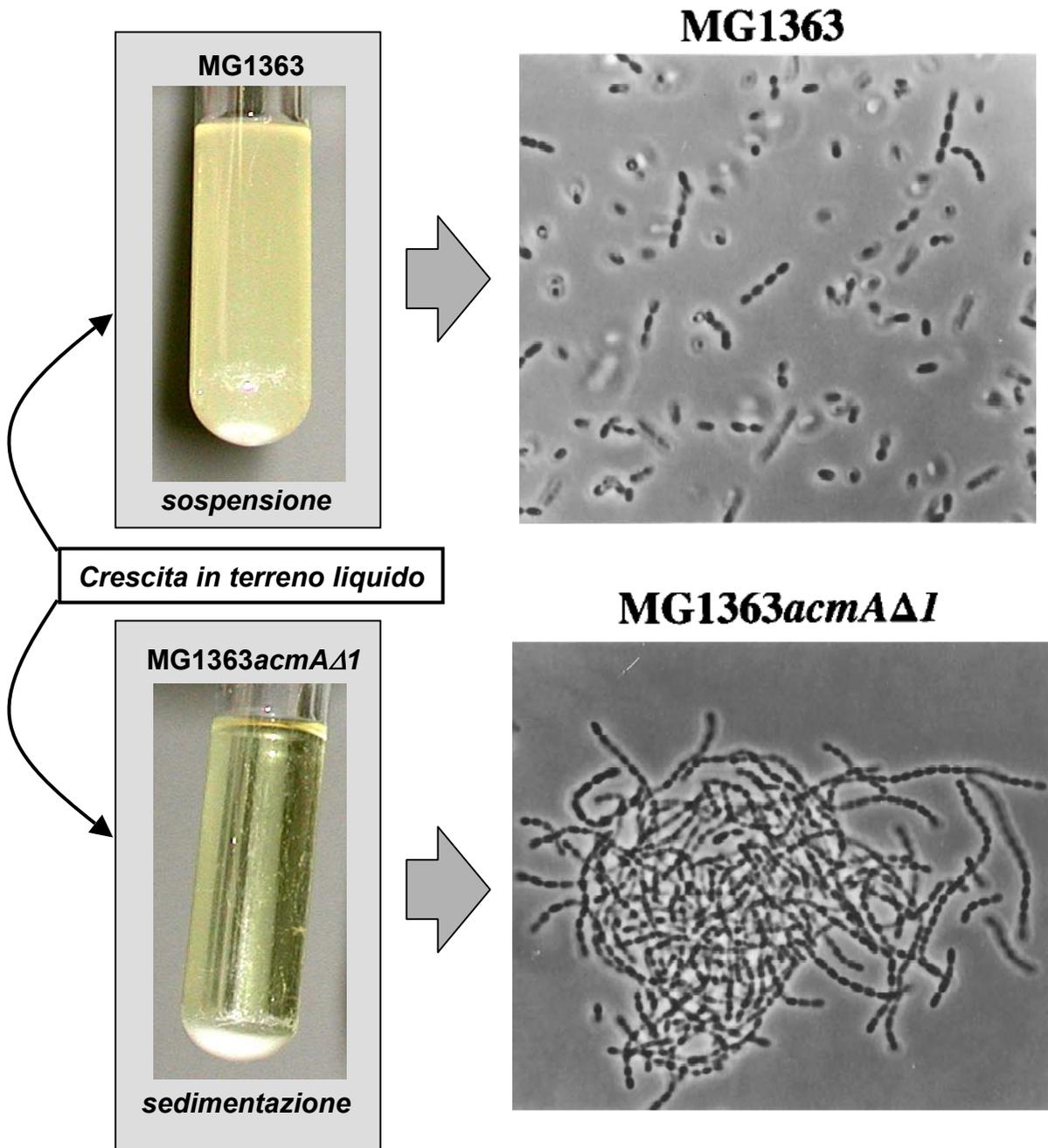
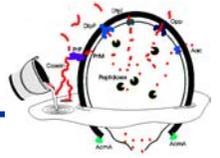


FIG. 2. Cell wall hydrolase activity in *E. coli* NM522 transformants by renaturing SDS-12.5% PAGE. The gel contained 0.2% (wt/vol) *M. lysodeikticus* autoclaved cells. Lanes: 1 and 2, cell extract and supernatant of *L. lactis* MG1363 grown in whey-based medium, respectively; 3, cell extract of *E. coli* NM522; 4 and 5, cell extracts of two independent *E. coli* NM522 transformants producing a halo on TY plates containing *M. lysodeikticus* autoclaved cells. Molecular masses (in kilodaltons) of standard proteins are shown on the right. Two lytic bands corresponding to sizes of 41 and 46 kDa are indicated on the left.



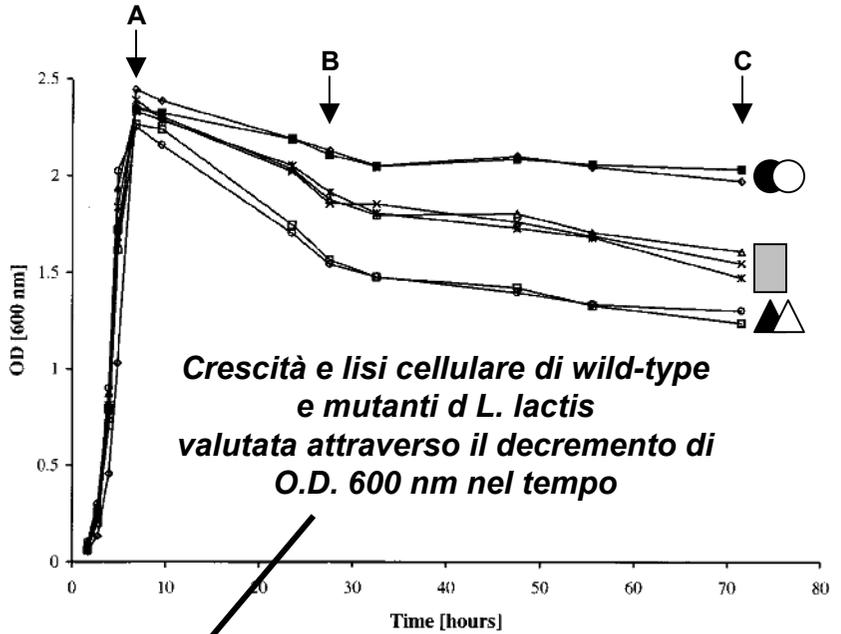
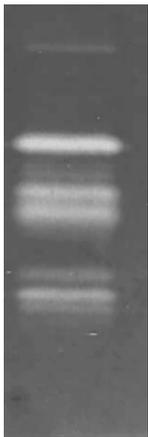
Nel ceppo MG1363acm Δ A1 l'assenza dell'autolisina AcmA ha messo in luce una considerevole modificazione morfologica di crescita, da catene corte a lunghe, suggerendo che AcmA rivesta un ruolo importante nel processo di divisione cellulare.



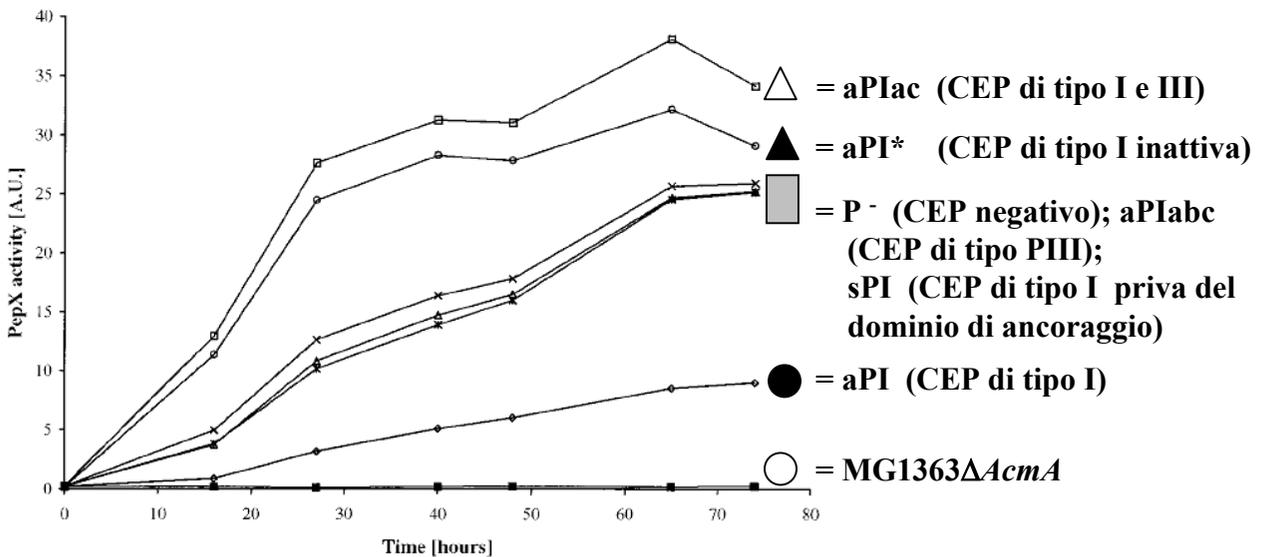


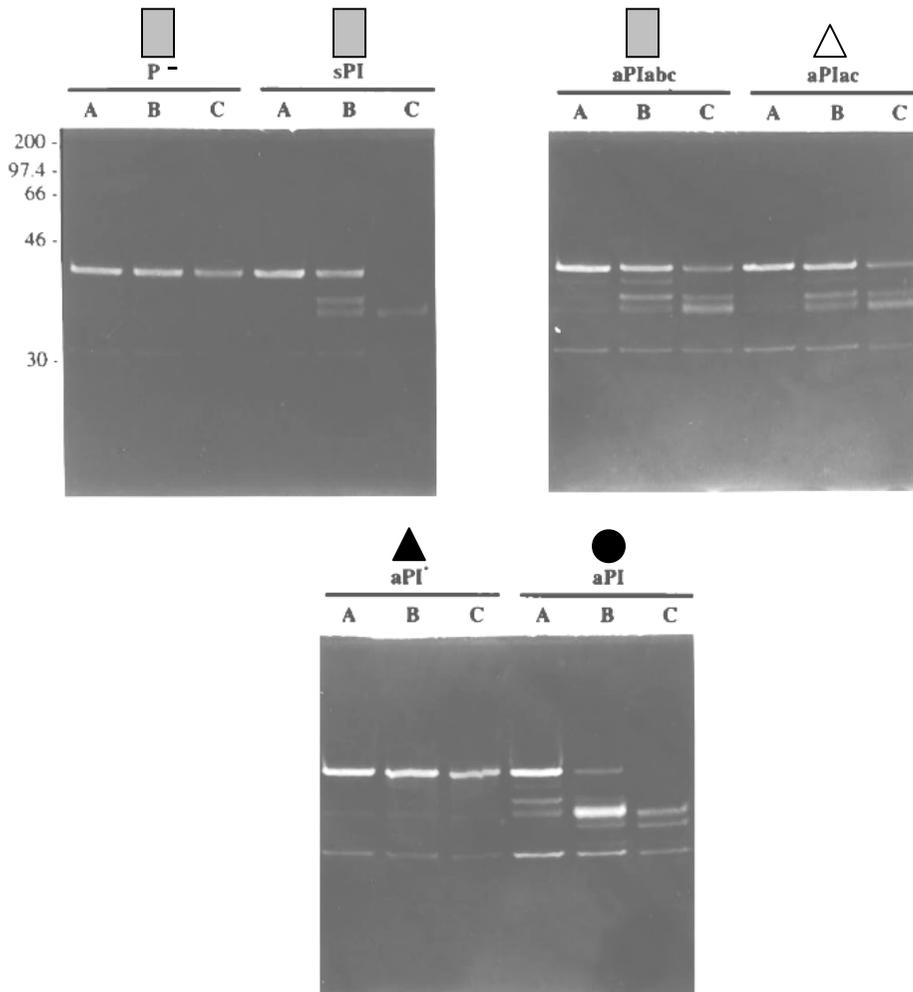
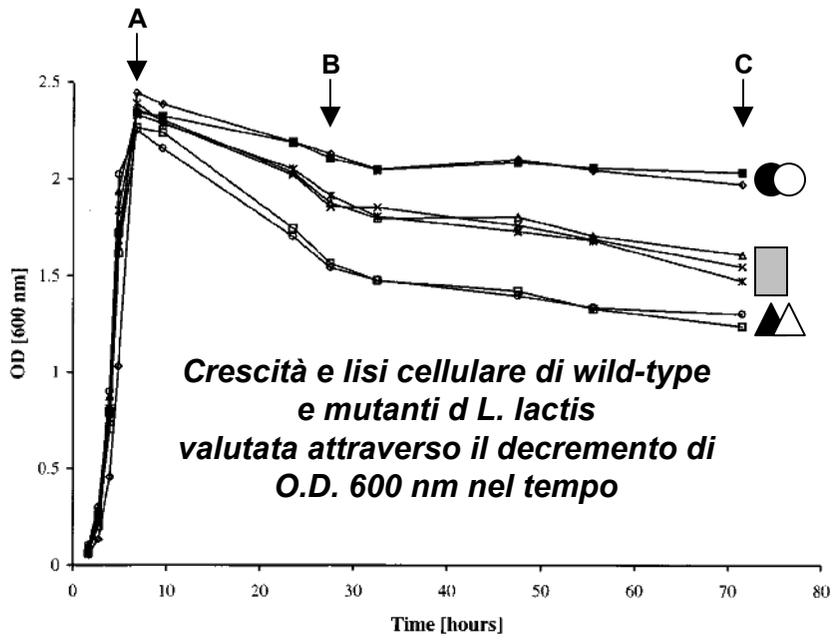
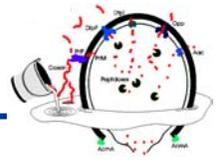
(Buist et al., 1995, *Journal of Bacteriology*, 180: 5947-5953)

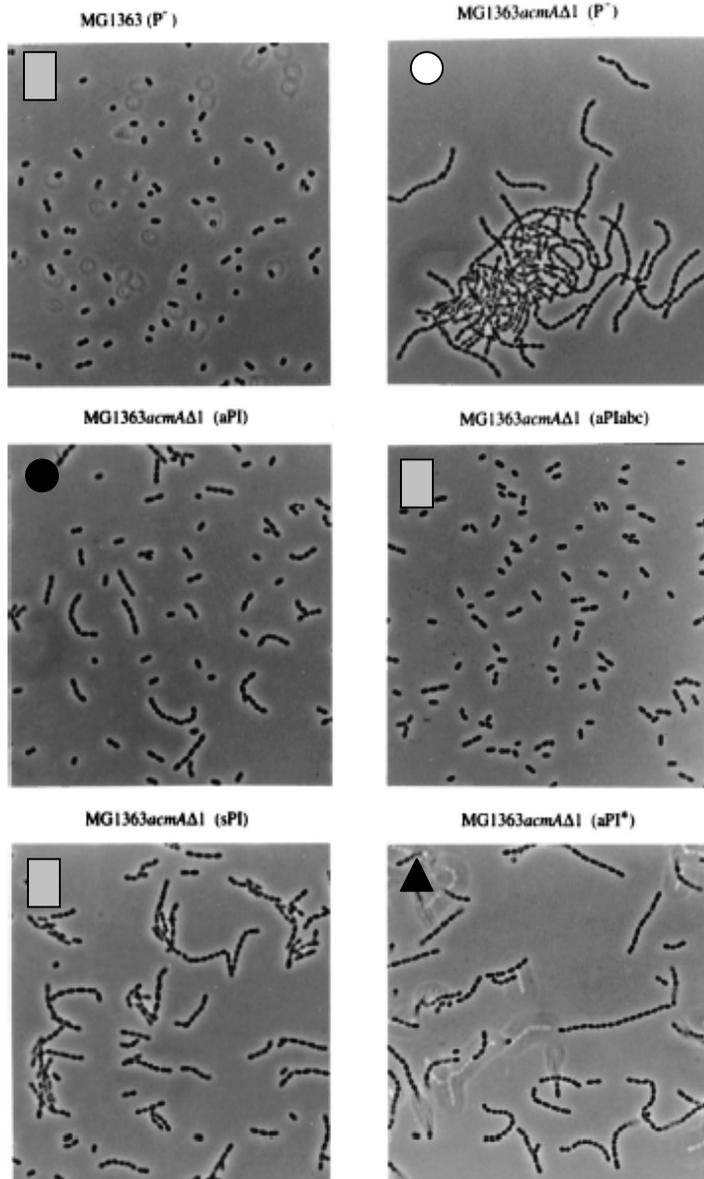
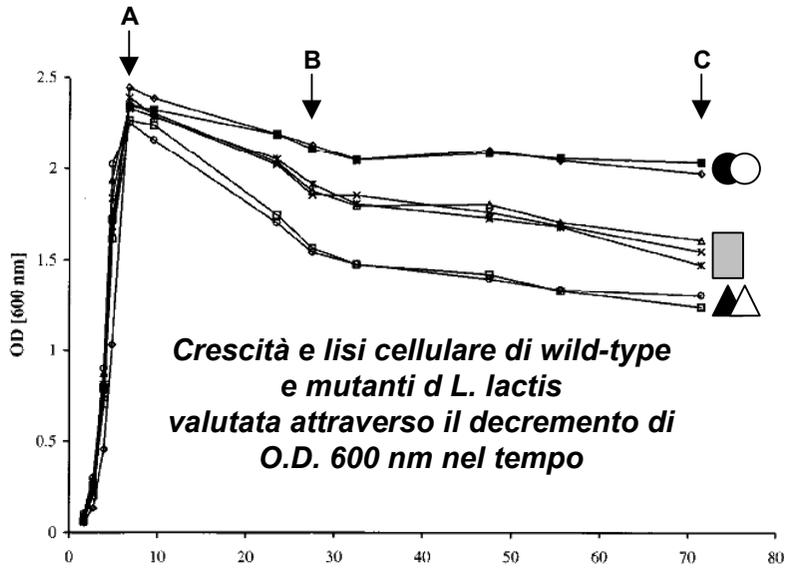
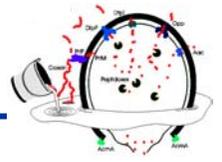
L'attività proteolitica di *L. lactis* può interferire con AcmA provocandone una parziale degradazione.

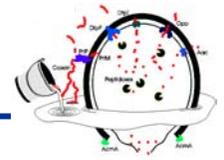


e contemporanea valutazione dell'attività di PepX









(Selvarani et al., 2000, *Journal of Dairy Research*, 67: 585-596)

Quando la valutazione comparativa della capacità autolitica e di quella proteolitica viene estesa a più ceppi di *L. lactis* la correlazione osservata precedentemente diventa meno evidente. L'elevata capacità autolitica di ceppi proteasi positivi e la limitata capacità autolitica di altri ceppi aventi le medesime caratteristiche proteolitiche ha rafforzato l'ipotesi che questa importante caratteristica tecnologica sia la risultante di più attività enzimatiche. In questo contesto va ricordato che l'analisi del genoma di *L. lactis* ha messo in evidenza la presenza di tre nuove potenziali peptidoglicano idrolasi oltre a *AcmA*, di cui una è stata recentemente descritta (*AcmB*).

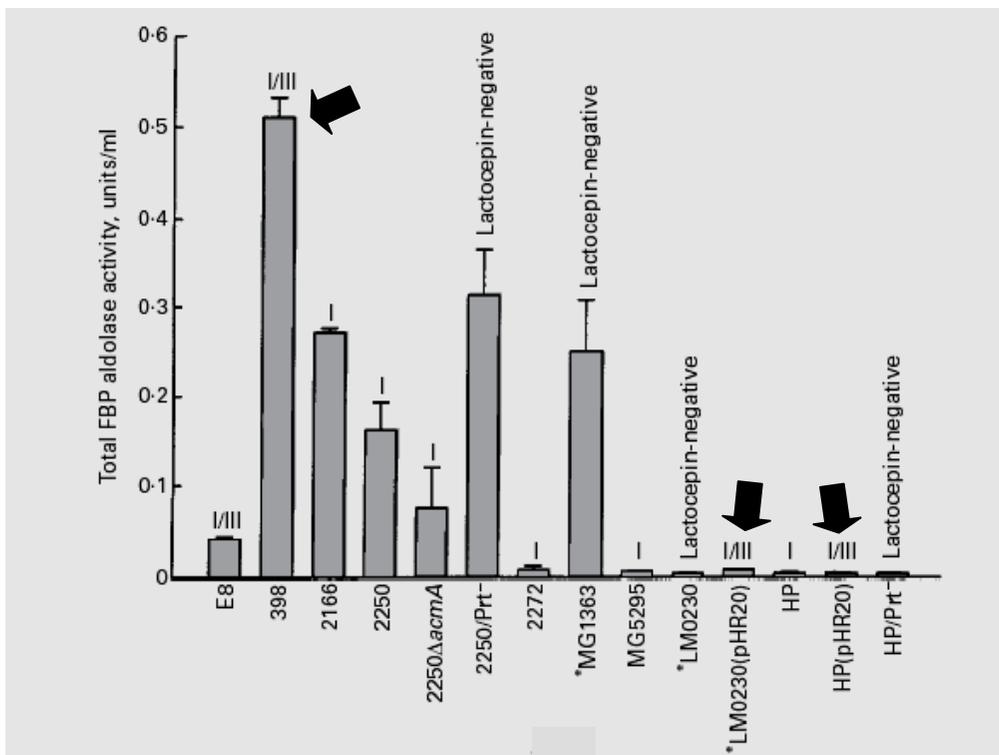
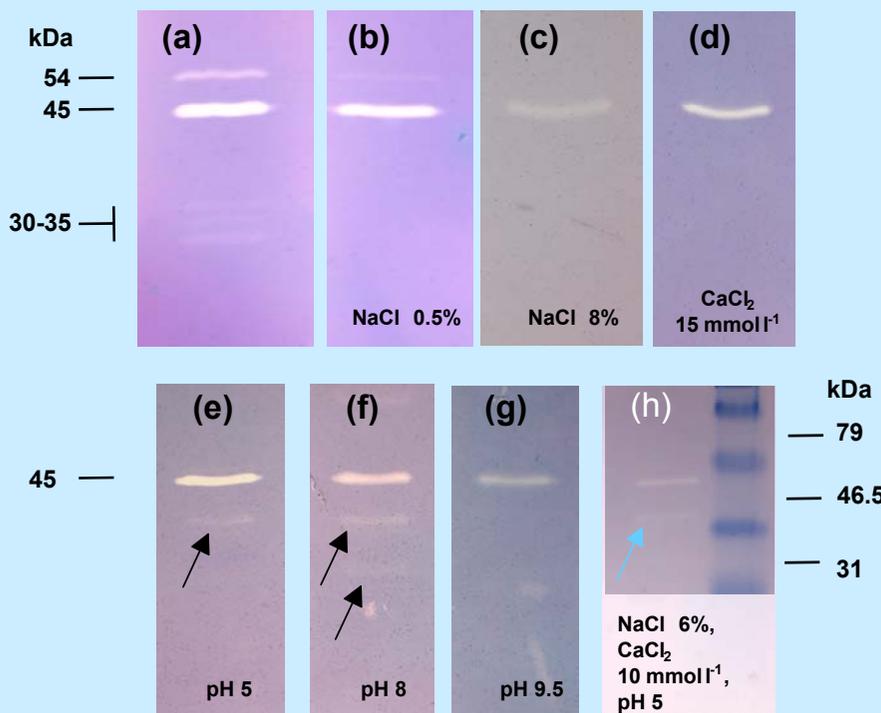
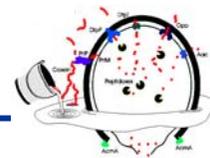
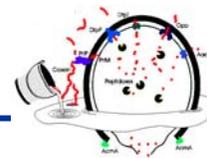


Fig. 1. Comparison of autolysis of six commercial *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* starter strains, two plasmid-free strains (MG1363 and LM0230) and derivatives listed in Table 1 after growth in milk for 72 h. Strains marked * are lactose-negative and were grown in milk with added glucose. The level of autolysis was measured by the release of the intracellular marker enzymes tagatose 1,6-bisphosphate aldolase and fructose 1,6-bisphosphate aldolase (Crow & Thomas, 1982) at 30 °C after 72 h. Values are means for three separate experiments with the SD indicated by vertical bars. Above each bar, the lactocepin specificity of each strain is indicated (see Table 1).



**Acma
rimane attiva
anche
in presenza
di alte
concentrazioni
saline e
in un range
ampio di pH**

L'attività di Acma ad elevate concentrazione saline mette in luce il suo potenziale intervento anche durante le fasi finali di stagionatura dei formaggi



(Husson-Kao et al., 2000, *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 558-565)

Il fenomeno dell'autolisi è stato studiato anche in *Streptococcus thermophilus*. Le ricerche sono state condotte su alcuni ceppi di questa specie che presentavano un particolare fenotipo di autolisi, cioè manifestavano dopo 5-6 ore di crescita, un rapido decremento della O.D. 600 nm solo quando crescevano alla temperatura di 42 °C in presenza di una concentrazione limitante di lattosio (0.5%) o elevata di NaCl₂.

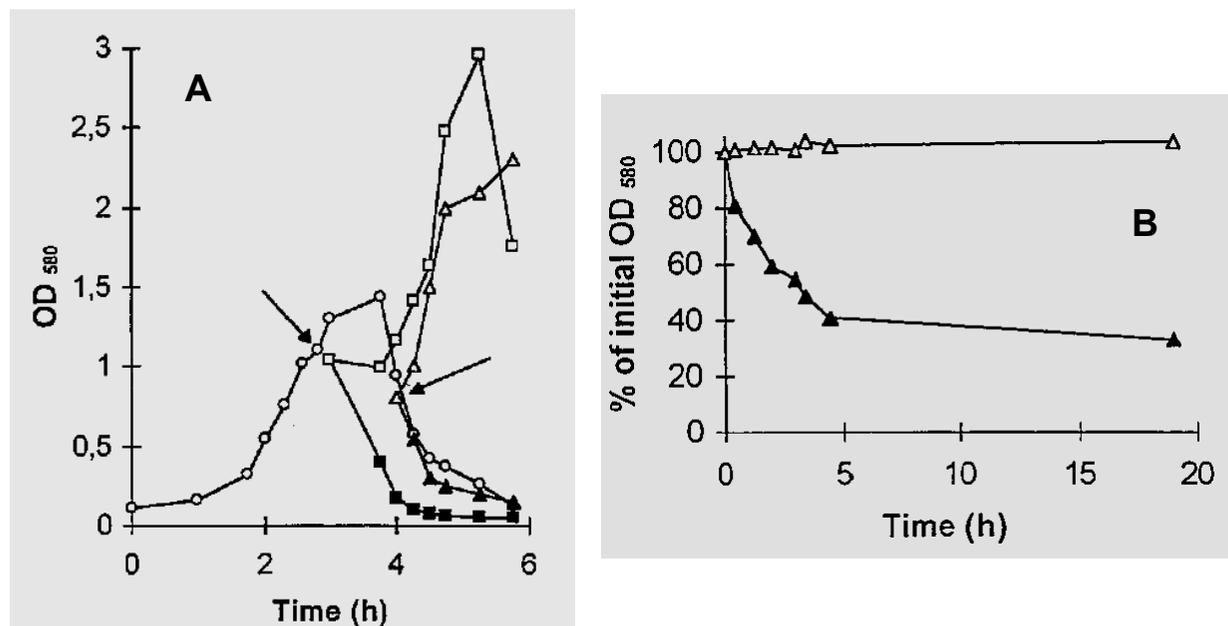


FIG. 1. Effect of lactose depletion on *S. thermophilus* DN-001065 lysis. (A) *S. thermophilus* DN-001065 was grown in M17 medium with 1% lactose at 42°C (○). Cells were harvested during the exponential-growth phase (□, ■) or during the lysing phase (△, ▲). They were resuspended in the same volume of fresh M17 medium with 0.5% lactose (□, △) or devoid of lactose (■, ▲) and further incubated at 42°C. Arrows indicate the times at which cells were harvested. (B) Cells were harvested at the beginning of the lysing phase, washed in distilled water at room temperature, and resuspended in the same volume of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.0, with 0.5% lactose (△) or devoid of lactose (▲). The cell suspensions were further incubated at 42°C.

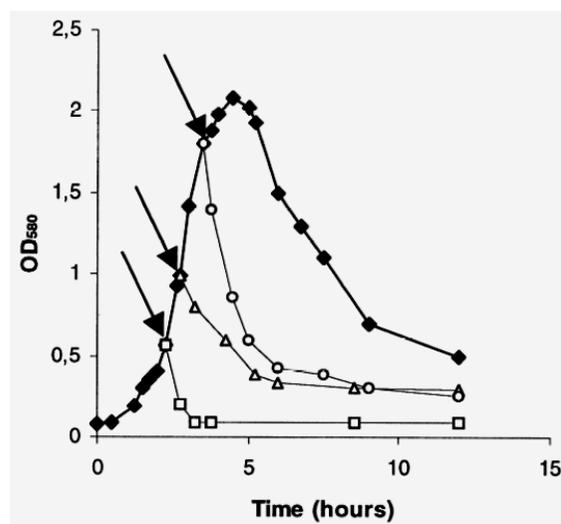
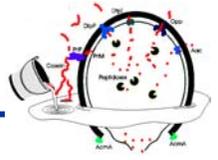
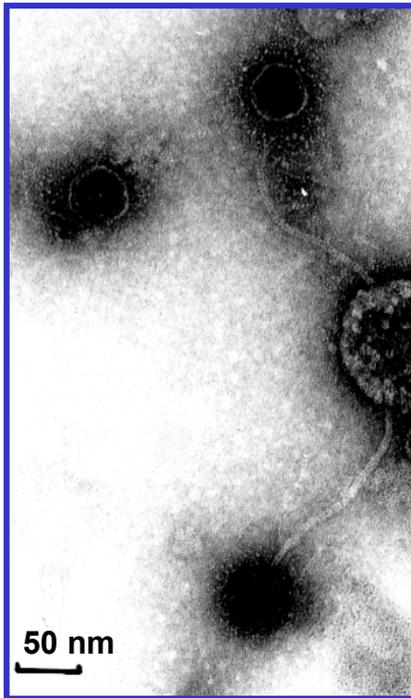


Fig. 3. Effect of NaCl on the growth of *S. thermophilus* CNRZ 1358. The strain was grown in M17 broth with 0.5% lactose (◆) and at the times indicated by arrows, NaCl was added at 2% final concentration (open symbols).



(Husson-Kao et al., 2000, *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 558-565)



*Particelle fagiche
liberate da
Streptococcus
thermophilus
DN-001065
dopo induzione da
mitomicina*

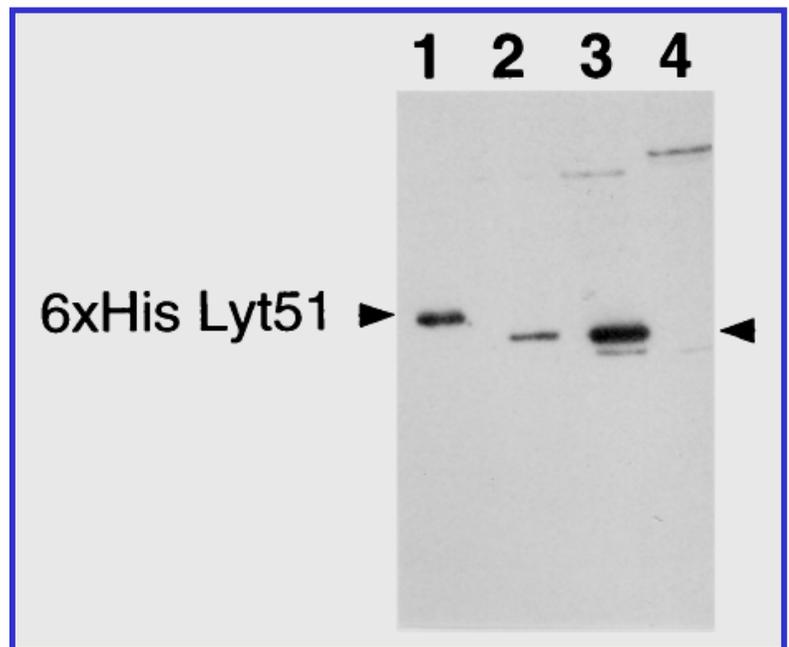
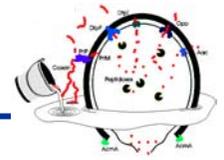


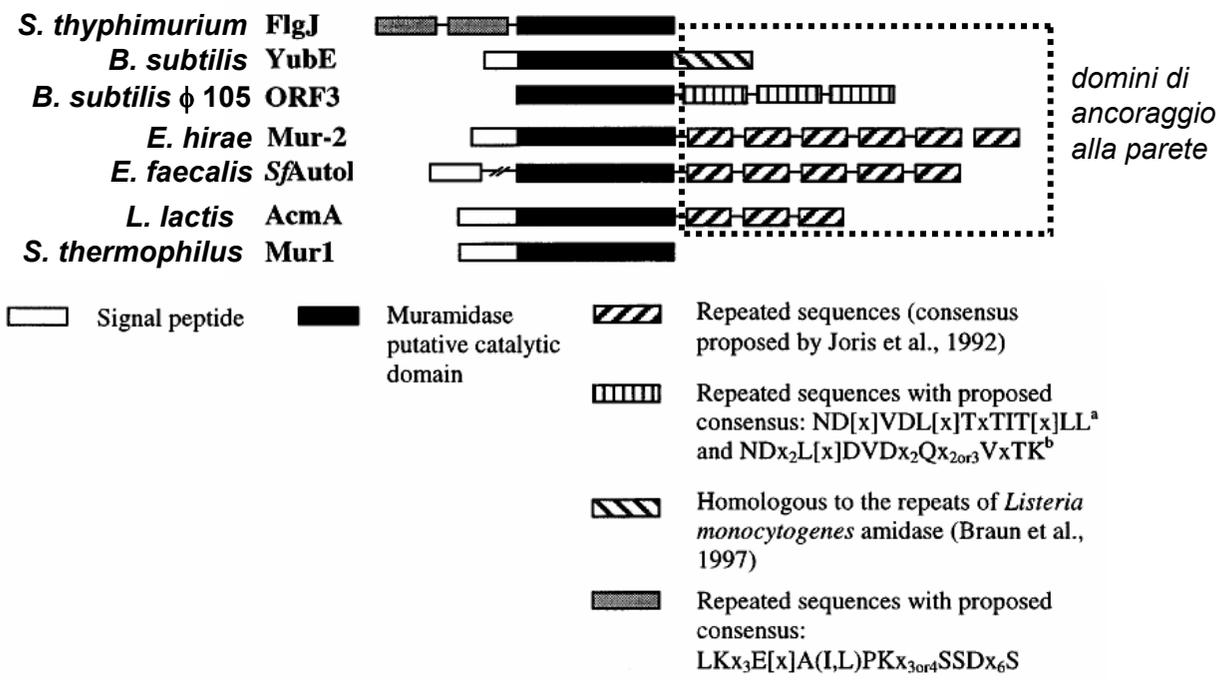
FIG. 7. Immunoblotting with anti-Lyt51 antibodies. Lane 1, purified six-His-tagged Lyt51; lane 2, DN-001065; lane 3, mitomycin C-induced DN-001065; lane 4, CNRZ 302. The SDS cell extracts were prepared 40 min after mitomycin C induction of strain DN-001065. For each cell extract, the same protein amount was transferred on a nitrocellulose membrane. The blot was incubated with the purified antibodies directed against the six-His-tagged Lyt51 and then with protein G coupled to horseradish peroxidase. Positions of the six-His-tagged Lyt51 and the 31-kDa protein reacting with the anti-Lyt51 antibodies are indicated by arrowheads.



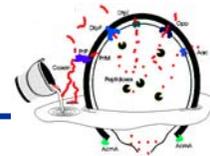
(Husson-Kao et al., 2000, FEMS Microbiology Letters, 187:69-76)

In conclusione si può affermare che il fenomeno autolitico osservato in alcuni ceppi di **Streptococcus thermophilus** è imputabile alla sintesi di un enzima fagico codificato dal genoma fagico integrato nel cromosoma batterico.

Studi più recenti hanno invece permesso di caratterizzare a livello genetico la muramidasi Murl di *S. thermophilus*. Si tratta di un enzima di 24.7 kDa associato alla parete cellulare che mostra un'elevata omologia amminoacidica con la regione contenente il sito catalitico di AcmA di *L. lactis* e di altre peptidoglicano idrolasi batteriche.

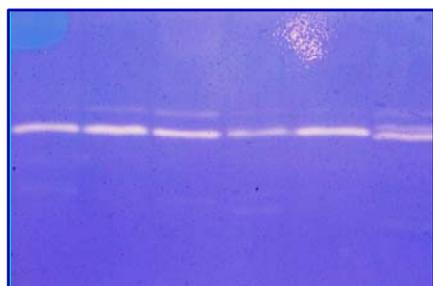


La peptidoglicano idrolasi Murl di *S. thermophilus* è caratterizzata da bassi livelli di espressione ed è visualizzabile solo attraverso a rilevamento con anticorpi specifici. Infatti, generalmente il livello di autolisi spontanea di *S. thermophilus* è modesto o addirittura nullo.



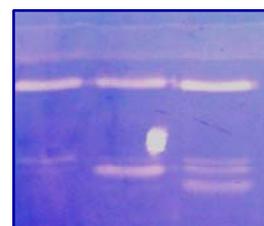
(Mercier et al., 2000, FEMS Microbiology Letters, 187:47-52)

In *L. lactis* è possibile rilevare AcmA anche nel mezzo colturale, ipotizzando un parziale rilascio dell'enzima dalla parete batterica su cui è normalmente ancorata quando svolge il suo ruolo fisiologico. Sulla base di questa osservazione è possibile ipotizzare l'azione litica di AcmA di *L. lactis* su altre specie batteriche presenti nelle popolazioni microbiche dei prodotti alimentari?



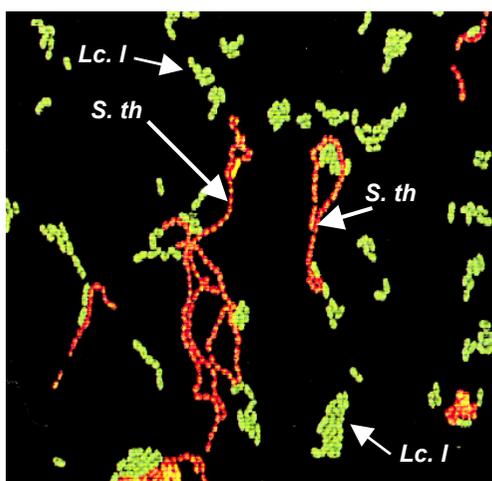
L. helveticus

AcmA è risultata attiva contro le cellule di *L. helveticus*, *L. delbrueckii* e *S. thermophilus* ... ma anche su cellule di *Listeria* e *Staphylococcus*

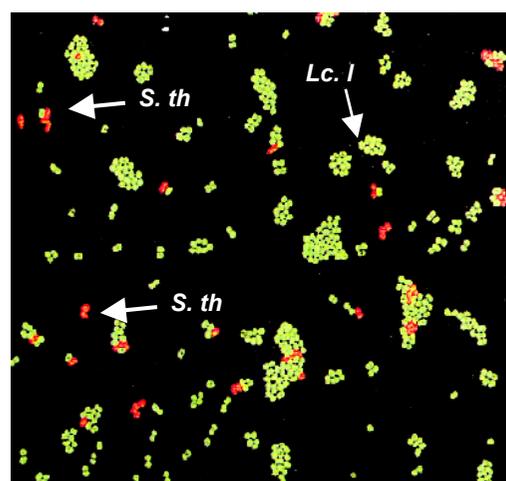


Listeria monocytogenes

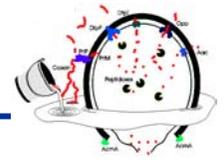
Esperimenti di co-coltura hanno evidenziato come AcmA di *Lactococcus lactis* sia responsabile della disgregazione delle catenelle di *Streptococcus thermophilus* dopo un'incubazione di 30 min a 37 °C.



Ibridazioni in situ con sonde a DNA specifiche marcati con due diverse molecole fluorescenti



L'azione "disgregante" di AcmA sulle catenelle di *S. thermophilus* può influire sul suo grado di sopravvivenza in una matrice colturale liquida. E' stato osservato che i ceppi di *S. thermophilus* in grado di formare catenelle, e quindi di sedimentare più efficacemente in un terreno liquido, sono più protette dall'ossigeno e rimangono di conseguenza più vitali.



(Deutsch et al., 2002, *International Dairy Journal*, 12:591-600)

Un fenomeno analogo a quello precedentemente descritto tra *L. lactis* e *S. thermophilus* è stato osservato tra *Lactobacillus helveticus* e *S. thermophilus* nella preparazione di formaggio svizzero tipo Emmental. In questo caso si osservava una forte diminuzione di vitalità di *S. thermophilus* quando questa specie era associata ad alcuni ceppi di *L. helveticus* lisogeni. L'azione di endolisine fagiche liberate da *L. helveticus* sulle cellule di *S. thermophilus* non è stata dimostrata in vitro ma sembra essere una delle spiegazioni più plausibili.

