

PRODOTTI LATTIERO-CASEARI FERMENTATI CON L'UTILIZZO DI MICRORGANISMI

PROBIOTICI E PROTETTIVI



Tatiana Dallo, Michela Centeleghe
Lattebusche, Latteria della Vallata Feltrina



Angiolella Lombardi, Giorgio Marcazzan, Antonio Cattelan, Christian Andrighetto
Veneto Agricoltura, Istituto per la Qualità e le Tecnologie Agroalimentari, Thiene (VI)

Obiettivi del progetto

1. Isolamento e selezione di microrganismi con caratteristiche probiotiche dal latte di raccolta proveniente dalla provincia di Belluno e dai corrispettivi formaggi
2. Impiego, nella produzione di formaggi, di colture di batteri lattici in grado di contrastare lo sviluppo di microrganismi indesiderati (colture protettive)
3. Ampliamento della gamma industriale di formaggi probiotici ottenuti con i microrganismi studiati nel corso di un precedente progetto Azione Biotech I

OBBIETTIVO 1

L'obiettivo della presente attività progettuale prevedeva la messa a punto di nuove colture probiotiche costituite da ceppi di batteri lattici isolati da latte e formaggi prodotti nella provincia di Belluno. L'isolamento di batteri lattici "probiotici" da formaggi può risultare interessante da un punto di vista applicativo in quanto questi microrganismi, essendo adattati alla matrice latte/formaggio, possono presentare caratteristiche tecnologiche adeguate per un loro impiego in caseificazione.

L'attività progettuale si è articolata nelle seguenti fasi operative:

- ✓ Isolamento di lattobacilli mesofili da campioni di latte e formaggio
- ✓ Identificazione molecolare dei ceppi e valutazione *in vitro* della capacità di superare la barriera gastro-intestinale (resistenza gastrica ed enterica, resistenza ai sali biliari)
- ✓ Studio di alcune caratteristiche probiotiche (attività antimicrobica, riduzione del colesterolo)
- ✓ Valutazione dello spettro di resistenza/sensibilità agli antibiotici
- ✓ Caratterizzazione tecnologica (crescita in latte, produzione di aromi ecc.)
- ✓ Selezione dei ceppi dotati delle caratteristiche migliori e loro impiego in caseificazioni sperimentali in laboratorio

RISULTATI

Dai campioni di latte e formaggio bellunesi sono stati isolati ed identificati mediante RAPD-PCR e sequenziamento del DNA 9 ceppi appartenenti alla specie *paracasei* nell'ambito della quale si possono trovare ceppi probiotici (Figura 1).

Sono stati scelti 5 ceppi sulla base della loro capacità di resistenza al transito gastrointestinale (valutata *in vitro*). Gli stessi sono stati quindi sottoposti a caratterizzazione probiotica (capacità di inibire microrganismi patogeni, capacità degradazione colesterolo) e tecnologica (Tabella 1).

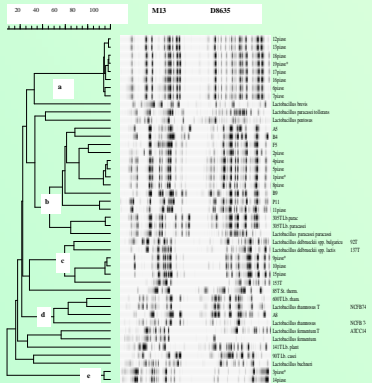


Figura 1. RAPD-PCR ceppi batterici lattici mesofili isolati

Isolata	Origine	Identificazione	Resistenza Succo gastrico	Resistenza Succo enterico	Resistenza bile bovina e bile umana
P 1*	Formaggio	Lb. paracasei	2,11	0	Resistente
P 2*	Formaggio	Lb. paracasei	2,52	0,29	Resistente
P 3*	Formaggio	Lb. paracasei	1,06	0,15	Resistente
P 11*	Formaggio	Lb. paracasei	> 3,33	0,06	Resistente
P 15*	Formaggio	Lb. paracasei	3,34	0	Resistente
Latte AS*	Latte	Lb. paracasei	> 3,15	0	Resistente
Latte AS*	Latte	Lb. paracasei	> 4	Non determ.	Non determ.
Latte AS*	Latte	Lb. paracasei	> 4	Non determ.	Non determ.
Latte SP*	Latte	Lb. paracasei	> 2,8	0,02	Resistente
Lb. GG	Prodotto commerciale	Lb. rhamnosus	2,94	Non determ.	Non determ.
Lb. Yakult	Prodotto commerciale	Lb. paracasei	4,20	Non determ.	Non determ.
Lb. KID	Prodotto commerciale	Lb. fermentum	1,14	0,24	Resistente
Lb. LA1	Prodotto commerciale	Lb. johnsonii	0,17	0	Non determ.

Tabella 1. Sopravvivenza al transito gastro-intestinale. La resistenza al succo gastrico ed enterico è espressa come differenza tra il log₁₀ delle ufc/g prima e dopo trattamento con pepsina (succo gastrico) o pancreatina (succo enterico); più il valore si avvicina a zero, più aumenta la resistenza. (*) Ceppi isolati nel corso del progetto.

Nessun ceppo è risultato in grado di inibire microrganismi patogeni (ad eccezione del ceppo P 1 attivo verso *Pseudomonas*), alcuni ceppi degradano il colesterolo fino ad un massimo del 19%.

I ceppi presentano spettro di antibiotico resistenza proprio della specie *paracasei*

Sulla base dell'attività acidificante in latte (Figura 2) alcuni ceppi sono stati scelti per le prove di caseificazione in laboratorio

Nelle caciotte prodotte in laboratorio i probiotici si mantengono ad elevate concentrazioni fino al momento del consumo

Scegliendo opportunamente la concentrazione del probiotico inoculato e lo starter acidificante i formaggi ottenuti non presentano difetti di struttura legati alla crescita e all'attività del ceppo probiotico

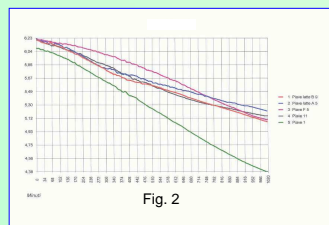


Fig. 2

OBBIETTIVO 2

Allo scopo di verificare le potenzialità applicative di colture protettive di lattobacilli sono state allestite delle ulteriori prove di caseificazione in laboratorio utilizzando alcuni ceppi ad attività antagonista precedentemente isolati e caratterizzati presso i laboratori di Veneto Agricoltura. In particolare, sono stati utilizzati due ceppi di *Lactobacillus plantarum* dotati rispettivamente di attività antifungina (Figura 3) e di attività anti-*Listeria*.

Il ceppo ad attività antifungina si caratterizza per la capacità di inibire diverse specie di muffe e lieviti presumibilmente attraverso la produzione di acido fenil-lattico, metabolita ad attività antifungina descritto in letteratura e frequentemente prodotto da batteri lattici appartenenti alla specie *L. plantarum*. Il ceppo anti-*Listeria* produce invece una batteriocina, termostabile e resistente a pH acido



Figura 3 Attività antagonista di *L. plantarum* verso la muffa *Cladosporium*

L'attività antagonista in formaggio è stata valutata sia direttamente in caseificazione utilizzando il ceppo di *L. plantarum* antifungino o anti-*Listeria* come integrazione alla coltura starter, sia distribuendo una coltura fresca del ceppo sulla crosta di un formaggio Taleggio commerciale.

RISULTATI

Per quanto riguarda l'attività antifungina i risultati migliori sono stati ottenuti inoculando il ceppo di *L. plantarum* in superficie (Figura 4). Tale modalità di applicazione potrebbe essere estesa a formaggi molli come stracchino e crescenza in cui un difetto ricorrente è proprio rappresentato dalla crescita visibile in superficie di muffe e lieviti o da alterazioni cromatiche dovute a lieviti in grado di produrre pigmenti.



Figura 4. A sinistra il formaggio controllo, a destra il formaggio inoculato. Si nota in quest'ultimo una minore crescita di muffe in superficie

Relativamente all'attività anti-*Listeria* i dati acquisiti indicano una minore, anche se non significativa differenza nella presenza di *Listeria* nel formaggio inoculato con il ceppo di *L. plantarum* rispetto al formaggio controllo. Tuttavia, in entrambi i campioni si evidenzia un aumento della concentrazione di *Listeria* nel corso della conservazione del prodotto

Sono necessari ulteriori studi che consentano di stabilire sia le modalità (concentrazione, momento di inoculo) di gestione della coltura protettiva, sia di valutare tutti quei fattori che possono condizionare la produzione e la persistenza dei metaboliti ad attività antagonista nei formaggi.

OBBIETTIVO 3

Questa attività progettuale si poneva come obiettivo l'ampliamento della gamma di prodotti di formaggi probiotici ottenuti con i microrganismi studiati nel corso dell'Azione Biotech I, in particolare il ceppo *Lactobacillus paracasei* TH405

RISULTATI

La sperimentazione effettuata che ha portato alla realizzazione industriale di varie tipologie di formaggi freschi (crescenza, stracchino) ha dato esito POSITIVO: il ceppo TH405 non ha causato alcuna interferenza con la tecnologia in essere. Le prove condotte a confronto con lavorazioni di controllo in cui non vi era aggiunta di microrganismi probiotici, hanno evidenziato come non vi siano differenze significative nei prodotti finiti ottenuti.

Non sono state inoltre rilevate differenze per parametri tecnologici in lavorazione e nemmeno per l'attività acidificante durante la maturazione e la vita commerciale. Infine, i panel test condotti non hanno rilevato differenze significative nelle caratteristiche organolettiche dei prodotti probiotici rispetto ai prodotti tradizionali