

“VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE DI PROBIOTICITA’ DI BATTERI LATTICI ISOLATI IN PRODOTTI TRADIZIONALI”

Bianca Maria Varcasia¹ e Paola De Santis¹e-mail: paola.desantis@izslt.it¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana, Via Appia Nuova 1411, 00178 Roma
Data 21/1/2015**Parole chiave:** Batteri lattici, probiotici, prodotti tradizionali, DGGE, sequenziamento**OBIETTIVI**

Scopo del progetto è quello di studiare la flora lattica probiotica presente nei prodotti tradizionali fermentati a base di latte crudo delle regioni Lazio e Toscana al fine di poterli utilizzare eventualmente come starter autoctoni in formaggi tradizionali. Il possibile utilizzo come starter consentirebbe di valorizzare tali produzioni, spesso a rischio di scomparsa, non solo attraverso il potenziamento delle loro caratteristiche intrinseche ma anche sfruttando le loro proprietà salutistiche. L’attenzione è focalizzata alla caratterizzazione microbiologica e molecolare dei generi *Lactobacillus* spp. e *Lactococcus* spp., e tra questi i ceppi con caratteristiche probiotiche benefiche per la salute umana.

METODOLOGIA

Per il seguente studio sono stati analizzati 5 formaggi tradizionali a base di latte crudo prodotti senza aggiunta di starter industriali e prelevati a fine stagionatura, di cui 2 commercializzati nella regione Lazio e 3 nella regione Toscana (Tabella 1)

Per ciascuno dei prodotti è stato studiato il processo di produzione. In Tabella 1 sono elencati i prodotti analizzati, i produttori e le rispettive UU.OO prelevatrici.

Tabella 1. Elenco dei prodotti e produttori oggetto dello studio

| PRODOTTO | PRODUTTORE | U.O. |
|-----------------------------------|--|---------|
| Pecorino di Picinisco | Caseificio di Pia Marcello - Settefrati (FR) | IZSLT01 |
| Caciotta di capra | Caseificio Valle di Mezzo, Loc. Toppole Valle di Mezzo- Anghiari(AR) | IZSLT02 |
| Caprino di Scilla | Azienda Agricola Angela Saba - Massa Marittima (GR) | IZSLT03 |
| Pecorino della Montagna Pistoiese | Consorzio Montagne e Valli di Pistoia (PT) | IZSLT04 |
| Provolone di bufala | Caseificio Ventre Daniele – Latina (LT) | IZSLT05 |

L’isolamento e la conta dei batteri lattici (LAB) è stato eseguito con terreni specifici per le flore lattiche MRS e M17. Le colonie Catalasi – e Gram + sono state purificate mediante n.3 passaggi successivi su terreni di coltura solidi (MRS o M17) e incubate nelle condizioni ottimali di crescita. Per la definizione delle caratteristiche di probioticità dei LAB isolati e purificati sono state effettuate analisi di “screening” e analisi “specifiche”.

Le “analisi di screening”, atte a verificare la resistenza dei ceppi presunti probiotici lungo il tratto gastrointestinale, riguardano la tolleranza a bassi pH (2,5), la resistenza ai sali biliari, la prova combinata di tolleranza a bassi pH e resistenza ai sali biliari, la resistenza alla pepsina e pancreatina. Le “analisi specifiche”, che simulano le attività dei ceppi presunti probiotici una volta raggiunto il tratto intestinale, sono state effettuate mediante test di autoaggregazione, di coaggregazione, di valutazione dell’attività antibatterica o di produzione di batteriocine. La conferma della produzione di batteriocine da parte dei ceppi di lattobatteri isolati è stata realizzata mediante saggi di PCR basati sui dati di letteratura (Rapporti ISTISAN 12/54).

I ceppi positivi alle prove di probioticità sono stati sottoposti ad identificazione molecolare, previa estrazione del DNA, mediante DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) e confermati con sequenziamento della regione V1 del 16S rRNA.

Tra i ceppi positivi a tutte le prove di probioticità, è stato scelto, per la verifica in vivo della capacità di colonizzare il tratto gastrointestinale e modulare il sistema immunitario, un ceppo di

Lactococcus lactis produttore di batteriocine.

Topi adulti CD1 outbred (Harlan Laboratories, Italia) di sesso femminile e di età compresa tra le 6 e le 8 settimane, sono stati alimentati, mediante assunzione spontanea, con una coltura fresca del ceppo selezionato alla concentrazione di 10^9 ucf/ml⁻¹ per 10 giorni consecutivi. E' stata valutata in primo luogo la colonizzazione intestinale del ceppo utilizzato e mediante isolamento e caratterizzazione microbica del medesimo dalle feci degli animali, successivamente è stato valutato il grado di stimolazione del sistema immunitario con il saggio di proliferazione dei linfociti in risposta all'attività mitogena di una dose ottimale e subottimale di Concanavalina A (ConA). L'analisi di differenze, tra i risultati, statisticamente significative è stato eseguito utilizzando il T test di Student. Gli esperimenti sono stati condotti in conformità con la legge italiana (D. L.gs. 116/92).

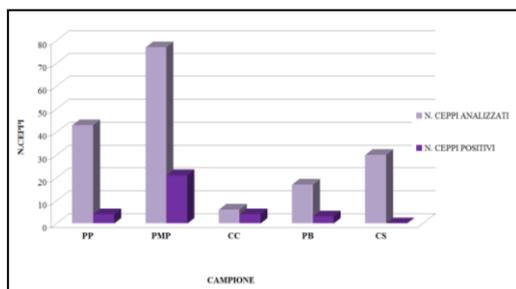
RISULTATI

Analisi microbiologiche. Dai 5 prodotti tradizionali analizzati, sono stati isolati n. 214 ceppi di batteri lattici così ripartiti:

- N. 43 ceppi dal Pecorino di Picinisco (PP), 26 lattococchi e 17 lattobacilli;
- N. 77 ceppi dal Pecorino della Montagna Pistoiese (PMP), 47 sono lattococchi e 30 lattobacilli;
- N. 12 ceppi dalla caciotta di capra (CC), 3 lattococchi e 9 lattobacilli;
- N. 54 ceppi dal provolone bufala (PB), 36 lattococchi e 18 lattobacilli;
- N. 30 ceppi dal caprino di Scilla (CS), tutti lattobacilli.

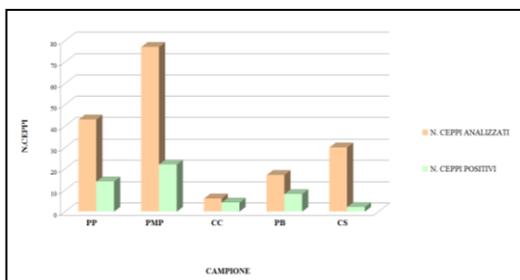
Analisi di screening. Tutti i ceppi sono stati sottoposti alle analisi di screening. Solo 51 ceppi hanno superato tutte le prove (Grafico 1) in particolare 14 ceppi per PP, 23 per PMP, 4 per CC, 8 per PB e 2 per CS.

Grafico 1. Ceppi di LAB positivi e negativi alle prove di screening



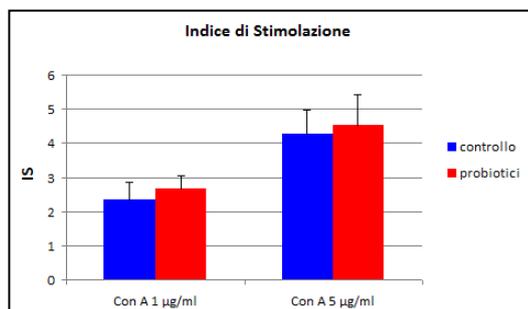
Analisi specifiche. I 51 ceppi, positivi a tutte le prove di screening, sono stati sottoposti alle analisi specifiche di aggregazione, coaggregazione e produzione di batteriocine, di questi solo 31 hanno superato positivamente tutte le prove e per tale motivo essere considerati "potenzialmente probiotici" (Grafico 2). Tali ceppi sono così ripartiti: 4 per PP, 20 per PMP, 4 per CC e 3 per PB.

Grafico 2. Ceppi di LAB positivi alle prove specifiche di probioticità



Identificazione molecolare. Mediante analisi molecolare eseguita con tecnica DGGE e sequenziamento i 31 ceppi potenzialmente probiotici sono stati caratterizzati a livello di specie come segue: 2 ceppi di *Lactococcus lactis* sub. *lactis*, 20 ceppi di *Lactobacillus casei*, 1 ceppo di *Lactobacillus paracasei*, 1 ceppi di *Staphylococcus* spp. e 2 ceppi di *Enterococcus* spp.

Grafico 3: Valori dell'indice di stimolazione con ConA



Prove in vivo. Dalle feci dei topi CD1, durante e dopo la somministrazione del ceppo di *Lactococcus lactis* sub. *lactis*, non è stato possibile re-isolare lo stesso e le prove di immunostimolazione eseguite a fine somministrazione non hanno fornito risultati statisticamente significativi (T di Student) tra i gruppi di animali trattati e di controllo ($p < 0.05$). Per tale motivo, allo scopo di limitare l'utilizzo

degli animali si è deciso di non procedere alla somministrazione ai topi di ulteriori ceppi di LAB.

CONCLUSIONI

Il numero di ceppi candidati probiotici sul totale dei ceppi isolati si è rilevato relativamente basso, anche se con notevoli differenze da prodotto a prodotto. Solo pochi dei ceppi isolati riescono a sopravvivere alle condizioni simulate del tratto gastrointestinale, inoltre per gli stessi, non è stato possibile dimostrare la capacità di colonizzazione dell'intestino in vivo, nonostante le prove in vitro rivelassero caratteristiche favorevoli di aggregazione e coaggregazione. La maggior parte dei ceppi potenzialmente probiotici sono stati ottenuti dal Pecorino della Montagna Pistoiese (65%), seguito dalla caciotta di capra (13%), dal Pecorino di Picinisco (12%) e dal provolone di bufala (9%). Per quanto riguarda le prove in vivo, l'impossibilità di isolare il ceppo di *Lactococcus lactis* sub. *lactis* somministrato oralmente ai topi CD1, è probabilmente dovuta alla difficoltà di colonizzazione dello stesso nell'intestino, nonostante la positività alle caratteristiche di probioticità e la presenza di produzione di nisina, fattori che lo rendevano il candidato ideale per la sperimentazione. Similmente si può spiegare la mancata stimolazione del sistema immunitario in risposta all'attività mitogena della Concanavalina A (ConA), cosa che ha vanificato la valutazione del profilo delle citochine pro-infiammatorie. La quantità ottimale di batteri probiotici vivi da somministrare non è in realtà di facile determinazione in quanto è ceppo-dipendente e, probabilmente, è anche funzione del tipo di beneficio che ottenere. Tuttavia è positivo il ritrovamento nei prodotti tradizionali di LAB con caratteristiche promettenti in termini di probioticità, che riflette la presenza, negli ambienti di produzione, di una flora lattica che merita sicuramente ulteriori approfondimenti scientifici anche per quanto riguarda l'oramai ben nota attività benefica dei LAB nei confronti dell'abbattimento delle flore patogene.

BIBLIOGRAFIA

1. Aureli P., Banderali G., Capurso L., Castellazzi A.M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Rondanelli M., Salvini F., Zuccotti G. V. et al. PROBIOTICI E SALUTE UMANA - 2013: Lo stato dell'arte basato sulle evidenze. POSITION PAPER (2013).
2. Berthier F., Ehrlich S.D. "Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region" FEMS Microbiology Letters 161, 97-106 (1998).
3. Drake M., Small C.I., Spence K.D., Swanson B.G. "Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction" Journal of Food Protection 59 (10), 1031-1036 (1996).
4. Kalavrouzioti I., Hatzikamari M., Litopoulou-Tzanetaki E., Tzanetakis N. "Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts" International Journal of Dairy Technology 58 (1), 30-38 (2005).
5. Kimoto H., Kurisaki J., Tsuji N.M., Ohmomo S., Okamoto T. "Lactococci as probiotic strains: adhesion to human enterocyte-like Caco-2 cells and tolerance to low pH and bile" Letters in Applied Microbiology 29, 313-316 (1999).
6. Kimoto H., Nomura M., Kobayashi M., Mizumachi K., Okamoto T. "Survival of lactococci during passage through mouse digestive tract" Canadian Journal of Microbiology 49, 707-711 (2003).
7. Kimoto H., Nomura M., Kobayashi M., Okamoto T., Ohmomo S. "Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials" Japan Agricultural Research Quarterly 38 (2), 111-117 (2004).
8. Songisepp E., Kullisaar T., Hutt P., Elias P., Brilene T., Zilmer M., Mikelsaar M. "A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity" Journal of Dairy Science 87, 2017-2023 (2004).
9. Vinderola C.G., Prosello W., Ghiberto D., Reinheimer J.A. "Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinian Fresco cheese" Journal of Dairy Science 83, 1905-1911 (2000).