

IL RUOLO DELLA FLORA LATTICA NELLA TRASFORMAZIONE DEGLI ALIMENTI

Dr.ssa Barbara Turchi

Scuola di Dottorato in Scienze Agrarie e Veterinarie

**La microbiologia e la sicurezza dei prodotti
contenenti flora lattica**

Pisa, 17 Gennaio 2013

POSSIBILI IMPIEGHI DEI LAB NEGLI ALIMENTI

- Colture starter
 - Colture aggiuntive (secondarie)
 - Colture probiotiche
- } Alimenti fermentati
-
- Colture protettive
- } Bioconservazione alimenti fermentati e non



COLTURE STARTER ALIMENTI FERMENTATI

Colture di batteri differenti in funzione dell'applicazione tecnologica

Indirizzano il processo fermentativo

Diventano dominanti nelle prime fasi dei processi produttivi

Vantaggi:

- Aumento della *shelf-life* della materia prima trasformata
- Modificazioni organolettiche



Colture starter

Prodotti lattiero-caseari

- Coltura di batteri lattici ad elevata concentrazione appartenenti a diversi generi e specie, che possono essere selezionati in laboratorio (starter industriali) oppure ottenuti da latte crudo, siero, siero-scotta (starter artigianali)

- Producono acido lattico

- ✓ Inibizione altri microrganismi

- ✓ Destabilizzazione caseina

METABOLISMI PRIMARI

- Proteolisi (riserva di sapore)

- Metabolismo acido citrico

- Metabolismo lipidi

METABOLISMI SECONDARI

- Produzione batteriocine e polisaccaridi

- Eventuale azione probiotica

- Autolisi e rilascio enzimi intracellulari



COLTURE STARTER PRODOTTI LATTIERO-CASEARI

Differenze in funzione dell'applicazione tecnologica
(tipo di prodotto: formaggio, mozzarella, burro..etc)

Composizione microbica

Mesofili, termofili, misti

Omofermentanti

Eterofermentanti

Modalità di preparazione

{
artigianali
industriali



Colture starter

Prodotti lattiero-caseari

Modalità di preparazione:

Artigianali

- Lattoinnesti
- Sieroinnesti
- Scottainnesto

Industriali

- Congelati
- Liofilizzati



Colture starter-Prodotti lattiero-caseari

Innesti artigianali

La microflora presente negli innesti naturali si sviluppa da quella del latte crudo

Diversa sulla base dai trattamenti termici e dal substrato usato:

latte, siero, scotta

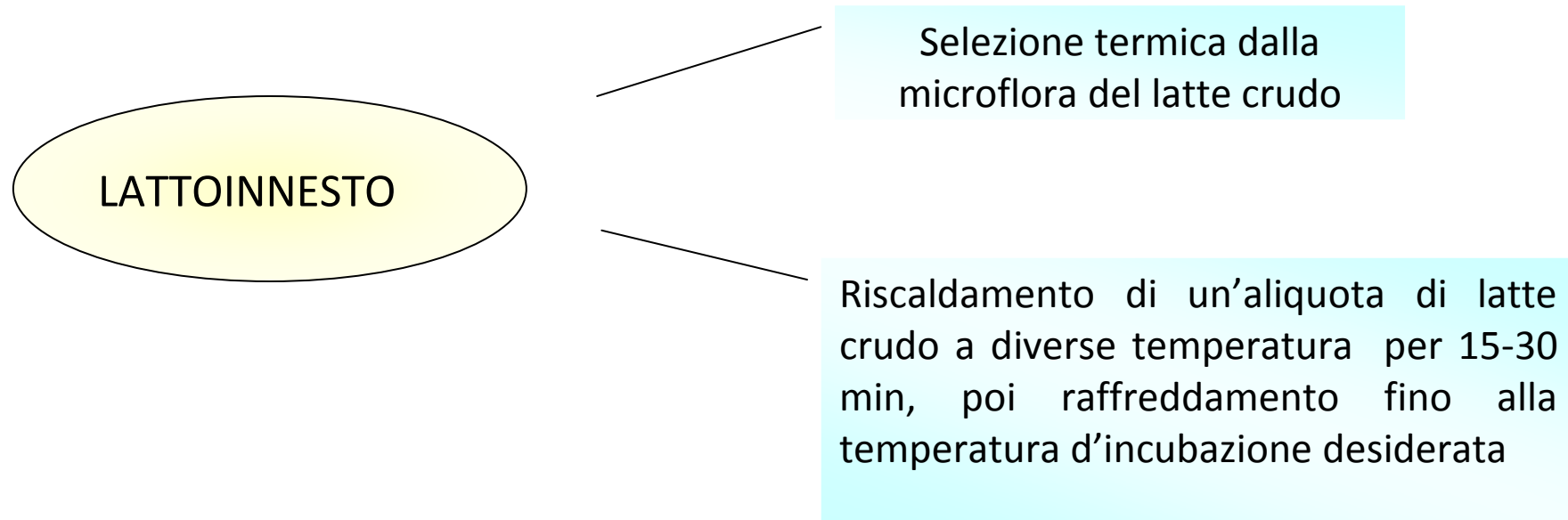
SIEROINNESTO

- Incubazione alla temperatura scelta di un'aliquota di siero residuo dalla caseificazione del latte
- Legame microbiologico fra le diverse caseificazioni
- Variabilità dovuta al modo di produrre formaggio e dalle caratteristiche del latte crudo



Colture starter-Prodotti lattiero-caseari

Innesti artigianali



LATTOINNESTO-SIEROINNESTO

- ✓ legame microflora latte crudo/innesto naturale
- ✓ presenza di differenti specie e numerosi biotipi
- ✓ evoluzione secondo la composizione batterica del latte crudo



Colture starter-Prodotti lattiero-caseari

Innesti artigianali

- **Sieroinnesti termofili** (40-45°C) (Grana, Provolone)
- **Sieroinnesti mesofili** (20-30°C) (Mozzarella di bufala)
- **Lattoinnesti termofili** (40-45°C) (Crescenza, Asiago, yogurt)
- **Lattoinnesti mesofili** (20-30°C) (Caprini, Pecorini, panne)



Colture starter-Prodotti lattiero-caseari

Innesti artigianali

Principali inconvenienti:

- variabilità performance
- variabilità nelle caratteristiche fenotipiche
- fluttuazione performances tecnologiche

Principali vantaggi:

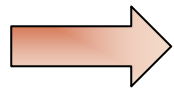
- variabilità microbiologica
- bassi costi
- tradizione



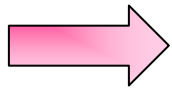
Colture starter-Prodotti lattiero-caseari

Starter industriali

Colture di ceppi batterici preparate in laboratorio, da industrie specializzate, sulla base dei risultati di test di caratterizzazione tecnologica



Necessità di standardizzare tempistiche e caratteristiche del formaggio



Maggiore sensibilità all'infezione fagica

INSIEME DI PIU' COLTURE, COMPOSTE DA BIOTIPI AD ATTIVITA'
SOVRAPPONIBILE, MA CON DIFFERENTE SENSIBILITA'
ALL'ATTACCO FAGICO, UTILIZZATE A ROTAZIONE



Colture starter-Prodotti lattiero-caseari

Starter industriali

Liofilizzati o Congelati

Preparazione

- Prodotti da un'industria specializzata
- Substrato latte, siero o terreno sintetico, trattato termicamente per ridurre carica microbica – presenza agenti crio-conservanti
- Inoculo ceppi scelti
- Incubazione per sviluppo controllato ceppi scelti
- Concentrazione (solo per i diretti in caldaia)
- Congelamento o liofilizzazione



Colture starter-Prodotti lattiero-caseari

Starter industriali

- Monoceppo
- Multiceppo, misti (più ceppi di una o più specie)

{ Crescenza,
Mozzarella

↓
(*Streptococcus thermophilus*)



{ Yogurt, Gorgonzola,
Taleggio, Asiago

(*Streptococcus thermophilus* + *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*)

{ burro

(*Lactococcus*, *Leuconostoc*)

{ Provolone, Grana
Padano

(*Streptococcus thermophilus* +
lattobacilli termofili)



COLTURE SECONDARIE (ADJUNCT CULTURES)

Coltura microbica aggiunta al latte da caseificare, generalmente insieme allo starter, con scopi diversi dalla produzione di acido lattico (Clark and Agrawal, 2007).

NSLAB che contribuiscono allo sviluppo del sapore e della tessitura del formaggio (El Soda et al., 2000).



COLTURE SECONDARIE (ADJUNCT CULTURE)

- Accelerazione maturazione prodotti
- Produzione aroma
- Benefici in termine di sicurezza e aspetti salutistici
- Riduzione costi

Specie di maggiore interesse:

Lattobacilli Eterofermentanti facoltativi

Lb plantarum

Lb casei/paracasei

Lb curvatus

Lb rhamnosus



Colture starter

Insaccati carnei fermentati

Gli insaccati carnei fermentati sono il risultato delle trasformazioni microbiologiche, biochimiche, fisiche e sensoriali a carico di un **impasto carneo** costituito da:

- parti magre
- grasso
- vari ingredienti e/o additivi

insaccato in budelli naturali o artificiali, maturato in determinate condizioni di **umidità** e **temperatura**.

Numero limitato di LAB alofili presente nella materia prima (3-4 log CFU/g), aumentano durante la maturazione



COLTURE STARTER

INSACCATI CARNEI FERMENTATI

La stabilizzazione di questi prodotti nei confronti delle alterazioni è assicurata da una serie di eventi microbiologici, biochimici e fisici.

In particolare:

- l'abbassamento del pH, come conseguenza della fermentazione lattica del glicogeno o di glucidi eventualmente aggiunti;
- l'abbassamento dell'attività dell'acqua (aw) per effetto dell'aggiunta di sale e della disidratazione che accompagna la stagionatura;
- le condizioni termo-igrometriche che ricorrono durante la maturazione, che in genere risultano favorevoli a microrganismi utili e sfavorevoli a microrganismi dannosi;
- la produzione di sostanze dotate di attività antimicrobica;
- l'eventuale aggiunta di additivi antimicrobici;
- l'azione dell'eventuale pratica di affumicamento.



COLTURE STARTER

INSACCATI CARNEI FERMENTATI

Le colture starter

Tale pratica, applicata ai derivati carnei, ha incontrato resistenze maggiori rispetto a quelle rilevate nell'industria lattiero casearia

- il materiale carneo è molto disomogeneo
- è solido per cui la dispersione del microrganismo inoculato è più difficile
- la carne possiede una microflora autoctona competitiva molto variabile (quali e quantitativamente) che non può essere eliminata tramite un trattamento di pastorizzazione, come usualmente avviene con il latte.



FASI DI PRODUZIONE DEGLI INSACCATI CARNEI FERMENTATI



COLTURE STARTER

INSACCATI CARNEI FERMENTATI

Le colture starter sono aggiunte agli impasti, insieme agli altri ingredienti in modo da realizzare una concentrazione microbica di almeno un milione di cellule per grammo.

Caratteristiche biotecnologicamente utili:

- alotolleranza
- omofermentanti
- *optimum* crescita tra i 12 e 30 °C
- capacità di ridurre i nitrati
- resistenza ai nitriti
- attività proteolitica e lipolitica
- incapacità produzione sapori anomali
- incapacità di produrre ammine biogene



COLTURE STARTER

INSACCATI CARNEI FERMENTATI

Micrococchi (aerobi obbligati)

Stafilococchi coagulasi negativi (anaerobi facoltativi)

Azione limitata alla fase iniziale della maturazione dei prodotti

- Rendono anaerobico l'ambiente (aerobi)
- Riducono nitrati a nitriti
- Intervengono nella lipolisi e proteolisi
- Demolizione perossidi (catalasi +)
- NON DEVONO ESSERE CAPACI DI PRODURRE TOSSINE ed EMOLISINE

Staphylococcus xylosus, *Staphylococcus carnosus*, *Micrococcus varians*



COLTURE STARTER

INSACCATI CARNEI FERMENTATI

Lattobacilli

Attività:

- fermentazione degli zuccheri con la liberazione di acido lattico (omofermentanti) o ac. lattico, acetico e CO_2 (eterofermentanti)
- acidificazione prodotto (<5,3)
- inibizione dei batteri anaerobi facoltativi, per rapido sviluppo già dopo 3-4 giorni dal confezionamento
- coagulazione delle proteine muscolari, determinando stabilità e coesione al prodotto finito
- contributo alla formazione del caratteristico colore rosso vivo, che si genera grazie all'ambiente acido
- eventuale attività proteolitica e lipolitica sia endo che eso cellulare
- produzione batteriocine

Lactobacillus plantarum



COLTURE STARTER INSACCATI CARNEI FERMENTATI

Pediococchi (*P. acidilactici* e *P. pentosaceus*)

- flora non dominante nelle fermentazioni spontanee
- *P. acidilactici*, sviluppo ottimale a 35°C-40°C (ai limiti della termofilia), sotto i 20°C lento sviluppo, incapace di dare un veloce abbassamento del pH
- *P. pentosaceus*: rapida acidificazione tra 21 e 35°C



COLTURE STARTER

INSACCATI CARNEI FERMENTATI

Le Muffe

- sono aerobiche e quindi consumano ossigeno
- assimilano i nitrati
- demoliscono i perossidi
- diffondono enzimi proteolitici e lipolitici
- producono antibiotici

Sviluppandosi in una fase successiva a quella che è caratterizzata dalla fermentazione lattica operata dai batteri lattici, **consumano il lattato**, provocando un incremento dei valori di pH, generalmente apprezzato dal consumatore finale (pH 6)

OPERANO DESACIDIFICAZIONE DALL'ESTERNO VERSO L'INTERNO

Fenomeno legato al diametro del salame




COLTURE PROBIOTICHE

Microrganismi vivi, che ingeriti in un certo numero, esercitano effetti benefici sulla salute dell'ospite

FAO/WHO, 2006. Guidelines for the evaluations of probiotics in Food



QUALI MICRORGANISMI?

- **Prevalentemente produttori di acido lattico e acido acetico, quali LAB e Bifidobatteri.**
 - Un probiotico deve avere certi requisiti:
 - Dimostrati effetti benefici sull'ospite
 - Assenza di patogenicità/tossicità
 - Assenza antibiotico resistenze trasmissibili
 - Resistenza al transito gastrico
 - Capacità colonizzare l'intestino
 - Rimanere vivo, vitale ed in cariche elevate (10^9 UFC/100g) fino alla data di scadenza del prodotto
 - Conferire buone caratteristiche sensoriali
- 

LACTIC ACID BACTERIA AND BIFIDOBACTERIA

1) Lactobacilli

- **Gruppo acidophilus:** *L. acidophilus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*
- **Gruppo casei:** *L. casei* (**shirota**), *L. paracasei*, *L. rhamnosus* (**GG**)

L. reuteri, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*

2) *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Sporolactobacillus inulis*

3) Bifidobatteri

Potenzialmente tutte le specie di origine umana possono essere usate, ad eccezione di *B. denticolens* e *B. dentium* (carie).

Specie più utilizzate:

- *B. adolescentis*
- *B. longum subsp. infantis*
- *B. longum subsp. longum*
- *B. animalis subsp. lactis* (**ceppo Bb12**)



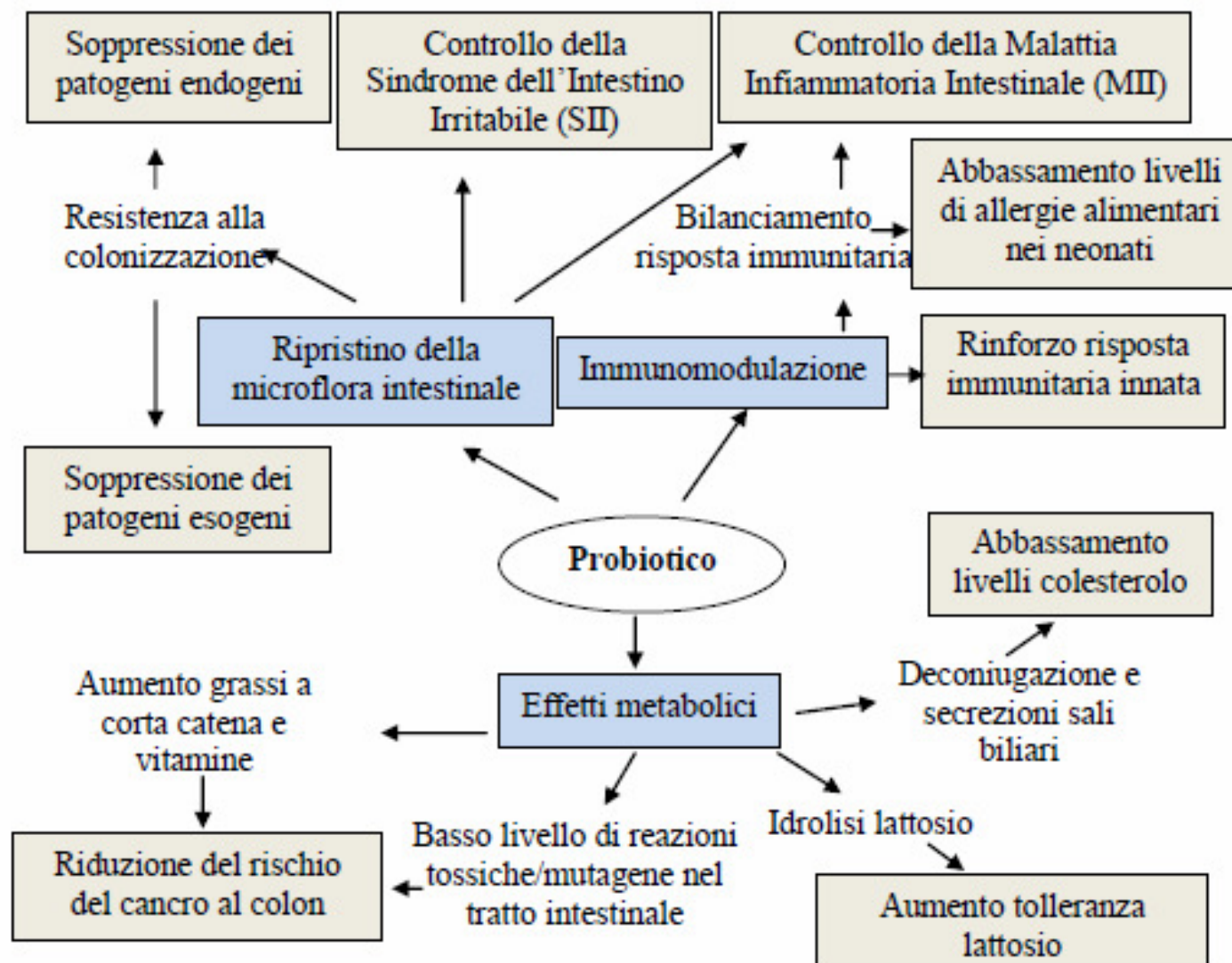


Figura 2. Principali effetti benefici e meccanismi d'azione dei batteri probiotici. (Modificato da Saarela *et al.* 2002).

COLTURE PROTETTIVE BIOCONSERVAZIONE

Uso di microrganismi (compresi batteriofagi), loro metaboliti o entrambi al fine di conservare alimenti che non sono generalmente considerati fermentati

Produzione di sostanze antimicrobiche naturali:
Acidi organici, CO₂, H₂O₂, etanolo, diacetile, batteriocine



COLTURE PROTETTIVE BIOCONSERVAZIONE



Meat Science, Vol. 49, No. Suppl. 1, S139–S150, 1998
© 1998 Elsevier Science Ltd
All rights reserved. Printed in Great Britain
0309-1740/98/\$19.00+0.00
PII: S0309-1740(98)00080-1

Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria for the Biopreservation of Meat and Meat Products

M. Hugas

Meat Technology Center (IRTA), Granja Camps i Armet s/n, 17121 Monells, Spain

Journal of Applied Microbiology 2005, 98, 56–63

doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02419.x

Lyophilized preparations of bacteriocinogenic *Lactobacillus curvatus* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as potential protective adjuncts to control *Listeria monocytogenes* in dry-fermented sausages

N. Benkerroum¹, A. Daoudi², T. Hamraoui¹, H. Ghalfi³, C. Thiry⁴, M. Duroy⁴, P. Evrart⁴, D. Roblain³ and P. Thonart³

¹Département des Sciences Alimentaires et Nutritionnelles, and ²Département HIDAOA, Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Rabat, Morocco, ³Centre Wallon de Bio-Industrie, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgium, and ⁴THT, S.a. Parc Scientifique CREALYS, Gembloux, Belgium

2004/0606: received 27 May 2004 and accepted 9 July 2004

Eur Food Res Technol (2006) 222: 343–346
DOI 10.1007/s00217-005-0116-9

ORIGINAL PAPER

Alexander Weiss · Walter P. Hammes

Lactic acid bacteria as protective cultures against *Listeria* spp. on cold-smoked salmon

Received: 21 February 2005 / Revised: 16 June 2005 / Published online: 23 September 2005
© Springer-Verlag 2005



BIODIVERSITÀ BATTERI LATTICI

Attuale classificazione LAB

(da 4 generi 84 specie
a 12 generi 397 specie)

Genere	N° specie 1980	N° specie 2006	N° specie nov 2010
<i>Aerococcus</i>	0	6	7
<i>Carnobacterium</i>	0	10	11
<i>Enterococcus</i>	0	38	41
→ <i>Lactobacillus</i>	44	134	168
→ <i>Lactococcus</i>	0	5	10
→ <i>Leuconostoc</i>	6	2	22
<i>Oenococcus</i>	0	2	2
→ <i>Pediococcus</i>	7	12	15
→ <i>Streptococcus</i>	27	85	95
<i>Tetragenococcus</i>	0	4	4
<i>Vagococcus</i>	0	5	7
<i>Weissella</i>	0	12	15
	84	315	397



Biodiversità batteri lattici

1. Presenza di differenti specie
2. Presenza di individui della stessa specie con fenotipo differente
3. Presenza di individui della stessa specie con genoma differente

Impiego di specifici
biotipi per
mantenere la
biodiversità dei
prodotti



Biodiversità batteri lattici

Come studiarla?

- **1) Metodi fenotipici**
- **2) RFLP methods**
- (polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione)
 - Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)
 - Ribotyping
- **Metodi basati su PCR**
 - Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD PCR)
 - -Amplified fragment length polymorphism (AFLP)
 - -REP-PCR
- **Metodi basati su sequenziamento**
 - Multilocus sequence typing (MLST)



Antibiotico resistenza nei LAB

Uso estensivo di antibiotici negli allevamenti ha contribuito alla diffusione di batteri antibiotico resistenti attraverso la CATENA ALIMENTARE.

- Trattamento animali malati
- Prevenzione infezioni
- Incremento masse muscolari

CIBO: vettore per lo scambio di geni della resistenza tra animali e uomini

GENI DI RESISTENZA SITUATI SU ELEMENTI GENETICI MOBILI
TRASMISSIBILI ATTRAVERSO CONIUGAZIONE BATTERICA



Antibiotico resistenza nei LAB



European Food Safety Authority

EFSA Journal 2012;10(6):2740

SCIENTIFIC OPINION¹

Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance²

EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP)^{3,4}

European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy



Figure 1. Proposed scheme for the antimicrobial resistance assessment of a bacterial strain used as a feed additive

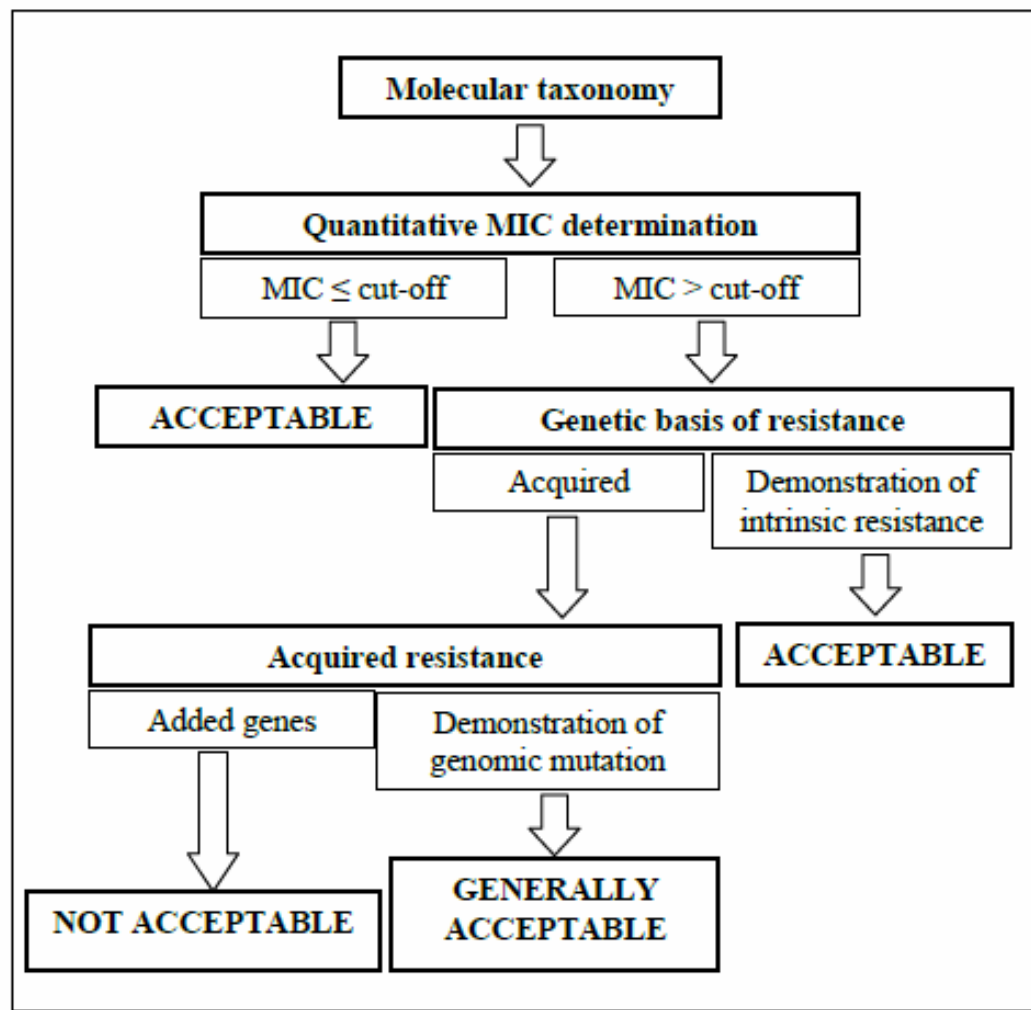


Table 1. Microbiological cut-off values (mg/L)

	ampicillin	vancomycin	gentamycin	kanamycin	streptomycin	erythromycin	clindamycin	tetracycline	chloramphenicol
<i>Lactobacillus</i> obligate homofermentative ^a	1	2	16	16	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus acidophilus</i> group	1	2	16	64	16	1	1	4	4
<i>Lactobacillus</i> obligate heterofermentative ^b	2	n.r.	16	32	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	2	n.r.	8	64	64	1	1	16	4
<i>Lactobacillus</i> facultative heterofermentative ^c	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Lactobacillus plantarum/pentosus</i>	2	n.r.	16	64	n.r.	1	2	32	8
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	n.r.	16	64	32	1	1	8	4
<i>Lactobacillus casei/paracasei</i>	4	n.r.	32	64	64	1	1	4	4
<i>Bifidobacterium</i>	2	2	64	n.r.	128	1	1	8	4
<i>Pediococcus</i>	4	n.r.	16	64	64	1	1	8	4
<i>Leuconostoc</i>	2	n.r.	16	16	64	1	1	8	4
<i>Lactococcus lactis</i>	2	4	32	64	32	1	1	4	8
<i>Streptococcus thermophilus</i>	2	4	32	64	64	2	2	4	4
<i>Bacillus</i> spp	n.r.	4	4	8	8	4	4	8	8
<i>Propionibacterium</i>	2	4	64	64	64	0.5	0.25	2	2
Other Gram +	1	2	4	16	8	0.5	0.25	2	2

n.r. not required.

^aincluding *L. delbrueckii*, *L. helveticus*

^bincluding *L. fermentum*

^cincluding the homofermentative species *L. salivarius*



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

International Journal of Food Microbiology 105 (2005) 281–295

INTERNATIONAL JOURNAL OF
Food Microbiology

www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro

Review

Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review

Shalini Mathur, Rameshwar Singh*

National Collection of Dairy Cultures, Dairy Microbiology Division, National Dairy Research Institute, Karnal, PIN 243 122, India

Received 20 July 2004; received in revised form 18 December 2004; accepted 20 March 2005

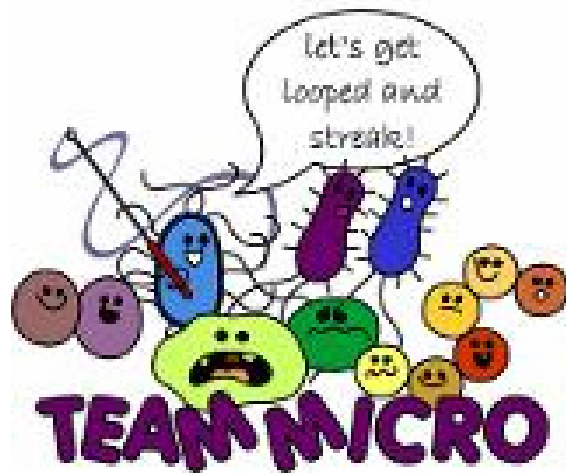


Table 1

Overview of antibiotic resistances reported in the food-associated LAB

Foods	Species	Resistance	References
<i>Raw meat products</i>			
Poultry	<i>Lb. reuteri</i> G4	<i>cat</i>	Lin et al., 1996
Raw ground pork	<i>Lb. reuteri</i> 100-63	<i>erm</i> (T)	Tannock et al., 1994
	<i>Lb. plantarum</i> caTC2R	Cm	Ahn et al., 1992
Raw ground pork and beef	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leuco. mesenteroides</i>	Tetracycline (69%); chloramphenicol (3%); methicillin (85%)	Vidal and Collins- Thompson, 1987
<i>Fermented products</i>			
Raw milk soft cheese	<i>Lc. lactis</i> strain K214	<i>Str-tet</i> (S)- <i>cat</i>	Perreten et al., 1997b
Greek cheese	<i>Lb. acidophilus</i> ACA-DC 243	Penicillin	Charteris et al., 1998
Yoghurt starter cultures	<i>S. thermophilus</i> and <i>Lb. delbruekii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>	Neomycin, polymyxin B	Sozzi and Smiley, 1980
Nigerian fermented foods and beverages	<i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. jensenii</i>	Tetracycline (42.5%) Erythromycin (17.5%) Ampicillin (47.5%) Cloxacillin (80%); penicillin (77.5%);	Olukoya et al., 1993
Fermented dry sausages	<i>Lactobacillus</i> species	Tetracycline Gentamicin (79%) Penicillin G (64%) Kanamycin (79%) Vancomycin (65%)	Gevers et al., 2003
Turkish yoghurts	<i>S. thermophilus</i>	Tetracycline (26%) Penicillin G (23%) Erythromycin (16%) Chloramphenicol (11%)	Aslim and Beyatli, 2004
European probiotic products	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. delbreukii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>		Temmerman et al., 2002
<i>Others</i>			
Maize silage	<i>Lb. plantarum</i> 5057	<i>tet</i> (M)	Danielsen, 2002

Gene names and abbreviations: *cat*: chloramphenicol acetylase gene; *erm*: erythromycin resistance gene; Cm: Chloramphenicol; *tet*: tetracycline resistance gene; *str*: streptomycin adenylase gene. *Lb*: *Lactobacillus*; *Lc*: *Lactococcus*; *Leuco*: *Leuconostoc*; *S*: *Streptococcus*.



GRAZIE PER
L'ATTENZIONE!

