



UNIVERSITÀ DI PISA

# I BATTERI LATTICI NEGLI ALIMENTI

Dott.ssa CARLA MILIONI

VALUTAZIONE CRITICA DEI RISULTATI DELLE ANALISI MICROBIOLOGICHE SUGLI  
ALIMENTI

ROMA, 29 febbraio 2012



**WORKING DOCUMENT**

Version 2 – November 2008

**TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT**

On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods


## **2. Challenge tests assessing a growth potential**

To conduct challenge tests to assess the growth potential, the following factors, as a minimum, must be taken into consideration:

- product characteristics,
- shelf-life of the product,
- number of batches,
- choice of the strain(s),
- preparation of the inoculum,
- preparation and inoculation of the test units,
- storage conditions,
- measurement of physical-chemical characteristics,

## 2.1. Product characteristics

Product characteristics at the end of the production must be described and must be representative of the variability of the characteristics of the food. These characteristics should include both intrinsic and extrinsic properties:

- physical-chemical characteristics such as pH,  $a_w$ , salt content, preservative concentration;
-  - associated microflora (total count) or specific microflora (e.g. lactic acid bacteria, *Pseudomonas*, ...)
- packaging conditions (air, vacuum packaging, modified atmosphere packaging).

## 2.2.10. Test report

Include in the test report at least the following information:

- ◇ Report number,
- ◇ Information concerning full identification of the foodstuff:
  - Identification of the batches tested and their manufacturing date,
  - The characteristics of the foodstuff (pH,  $a_w$ , associated microflora, ...),
  - The intended shelf-life of the product,

# Hurdle technology (Leistner, 2000)



**IN QUALI ALIMENTI LA FLORA LATTICA  
RAPPRESENTA UN OSTACOLO ALLO SVILUPPO  
DI BATTERI PATOGENI E ALTERANTI?**

# NEGLI ALIMENTI FERMENTATI..



**..MA NON SOLO..**





# GLI ALIMENTI FERMENTATI

Rispetto alle materie prime da cui originano sono caratterizzati da:

- aromi e sapori propri dovuti all'attività glicolitica, proteolitica e lipolitica dei microorganismi fermentanti
- una shelf life più lunga grazie all'azione inibitoria dei microorganismi fermentanti sulla crescita di batteri patogeni e alteranti
- maggiore digeribilità e maggior contenuto vitaminico



## I BATTERI LATTICI (LAB)

- I batteri lattici sono ampiamente diffusi in natura: per la loro necessità di substrati ricchi di nutrienti, trovano habitat ideale in prodotti alimentari come carne, latte e vegetali
- sono stati utilizzati da tempi immemorabili in modo istintivo nella produzione di alimenti fermentati senza sospettare la connessione tra l'azione microbica e l'ottenimento del prodotto finale
- i batteri lattici sono considerati organismi di grado alimentare (food-grade) e la maggior parte di essi sono riconosciuti come generalmente sicuri per la salute umana cioè organismi GRAS (generally recognised as safe)

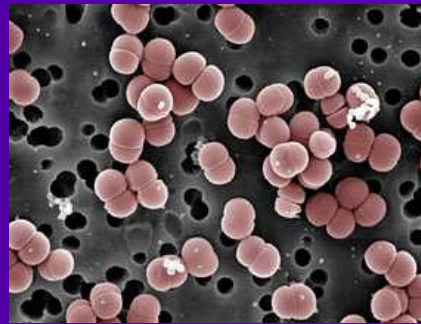
# CARATTERI GENERALI DEI LAB

- BATTERI GRAM +, NON SPORIGENI, IMMOBILI
- CATALASI NEGATIVI
- MOLTO ESIGENTI NUTRIZIONALMENTE
- ANAEROBI AEROTOLLERANTI
- ACIDO TOLLERANTI
- HANNO METABOLISMO STRETTAMENTE FERMENTATIVO

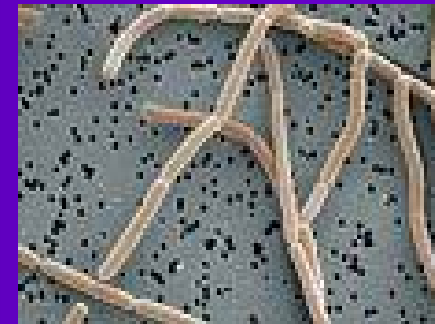
(Axelsson, 1998)



<http://nature.com>



<http://bioweb.usu.edu/microscopy/>



# LAB: CLASSIFICAZIONE IN BASE AL METABOLISMO DEL GLUCOSIO



# CLASSIFICAZIONE DEI LAB

GENERI ATTUALI	TIPO FERMENT	MORFOLOGIA	GENERI SECONDO ORLA-JENSEN	TEMP OTTIMALE DI CRESCITA	ESEMPI
LACTOBACILLUS, WEISSELLA	ETEROF	BASTONCELLI	BETABACTERIUM	30-37° C	Lb sanfranciscensis Lb kefir, lb brevis Lb fermentum (45°C)
LACTOBACILLUS	OMOF	BASTONCELLI	THERMOBACTERIUM	45°C	Lb delbrueckii (3 subspecie), Lb helveticus, Lb acidophilus
LACTOBACILLUS, CARNOBACTERIUM	OMO- ETEROF	BASTONCELLI	STREPTOBACTERIUM	30-37°C	Lb casei (4 subspecie), Lb curvatus, Lb plantarum, Lb sakei
STREPTOCOCCUS, LACTOCOCCUS, ENTEROCOCCUS, VAGOCOCCUS	OMOF	COCCHI	STREPTOCOCCUS	45°C  30°C	S thermophilus, Lc lactis (3 subsp) E faecium, E faecalis
LEUCONOSTOC, OENOCOCCUS, WEISSELLA	ETEROF	COCCHI	BETACOCCUS	30°C	Lc mesenteroides (varie subspecie) Oenococcus oeni
PEDIOCOCCUS, TETRAGENOCOCCUS AEROCOCCUS	OMOF	COCCHI	TETRACOCCUS	30°C	Pc acidilactici, Pc pentosaceus

# CLASSIFICAZIONE FILOGENETICA

PHYLUM:

FIRMICUTES

CLASSE:

BACILLI

ORDINE:

LACTOBACILLALES

FAMIGLIE:

LACTOBACILLACEAE

LEUCONOSTOCACEAE

STREPTOCOCCACEAE

AEROCOCCACEAE

CARNOBACTERIACEAE

ENTEROCOCCACEAE

# COLTURE STARTER

Preparazione contenente m.o. vivi di cui si sfrutta l'attività metabolica: la coltura viene aggiunta alla materia prima per avviare e regolare il processo fermentativo in modo che il prodotto finito abbia certe caratteristiche (Buckenhüskes, 1993)

- **STANDARDIZZAZIONE DELLE CARATTERISTICHE ORGANOLETTICHE DEL PRODOTTO FINITO**
- **RIDUZIONE DEL TEMPO DI TRASFORMAZIONE**
- **MIGLIORAMENTO DELLA SICUREZZA IGIENICA**

**Starter naturali:** latte-innesti o siero-innesti (nei formaggi), colture con ceppi misti, a composizione indefinita

**Starter selezionati:** liquidi o in polvere, liofilizzati e congelati, a singolo ceppo o a ceppi multipli, possono avere anche caratteristiche di colture protettive

# COLTURE PROTETTIVE

**BIOCONSERVAZIONE:** impiego della microflora naturale o aggiunta di LAB o di loro metaboliti ad attività antimicrobica per:

- migliorare e garantire la sicurezza microbiologica degli alimenti
- estendere la loro shelf life



COMPETIZIONE CON LA FLORA ENDOGENA (INOCULI ELEVATI)



PRODUZIONE DI METABOLITI (ACIDI ORGANICI,  $H_2O_2$ )



BATTERIOCINE

(Villani, 2007)

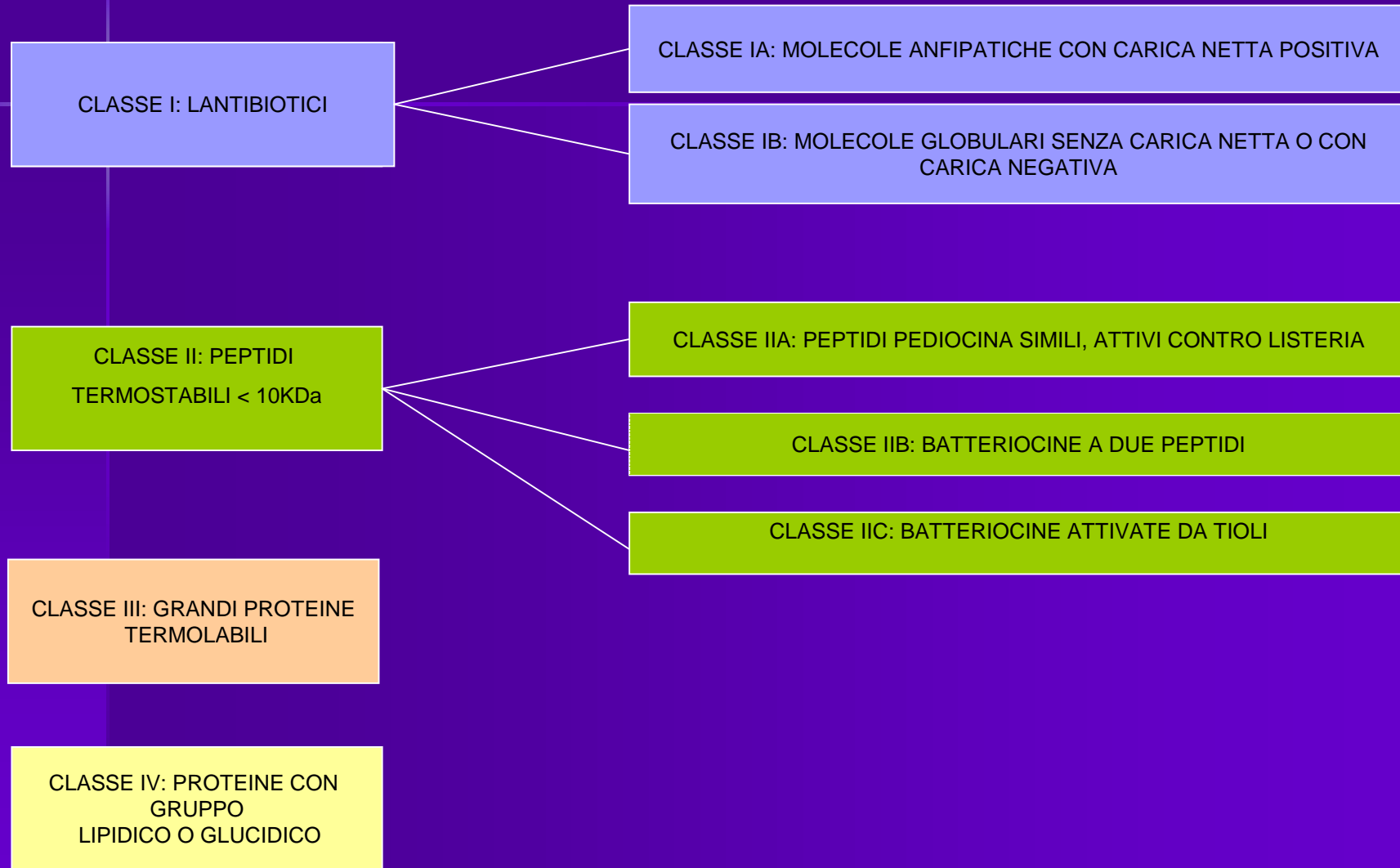


# BACTERIOCINE

Prodotti primari o modificati della sintesi ribosomiale di batteri, rilasciate nell'ambiente extracellulare, che possono avere uno spettro relativamente ristretto di attività battericida (caratterizzato dall'inclusione di almeno alcuni ceppi appartenenti alla stessa specie del batterio produttore) e contro i quali il ceppo produttore ha qualche meccanismo specifico di autoprotezione (Jack RW et al, 1995)

# CLASSIFICAZIONE DELLE BATTERIOCINE

(Klaenhammer, 1993)



## METODI DI STUDIO DEI LAB

- METODI CULTURA-DIPENDENTI: isolamento dei batteri con metodi colturali; identificazione a livello di specie con metodi tradizionali (colorazione di gram, prove biochimiche, crescita a diverse temperature) o a livello di ceppo con metodi molecolari (tecniche di fingerprinting: 1) senza amplificazione RFLP+PFGE, Ribotyping, 2) con amplificazione: AFLP, RAPD, ARDRA).

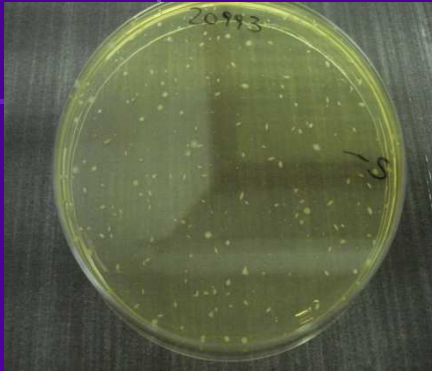
Sugli isolati: prove specifiche per determinare l'attività acidificante, proteolitica, autolitica o la produzione di batteriocine

- METODI CULTURA-INDIPENDENTI: estrazione del DNA batterico direttamente dalla matrice alimentare, consente di rilevare anche la frazione VNC dei microorganismi

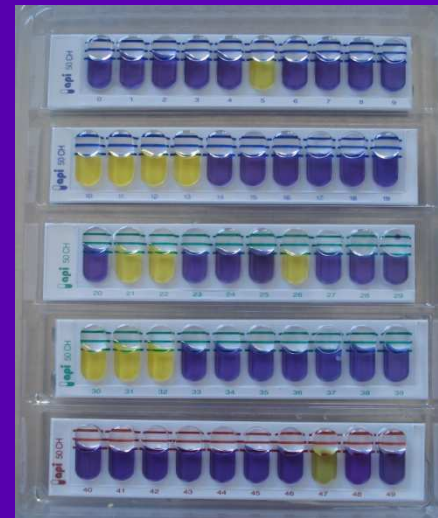


PCR DGGE

# METODI CULTURALI



*Leuconostoc mesenteroides* 99.1%



*Lactobacillus paracasei* sub *paracasei* 97.1%

# **I NOSTRI STUDI**

**SALAME TOSCANO**

**"MORTADELLA NOSTRALE"**

**PECORINO A LATTE CRUDO**

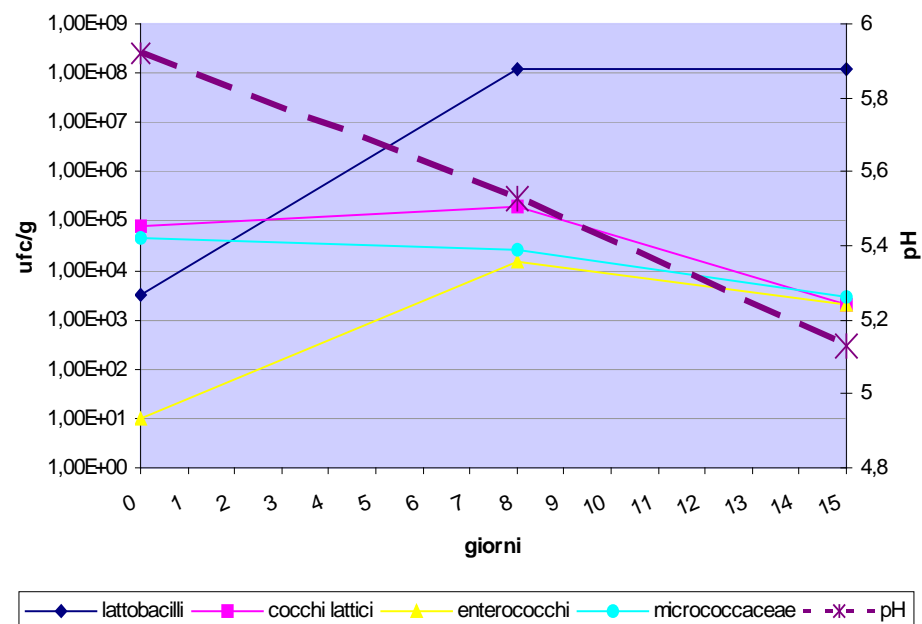
# SALAME TOSCANO /1



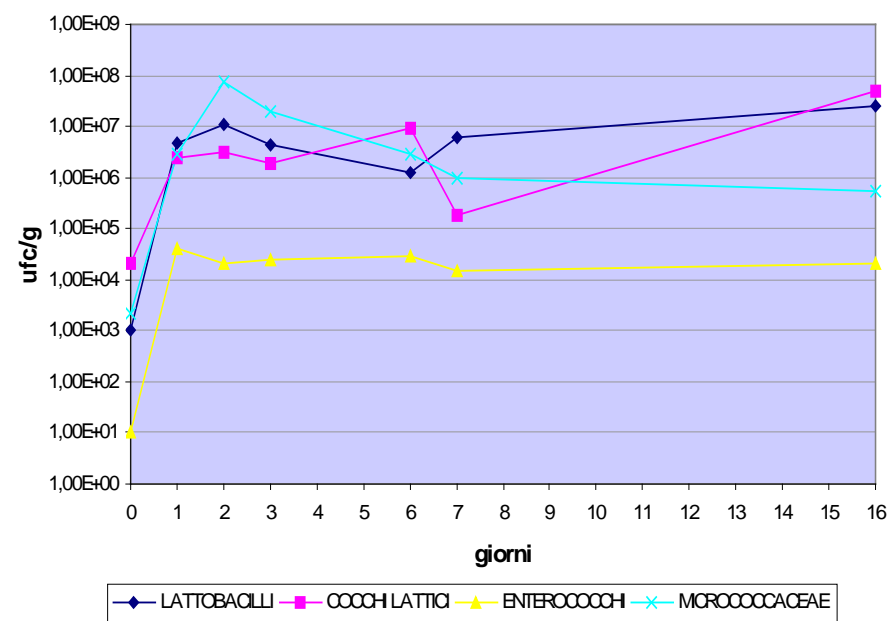
IMPASTO DI SALAME  
DILUITO 1:5  
IN SOLUZ FISIOLÓGICA  
CONTAMINATO CON  
L MONOCYTOGENES

# SALAME TOSCANO/2

ANDAMENTO DELLA MICROFLORA NATURALE E DEL pH



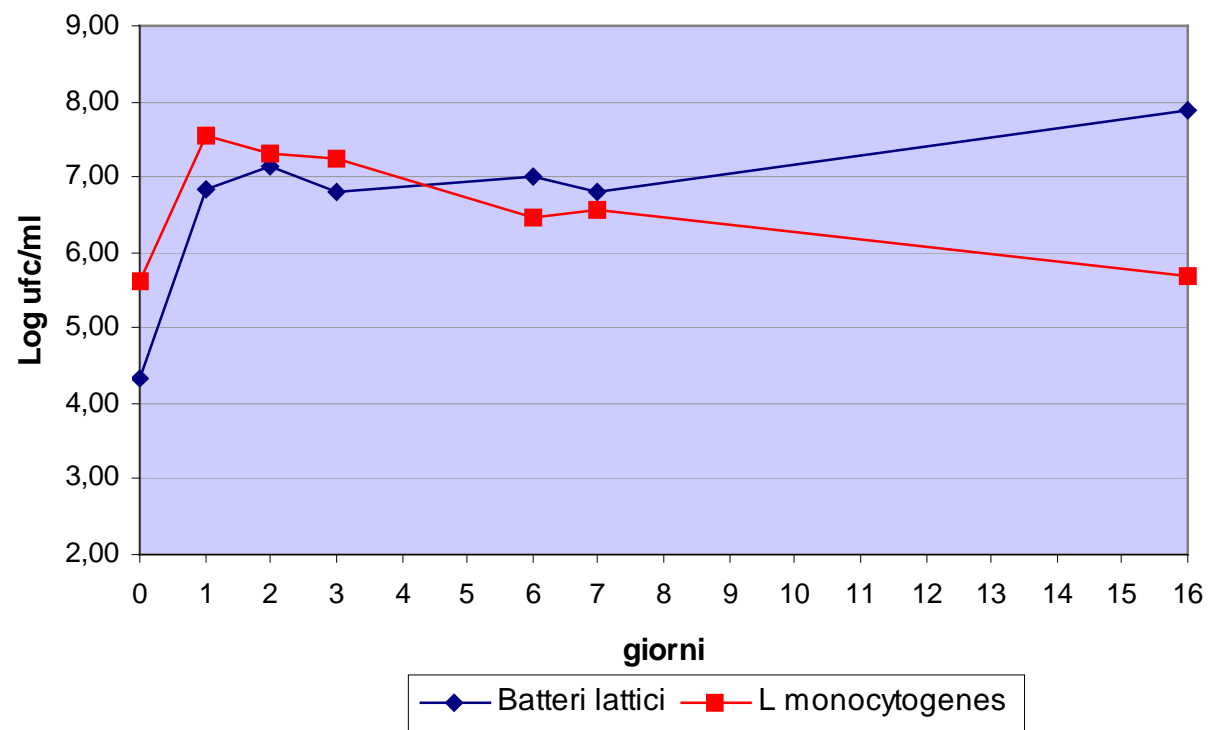
ANDAMENTO DELLA MICROFLORA NEL SISTEMA IN VITRO





# SALAME TOSCANO/3

L monocytogenes vs batteri lattici



# ComBase

[www.combase.cc](http://www.combase.cc)

## COMBASE SEARCH RESULT DETAILS FOR RECORD ID: LHH21\_1

[View Summary](#)

[First](#) [Back 10](#) [Previous](#) [Next](#) [Forward 10](#) [Last](#)

[1/1 matches]

[Download Lhh21\\_1  
to CSV](#)

### Record Details

Organism: *Listeria monocytogenes/innocua*

Food type: Sausage (in: fermented sausage)

Temperature: 21 °C

pH: 5.2

Water activity: 0.92

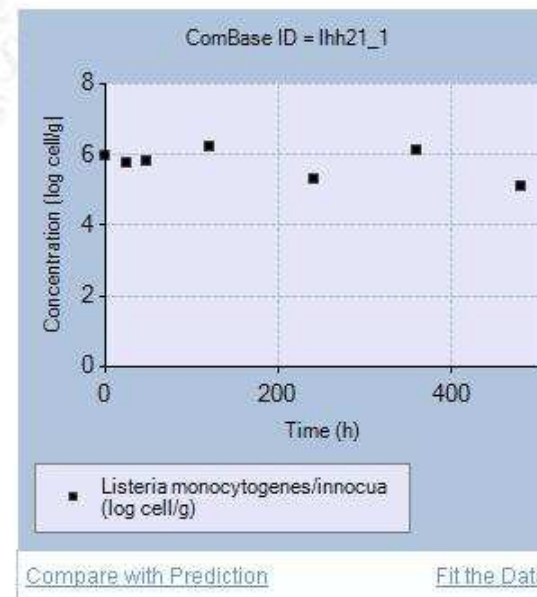
NaCl: Not reported

Maximum Rate: See data

(log<sub>10</sub>(CFU/h)):

Conditions:

Vacuum-packed, Lactic acid (possibly as salt) in the environment

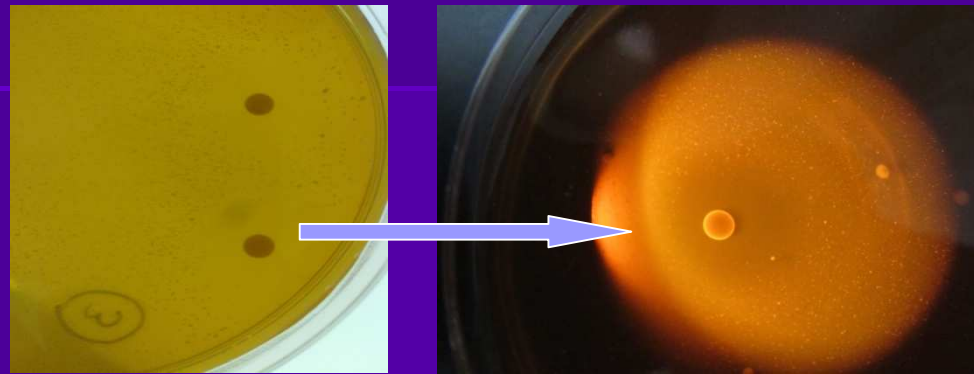


### Record Data(lhh21\_1)

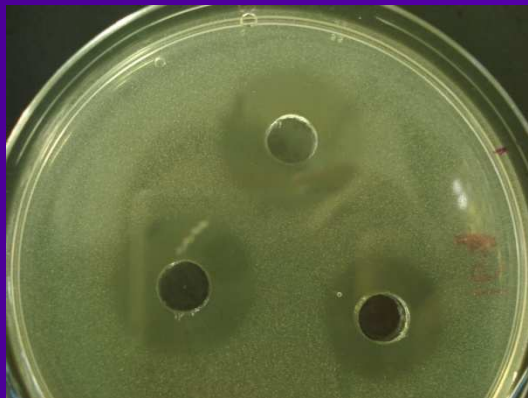
Time (h)	log cell/g
0.00	5.960
24.00	5.770
48.00	5.840
120.00	6.240
240.00	5.310
360.00	6.130
480.00	5.110

# PRODUZIONE DI BATTERIOCINE

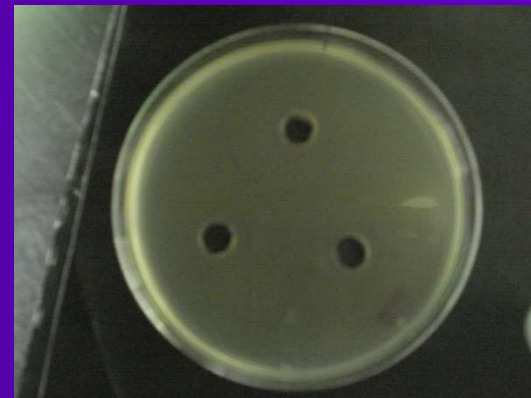
Risultati preliminari



Metodo del triplo strato



Surnatatante t.q.



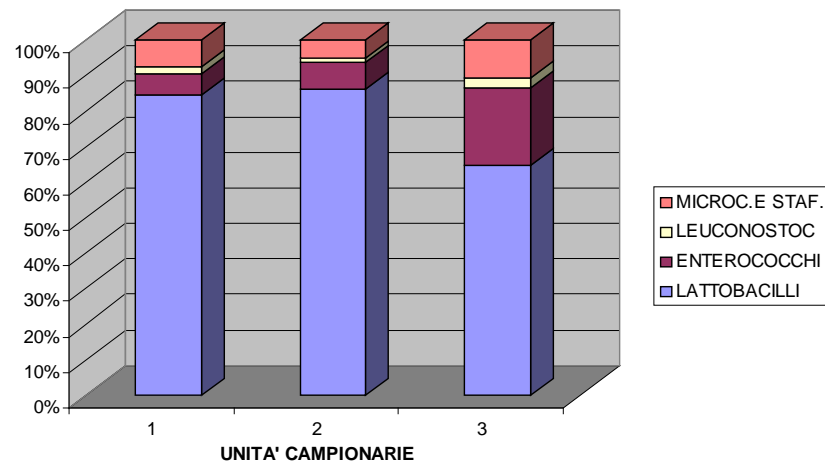
Surnatatante a pH 7

# MORTADELLA NOSTRALE/1

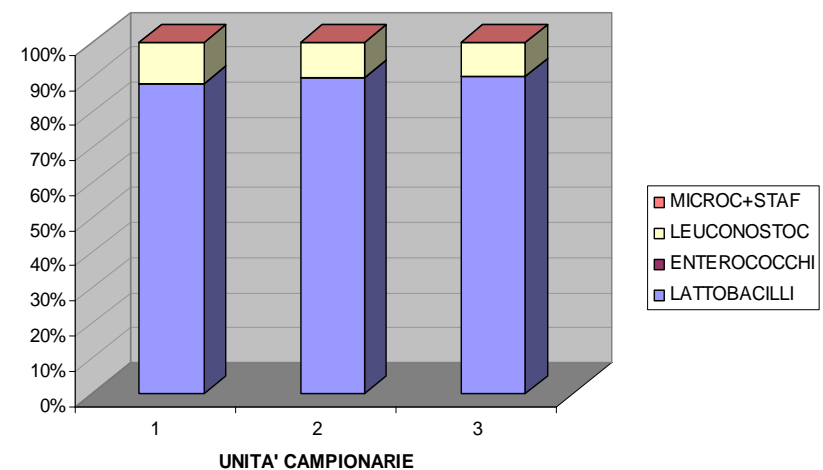


# MORTADELLA NOSTRALE/2

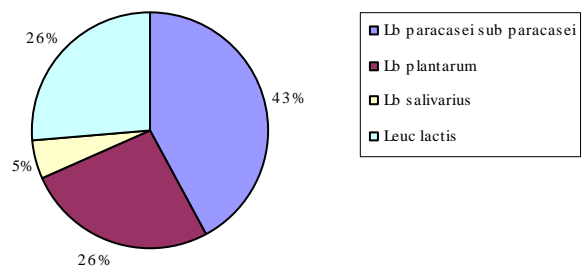
FLORA NATURALE SALAME I LOTTO



FLORA NATURALE SALAME II LOTTO

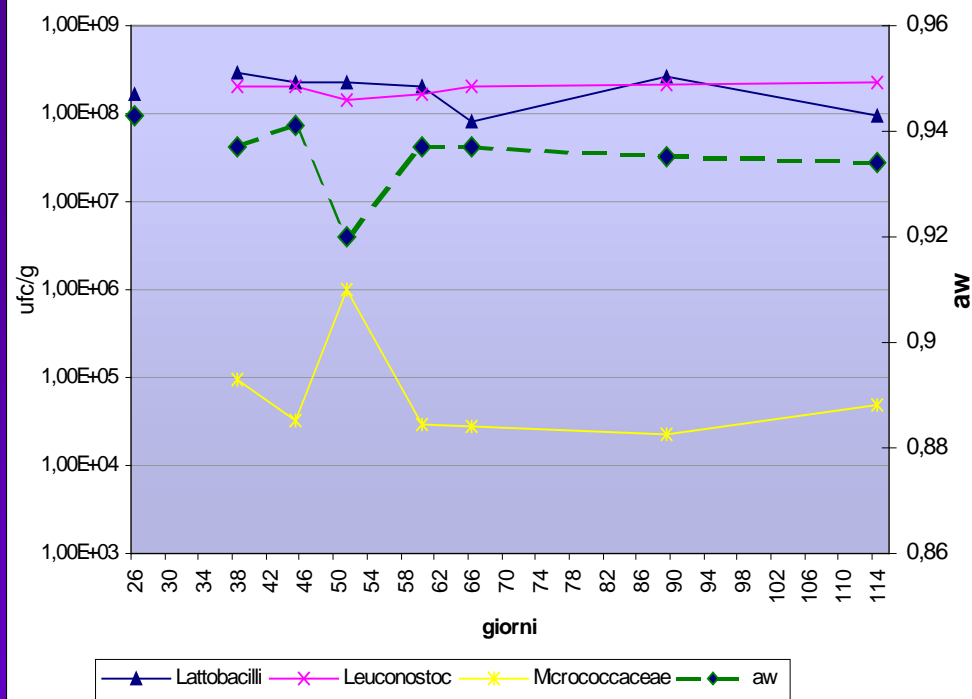


COMPOSIZIONE DEI LATTOBACILLI (21 ceppi)

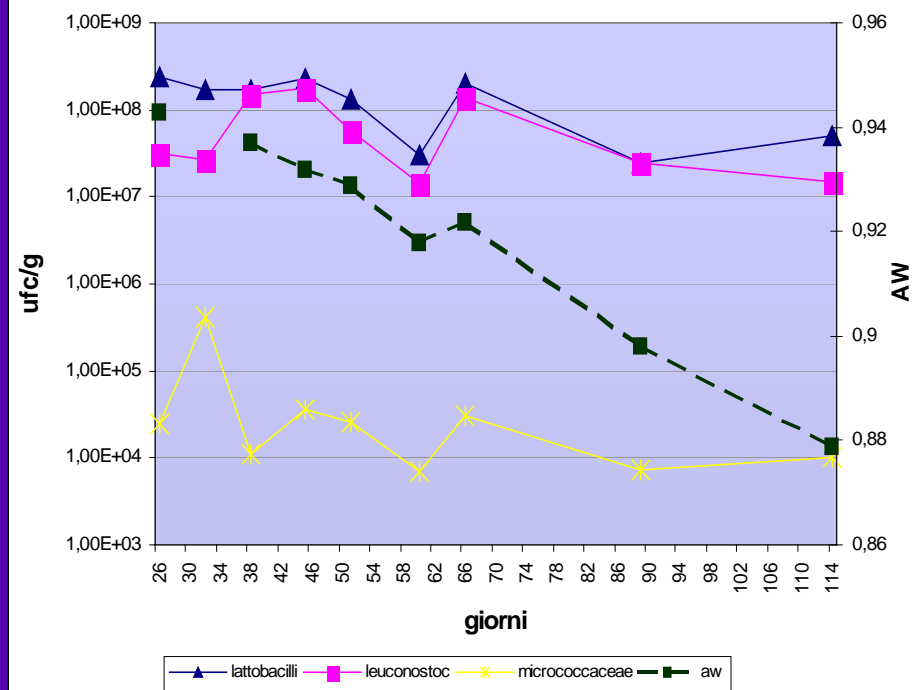


# MORTADELLA NOSTRALE/3

ANDAMENTO FLORA NATURALE MORTADELLA  
NOSTRALE 4°C



ANDAMENTO FLORA NATURALE MORTADELLA NOSTRALE 14°C





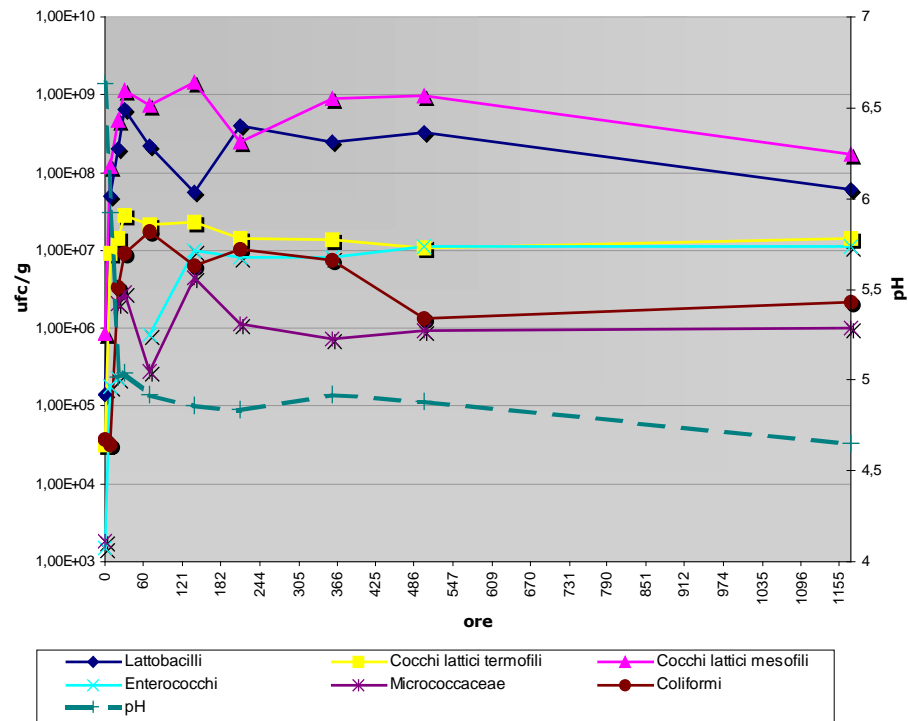
# PECORINO A LATTE CRUDO



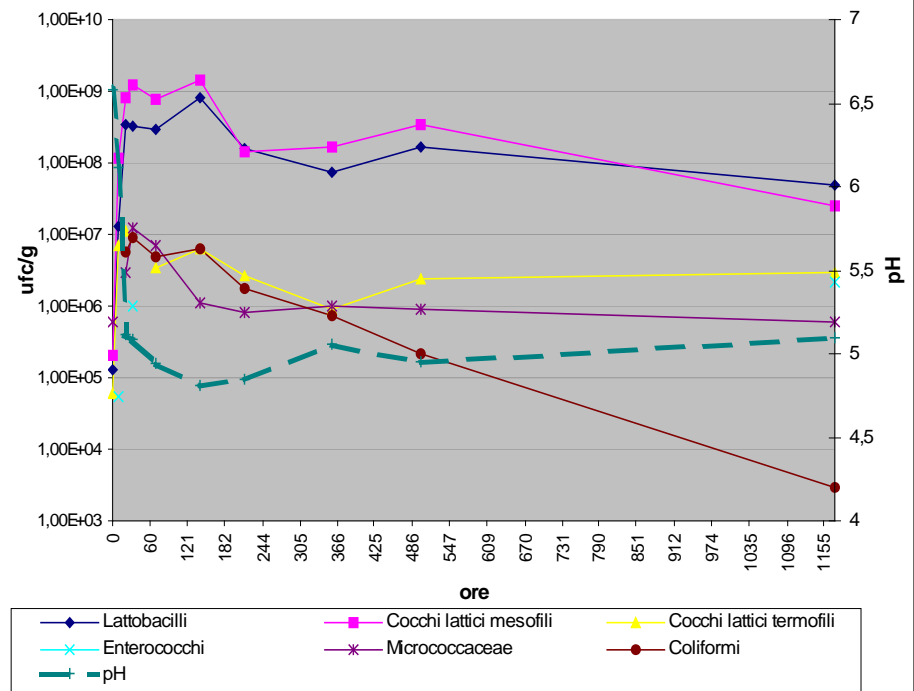


# PECORINO A LATTE CRUDO/2

**MICROFLORA PECORINO NON CONTAMINATO**



**MICROFLORA PECORINO CONTAMINATO**



## PECORINO A LATTE CRUDO/3



**Attività antagonista di LAB verso un m.o. indicatore**

## SVILUPPI FUTURI

- IDENTIFICAZIONE CON METODI BIOCHIMICI E/O MOLECOLARI DELLE SPECIE DI LAB CHE COSTITUISCONO LA FLORA LATTICA NEI PRODOTTI TRADIZIONALI ANALIZZATI
- APPROFONDIMENTO DELL'ATTIVITA' ANTAGONISTICA DEI CEPPI SELEZIONATI CON PARTICOLARE RIGUARDO ALLA POSSIBILE PRODUZIONE DI BATTERIOCINE
- COSTITUZIONE DI UNA CEPPOTECA DI BATTERI LATTICI AUTOCTONI AD ELEVATA CAPACITA' ANTAGONISTICA VERSO M.O. PATOGENI ALLO SCOPO DI UTILIZZARLI NELLE PRODUZIONI TRADIZIONALI E NON PER INCREMENTARE LA SICUREZZA MICROBIOLOGICA

## LABORATORIO ALIMENTI, IZSLT PISA



## BIBLIOGRAFIA

- Villani F (2007) Microbiologia degli alimenti, <http://wpage.unina.it/villani>
- Parente, I principali gruppi di batteri nelle fermentazioni alimentari, <http://www2.unibas.it/parente/Starter/gruppi.html>
- Parente E, Starter batterici per gli insaccati fermentati, <http://www2.unibas.it/parente/Starter/startercarni.html>
- Parente E, (2007) Microbiologia degli alimenti 1, <http://www.unibas.it/utenti/parente/ftppersonale/MAL1/MAL1L12conservv3.pdf>
- Mora D (2007) Biologia dei Microrganismi di Interesse Alimentare, <http://www.distam.unimi.it/~dmora/index.htm>
- Jay JM (2005) Modern food microbiology, Springer USA
- Clementi F et al, Qualità e sicurezza dei prodotti tipici: il ruolo della microbiologia agraria, Int J Agron 3/2009
- Lopez MC, L'utilizzazione delle colture starter nella lavorazione di insaccati, Ingegneria alimentare 4/2000
- Giraffa G et al, Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology, Research in microbiology, 161/2010
- Khan H et al, Enterocin in food preservation, Int J Food Microbiology 141/2010
- Ercolini D, PCR DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food, J Microb Methods 56/2004
- Randazzo CL et al., Application of molecular approaches to study lactic acid bacteria in artisanal cheeses, J Microb Methods 78/2009