



# I BATTERI LATTICI NEGLI ALIMENTI

CARLA MILIONI, IZS LAZIO E TOSCANA

VALUTAZIONE CRITICA DEI RISULTATI DELLE ANALISI MICROBIOLOGICHE SUGLI ALIMENTI

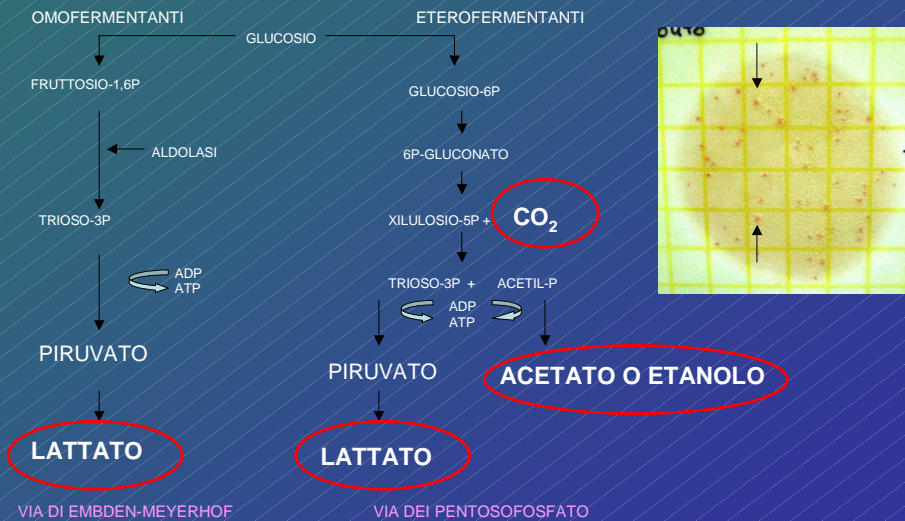
Pisa, 10-11 maggio 2011

## LACTIC ACID BACTERIA (LAB)

- BATTERI GRAM +, NON SPORIGENI
- A FORMA DI BASTONCELLI, COCCHI O COCCO-BACILLI
- CATALASI E OSSIDASI NEGATIVI
- MOLTO ESIGENTI NUTRIZIONALMENTE
- ANAEROBI AEROTOLLERANTI
- ACIDO TOLLERANTI
- HANNO METABOLISMO STRETTAMENTE FERMENTATIVO

(Axelsson, 1998)

## 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

- 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)

## GLI ALIMENTI FERMENTATI

Rispetto alle materie prime da cui originano gli alimenti fermentati sono caratterizzati da:

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

## FORMAGGI

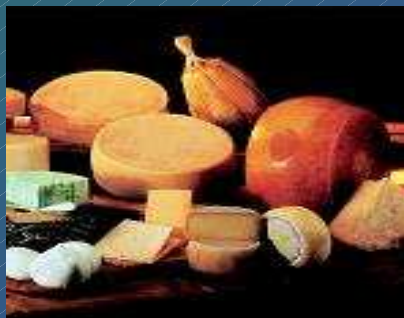
BATTERI LATTICI:

• **MESOFILI OMOFERMENTANTI:** *Lc lactis sub - lactis*, *-cremoris*, *Lb casei* e *paracasei* (nella maturazione)

• **MESOFILI ETEROFERMENTANTI:** *Leuc mesenteroides cremoris*, *Leuc lactis* (utilizzano il citrato)

• **TERMOFILI OMOFERMENTANTI:** *Lb helveticus*, *Lb delbrueckii sub delbrueckii* e *lactis*, *S thermophilus*

• *E. faecium*, *faecalis* e *durans*



## SALUMI INSACCATI CRUDI FERMENTATI

BATTERI LATTICI:

**MESOFILI OMOFERMENTANTI:** *Lb sakei*, *Lb curvatus* (salumi maturati a  $T < 25^{\circ}\text{C}$ ) *Lb plantarum*, *Pc acidilactici*, *Pc pentosaceus* (nei salumi a rapida acidificazione,  $> 25^{\circ}\text{C}$ ).  
In Europa si usano starter di *Lb sakei* e *curvatus* con *S. carnosus* e *S. xilosus* mentre in Nord America prevale l'uso di *Lb plantarum* con *Pc Acidilactici* e *Pc pentosaceus*



## YOGURT E LATTI FERMENTATI

BATTERI LATTICI:

• **TERMOFILI OMOFERMENTANTI:** *Lb delbrueckii sub bulgaricus*, *S thermophilus* (YOGURT)

• **MESOFILI OMO ED ETEROFERMENTANTI:** *Lb brevis*, *Lb casei*, *Leuc mesenteroides* (KEFIR)

## VEGETALI FERMENTATI

BATTERI LATTICI:

• **MESOFILI OMOFERMENTANTI:** *Lb plantarum*, *Lb sakei*, *Pc acidilactici*, *Pc pentosaceus*

• **MESOFILI ETEROFERMENTANTI:** *Leuc mesenteroides*



## PANE E PRODOTTI DA FORNO

BATTERI LATTICI:

• MESOFILI ETEROFERMENTANTI:

Lb sanfranciscensis, Lb brevis, Lb plantarum  
(eterof facoltativo)

• TERMOFILI ETEROFERMENTANTI:

Lb fermentum



## VINO E BIRRA

BATTERI LATTICI:

Oenococcus oeni

## 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

## FATTORI NELLA SCELTA DELLE COLTURE STARTER

- **microflora naturale:** 1) nei prodotti tipici la microflora autoctona gioca un ruolo importante nel determinare le caratteristiche organolettiche del prodotto finito;  
2) negli insaccati, a differenza dei prodotti lattiero-caseari, non è possibile pastorizzare la materia prima per ridurre la microflora naturale;
- **caratteristiche dell'impasto:** presenza di ingredienti che possono favorire o limitare la crescita della coltura starter;
- **tecnologia:** trattamenti che possono influenzare la crescita della coltura starter, modifiche del pH e/o dell' $a_w$  durante la maturazione del prodotto;
- **funzioni che la coltura starter deve svolgere:** le caratteristiche tecnologiche delle colture starter sono spesso ceppo-specifiche: non tutti i ceppi della stessa specie potrebbero essere adatti ad un determinato prodotto.

## 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

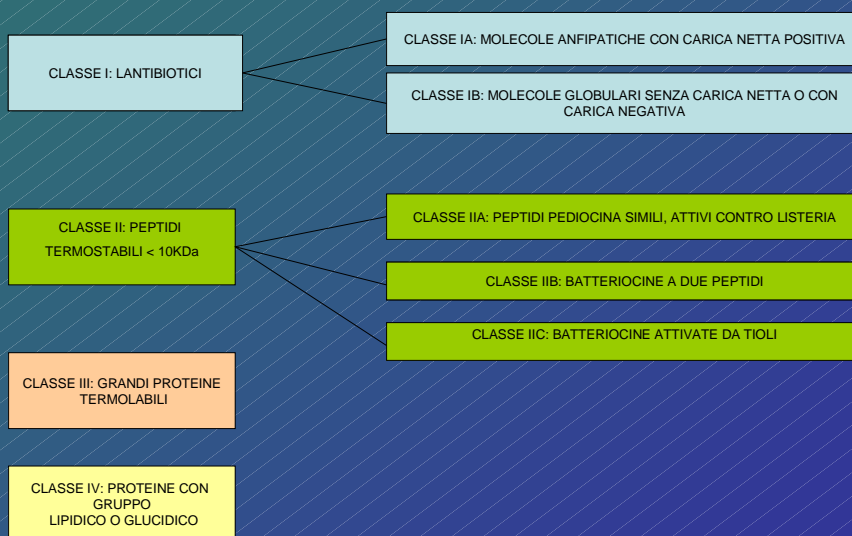
(Villani, 2007)

# BATTERIOCINE

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)





## Application of bacteriocins in the control of foodborne pathogenic and spoilage bacteria

Galvez A et al., Crit Rev Biotechnol. 2008

BACTERIOCINA	PRODUTTORE	ALIMENTO	SPETTRO INIB	N.RO STUDI
NISINA	Lc lactis	Formaggi creme fermentate Prodotti a base di latte o formaggio	L monocytogenes S aureus, Bcereus C tyrobutyricum	Forma purificata (11) Ceppo prod. (7)
LACTICINA 3147	Lc lactis	Formaggi, latte, yogurt	L monocytogenes S aureus,	Forma purificata (3) Ceppo prod. (7)
ENTEROCINE	E faecium, E faecalis	Formaggi, yogurt, latte, prodotti a base di latte	L monocytogenes S aureus B cereus	Forma purificata (8) Ceppo prod. (11)
PEDIOCINE ( PA-AcH)	Lb plantarum, (Lc lactis, S thermophilus)	Formaggi, creme, crema di formaggio	L monocytogenes, S aureus, E.coli O:157	Forma purificata (4) Ceppo prod. (8)
TERMOFILINE	S thermophilus, S macedonicus	Formaggi, yogurt	L monocytogenes C tyrobutyricum Pediococchi	Ceppo prod. (8)

Tot: 67

BACTERIOCINA	PRODUTTORE	ALIMENTO	SPETTRO INIB	N.RO STUDI
NISINA	Lc lactis	Carne cruda, carne conf. Sottovuoto, salumi fermentati	L monocytogenes Spoilage bacteria (LAB e B thermosphacta), Salmonella, E coli O:157	Forma purificata (10) Ceppo prod. (7)
LACTACINE	Lc lactis	Carne cruda conf., salumi fermentati	L monocytogenes, spoilage LAB	Forma purificata (1) Ceppo prod (4)
ENTEROCINE	E faecium, E faecalis	Carne cruda, salumi fermentati	L monocytogenes S aureus	Forma purificata (2) Ceppo prod. (5)
PEDIOCINE	Pc acidilactici Lb plantarum	Carne bovina e suina cruda, salumi fermentati	L monocytogenes Spoilage LAB	Forma purificata (8) Ceppo prod. (8)
CURVACINA	Lb curvatus	Salumi fermentati	L monocytogenes	Ceppo prod (4)
SAKACINA	Lb sakei	Salumi fermentati, carne cruda macinata	Enterococchi, L monocytogenes, spoilage bacteria	Ceppo prod. (12)

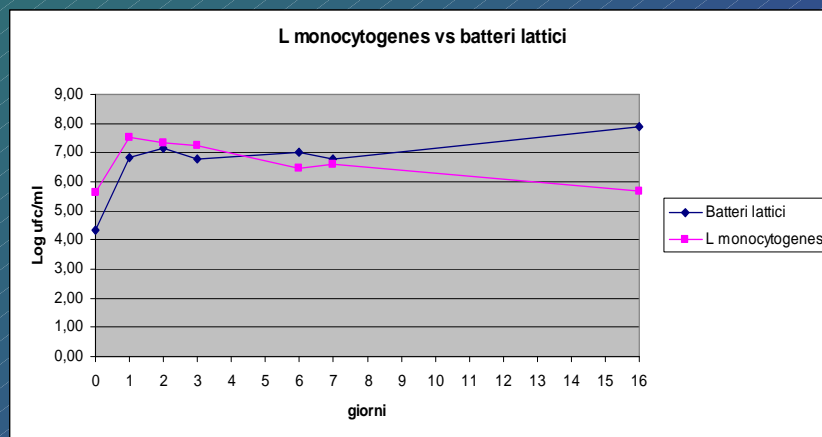


## PROVE DI CHALLENGE TEST "IN PROVETTA"



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

## RISULTATI PRELIMINARI



## 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).

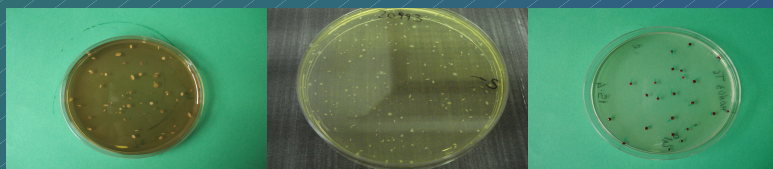
Sugli isolati: prove specifiche per determinare l'attività acidificante, proteolitica, autolitica o la produzione di batteriocine

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



PCR DGGE

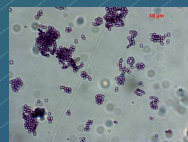
## METODI CULTURALI



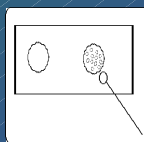
MRS agar

M17 agar

Slanetz-Bartley agar



color. gram



catalasi



ossidasi



Leuconostoc  
mesenteroides  
99.1%



Lactobacillus  
paracasei sub  
paracasei 97.1%

# PCR DGGE

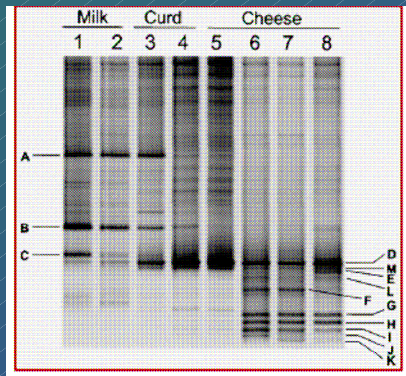
Applied and Environmental Microbiology, Apr. 2002, p. 1522-1527  
 0093-2542/02/\$08.00 DOI: 10.1128/AEM.68.4.1522-1527.2002  
 Copyright © 2002, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

**Diversity, Dynamics, and Activity of Bacterial Communities during Production of an Artisanal Sicilian Cheese as Evaluated by 16S rRNA Analysis†**

Cinzia L. Randazzo,<sup>1,2</sup> Sandra Torriani,<sup>2</sup> Antonio D. L. Akkermans,<sup>1</sup> Willem M. de Vos,<sup>1</sup> and Elaine E. Vaughan<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Microbiology, Department of Agricultural and Food Sciences, Wageningen University, 6705 ST Wageningen, The Netherlands, and <sup>2</sup> Laboratory of Microbiology, Department of Gene Plant, Biotechnology and Food Science, University of Catania, Catania, Italy

Received 22 August 2001; accepted 14 January 2002.



DGGE of PCR products of the V6 to V8 regions of 16S rDNA that represent the biodiversity in samples taken during Ragusano cheese manufacture provided by farmer I. Lanes: 1, milk; 2, milk with added rennet; 3, curd; 4, curd after fermentation; 5, fresh cheese; 6 and 7, 15- and 30-day ripened cheese, respectively; and 8, a 15-day ripened cheese provided by the same farmer after a period of 6 months. The positions of bands discussed in the text are indicated by letters that correspond to species of bacteria: A, *Macrococcus caseolyticus*; B, *Lactococcus lactis*; C, *Leuconostoc mesenteroides*; D, *Streptococcus thermophilus*; E, *Streptococcus bovis*; F, G, H, I, and J, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; K, *Lactobacillus fermentum*; L, *Lactobacillus casei*; and M, *Enterococcus hirae*. The identification of the bands is discussed in the text.

## CONCLUSIONI

- I LAB fanno parte della microflora presente negli alimenti fermentati apportando benefici effetti sulle caratteristiche organolettiche, nutrizionali e di sicurezza microbiologica degli alimenti stessi
- Nei “prodotti agroalimentari tradizionali” (PAT) fermentati è la composizione della microflora autoctona (associata specificamente a materie prime ed ambienti di produzione) che determina le caratteristiche nutrizionali e sensoriali tipiche, pertanto lo studio dell'ecologia microbica di questi prodotti si rivela cruciale ai fini della valorizzazione dei prodotti stessi
- L'isolamento di ceppi di LAB con particolari caratteristiche protecnologiche e/o protettive da alimenti fermentati tradizionali può portare alla raccolta di colture potenzialmente utilizzabili come starter di origine autoctona

## 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

# Grazie per l'attenzione

