

# INDUSTRIE ALIMENTARI



#### **FORMAGGIO**

#### LUCA COCOLIN\* - ANTONIO VALENTE -VALENTINA ALESSANDRIA - GIUSEPPE ZEPPA

Di.Va.P.R.A. Sezione di Microbiologia Agraria e Tecnologie Alimentari, Facoltà di Agraria -Università degli Studi di Torino - Via Leonardo da Vinci 44 - 10095 Grugliasco - Torino - Italia \*e-mail: lucasimone.cocolin@unito.it

# **BATTERI PROBIOTICI** IN FORMAGGI **FRESCHI: VALUTAZIONE DELLE CARATTERISTICHE** TECNOLOGICHE E VITALITÀ

Probiotic bacteria in fresh cheeses: technological characterization and vitality

Parole chiave: probiotici, alimenti funzionali, formaggi freschi, tecnica di caseificazione, Lactobacillus acidophilus LA-5, Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus casei Shirota Key words: probiotics, functional foods, fresh cheeses, cheese manufacturing, Lactobacillus acidophilus LA-5, Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus casei Shirota

## INTRODUZIONE

Si definiscono batteri probiotici quei microrganismi vivi che, in seguito alla loro ingestione, portano ad un miglioramento della salute umana (Tannock, 2002; Morelli, 2000).

Non esiste una definizione condivisa delle caratteristiche che i microrganismi probiotici devono possedere per essere considerati tali. Su alcuni requisiti generali e funzionali esiste tuttavia una generale concordanza di opinioni tra gli esperti. I microrganismi probiotici devono avere effetti benefici sulla salute umana, devono esser stati isolati dall'intestino umano e quindi essere normali componenti della microflora dell'intestino umano. Sull'origine della microflora intestinale è rivolta oggi l'attenzione della comunità scientifica e dibattiti e ricerche sono orientati nel definire la microflora intestinale "caratteristica". È stato proposto di considerare probiotici anche microrganismi di altra origine se effettivamente in grado di produrre effetti benefici sull'intestino (Torriani e Marzotto, 2007).

I batteri probiotici devono inoltre essere biosicuri e non causare quindi effetti collaterali negativi. Devono presentare caratteristiche di resistenza e vitalità ed essere in grado di sopravvivere al pH gastrico e ai succhi biliari e pancreatici, in modo da raggiungere l'ileo e il colon indenni e ancora perfettamente vitali. Infine, devono esser in grado di aderire all'epitelio intestinale e di colonizzare il tratto gastrointestinale (FAO/WHO, 2002).

In anni di studi, è stato dimostrato che l'utilizzo di specifici ceppi probiotici apporta benefici per la salute umana. I principali effetti salutistici per l'uomo attribuibili ai batteri probiotici sono: digestione del lattosio, proprietà antimicrobiche,

#### **SUMMARY**

In this paper we describe the technological characterisation and the evaluation of three lactobacilli (Lactobacillus acidophilus LA-5, Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus casei Shirota), recognized as probiotic strains, for the production of a fresh cheese with high counts of probiotic microorganisms. After the first step, investigating the capabilities of the strains to grow and acidify in milk, we optimised a cheese manufacturing protocol that allowed the production of the probiotic fresh cheese. All the three strains tested showed, with different dynamics, a growth during production and storage, reaching a count of 10<sup>8</sup> colony forming units/g at day 15. Due to the lack of strong acidification, the cheese obtained resulted to be easily spoiled by yeasts and coliforms, most probably coming from the environment.

This evidence highlighted the necessity
of determining the shelf-life of the product in 8 days from the production. This study demonstrates the possibility to use probiotic strains also in different products, other than yoghurt or fermented milks, allowing to offer a wider range of functional products to the final consumer.

#### **SOMMARIO**

In questo lavoro si sono valutate le caratteristiche tecnologiche e le attitudini alla produzione di un formaggio fresco da parte di tre ceppi di lattobacilli (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, Lactobacillus rhamnosus GG e Lactobacillus casei Shirota) riconosciuti come ceppi con attività probiotica. L'obiettivo che si è voluto raggiungere è stato quello di produrre un formaggio con elevate cariche di probiotici. Dopo una prima caratterizzazione dei tre ceppi probiotici, si è ottimizzata una tecnica di caseificazione che ha reso possibile la produzione di un formaggio fresco. Tutti i ceppi testati hanno mostrato, anche se in maniera differenziata, una crescita durante la produzione e la conservazione, raggiungendo delle cariche pari a 8 Log unità formanti colonie/g al 15° giorno. Avendo però questi ceppi una bassa capacità acidificante, il formaggio ottenuto è stato facilmente attaccato ed alterato da lieviti e coliformi provenienti dall'ambiente, andando così a determinare uno scadimento organolettico già all'8° giorno dalla produzione. Questo studio dimostra comunque la possibilità di utilizzare ceppi probiotici anche in prodotti diversi da yogurt o latti fermentati, in modo da allargare la scelta di alimenti funzionali per il consumatore finale.

modulazione della microflora intestinale, stimolazione del sistema immunitario, effetto antimutagenico e anticarcinogenico e controllo del livello di colesterolo nel sangue (Torriani e Marzotto, 2007).

Il crescente interesse verso gli aspetti salutistici degli alimenti e l'aumento di informazioni scientifiche relative alla qualità dei cibi hanno stimolato la diffusione e la formulazione di una categoria particolare di alimenti definiti "funzionali", che, oltre alle tradizionali caratteristiche nutritive intrinseche, contengono particolari componenti che aumentano le proprietà benefiche per la salute. Gli alimenti funzionali che contengono probiotici sono, per lo più, latti fermentati e prodotti a base di yogurt. Dal punto di vista della tecnologia alimentare, i prodotti contenenti probiotici richiedono un'accurata valutazione della stabilità dei batteri fino al momento del consumo (Mucchetti e Neviani, 2006).

Lo scopo di questa ricerca è stato quello di studiare le caratteristiche tecnologiche di tre ceppi con caratteristiche probiotiche, appartenenti al genere *Lactobacillus*. Successivamente in una seconda fase, si è passati alla realizzazione di una tecnologia di caseificazione per la produzione di formaggi freschi contenenti tali ceppi, al fine di valutarne lo sviluppo e le modalità di crescita.

# MATERIALI E METODI

#### Approccio sperimentale

Questo lavoro è stato organizzato in due fasi distinte. In un primo momento si sono studiate le caratteristiche tecnologiche dei ceppi probiotici, quali *Lactobacillus acidophilus LA-5*, *Lactobacillus rhamnosus GG* e *Lactobacillus casei Shirota*, per poi realizzare una tecnica di micro-caseificazione per la produzione di formaggi freschi contenenti i ceppi probiotici.

## Crescita e sviluppo dei ceppi probiotici

La crescita in brodo dei ceppi probiotici è avvenuta in terreno MRS (Oxoid, Milano), a cui è stata aggiunta L-Cisteina 98% (Sigma, Milano) in concentrazione dello 0,05%. Il terreno di coltura utilizzato per le conte è stato MRS agar (Oxoid) addizionato di sali biliari (Sigma) in concentrazione dell'1% (p/v), in modo da rendere esclusiva la crescita dei batteri probiotici.

# Determinazione dell'acidificazione e sviluppo in latte

Per ogni ceppo rivitalizzato in brodo MRS con L-Cisteina, è stata prelevata un'aliquota di 50 μL e posta in una Falcon sterile con 30 mL di latte UHT. Questa operazione è stata eseguita per ogni ceppo e per ogni ceppo sono state effettuate tre repliche. Per ciascuna provetta Falcon è stato misurato il pH sia subito dopo l'inoculo (tempo zero) che dopo 24 h di incubazione in termostato a 37°C. Sono stati inoltre prelevati 100 µL sia a tempo zero, sia dopo l'incubazione di 24 h a 37°C e sono state allestite le diluizioni seriali in soluzione Ringer (Oxoid). Da ciascuna diluizione è stato prelevato 0,1 mL e spatolato in capsula Petri su MRS Agar con sali biliari. Le piastre sono state incubate (per 48 h a 37°C) in condizioni di anaerobiosi, mediante l'utilizzo di apposite giare.

#### Tecnologia di caseificazione

In laboratorio è stato messo a punto un metodo di micro-caseificazione per la produzione di formaggi freschi addizionati con i ceppi probiotici. Si è scelto di non utilizzare colture starter. Per ogni caseificazione sono stati utilizzati 4 litri di latte pastorizzato di alta qualità di provenienza piemontese. Al latte portato ad una temperatura di 38,5°-39°C sono stati aggiunti il ceppo probiotico con una carica di 9 Log ufc/mL e 2,3 mL di caglio liquido. Al termine di una fase di riposo di 40 minuti, il coagulo, raggiunto un sufficiente grado di rassodamento, è stato rotto utilizzando una paletta in acciaio settata e la cagliata posta nelle fascere dove è stata rivoltata più volte per favorire lo spurgo del siero. Le fascere sono state quindi poste in cella termostata a 25°C per 18 h per la stufatura. Trascorso questo tempo sono state rivoltate su di un piano di lavoro precedentemente sanitizzato con alcool etilico ed ogni formaggio è stato confezionato a mano con apposita carta oleata per alimenti e posto in cella frigorifera alla temperatura di +4°C con un'umidità relativa del 90%. I formaggi sono stati stagionati 15 giorni.

# Campionamenti microbiologici e misurazione del pH

Per ogni singolo ceppo probiotico sono state effettuate due micro-caseificazioni, per un totale di sei micro-caseificazioni. Per ogni singola caseificazione sono stati monitorati l'andamento del pH, le dinamiche microbiche dei ceppi probiotici, dei coliformi e di lieviti e muffe.

La misurazione del pH è stata ef-

fettuata nel latte prima dell'inoculo, nella cagliata e al 1°, 4°, 8°, 10° e 15° giorno mediante un pHmetro CRISON modello MicropH2001. Per le analisi microbiologiche, sono stati campionati il latte di partenza, il latte dopo l'inoculo del probiotico, la cagliata e i formaggi al 1°, 4°, 8°, 10° e 15° giorno. I campioni sono stati sottoposti a conta microbica secondo il metodo classico di allestimento delle diluizioni seriali e diffusione in piastra. Per quanto riguarda il campionamento di liquidi si è proceduto al prelevamento diretto di  $100 \mu L$ . Per i campioni solidi, cagliata e formaggi nei diversi giorni, sono stati pesati 10 g di campione in sacchetti sterili, ai quali sono stati aggiunti 40 mL di soluzione Ringer, per ottenere una diluizione 1:5 e dalla quale si è proceduto con le diluizioni seriali. La stima dello sviluppo dei batteri probiotici è avvenuta mediante semina su MRS con sali biliari. Le piastre sono state incubate in microaerofilia mediante giara in termostato alla temperatura di 37°C per 48 ore. I coliformi sono stati determinati mediante inclusione a doppio strato su terreno selettivo VRBL agar (Oxoid). Le piastre dopo l'inoculo sono state incubate in termostato alla temperatura di 37°C per 24 ore. I lieviti e le muffe sono stati isolati su terreno Malt Extract Agar (Oxoid) con tetraciclina (1  $\mu$ g/mL, Sigma). Le piastre dopo l'inoculo sono state incubate in termostato alla temperatura di 25°C per 4 giorni.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel presente studio si è voluto studiare le attitudini tecnologiche di tre ceppi probiotici per un loro utilizzo nella produzione di un formaggio fresco. In una prima fase del lavoro, si sono determinate le capacità acidificanti e di crescita dei ceppi in latte, per poi testarli direttamente in micro-caseificazione nella seconda parte dello studio. Per quanto riguarda la capacità acidificante dei ceppi, il pH del latte subito dopo l'inoculo dei tre ceppi era circa 6,50. Dopo ventiquattro ore, tutti i campioni hanno presentato una diminuzione del loro pH. Il latte contenente il ceppo L. casei Shirota ha evidenziato la diminuzione maggiore, portandosi a un valore di 5,87, mentre L. acidophilus LA-5 ha presentato un

pH di 6,17. Il campione di latte contenente il ceppo L. rhamnosus GG è risultato essere il campione con la diminuzione minore (pH 6,30). Le conte dei tre ceppi probiotici inoculati in latte, isolati su terreno MRS agar con sali biliari, a tempo 0 e a 24 ore, hanno presentato incrementi differenti. Il ceppo L. casei Shirota partendo da una concentrazione iniziale nel latte di 6,64 Log ufc/mL ha mostrato un aumento di due ordini di grandezza dopo le ventiquattro ore, portandosi ad una concentrazione finale di 8,35 Log ufc/mL. L. acidophilus LA-5 e L. rhamnosus GG hanno mostrato un incremento di un solo ordine di grandezza, portandosi da valori di circa 6 a 7 Log ufc/mL.

Quando i ceppi sono stati utilizzati come inoculi nelle micro-caseificazioni, i valori di pH hanno mostrato degli andamenti diversi, come evidenziato in fig. 1. Le caseificazioni con L. casei Shirota hanno presentato un'acidificazione più netta: partendo da valori di 6,63 in cagliata si è arrivati gradualmente al 15° giorno ad un pH di 5,79. I formaggi inoculati con *L*. acidophilus LA-5 hanno presentato anch'essi una diminuzione di pH, ma la riduzione è stata decisamente inferiore e partendo da un pH di 6,67 si è arrivati ad un valore finale al 15° giorno di 6,15. Le caseificazioni con il ceppo L. rhamnosus GG hanno mostrato una diminuzione graduale di pH fino al 8° giorno, per poi arrivare a fine sperimentazione a un valore di 5,99.

I risultati, ottenuti monitorando le dinamiche microbiche dei formaggi ottenuti con l'utilizzo dei ceppi probiotici, sono mostrati nelle fig. 2, 3 e 4. In fig. 2 sono presentate le dinamiche di crescita del ceppo L. casei Shirota,

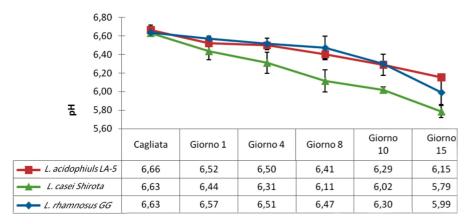


Fig. 1 - Curve di acidificazione dei ceppi probiotici durante la produzione e la conservazione dei formaggi. I valori riportati sono la media delle due prove effettuate per ogni ceppo.

dei coliformi e dei lieviti durante la produzione e la conservazione del formaggio fresco. Si può evincere la presenza e lo sviluppo del ceppo probiotico fino al 15° giorno, ultimo campionamento preso in considerazione. Da una concentrazione del ceppo iniziale di 5,81 Log ufc/mL nel campione latte inoculato, si è arrivati ad una concentrazione di 8,10 Log ufc/g nel formaggio a 15 giorni. La carica del probiotico è rimasta costante nella cagliata, in seguito è aumentata fino a raggiungere il valore massimo di 8,51 Log ufc/g nel campione di formaggio all'8° giorno, per poi scendere a 15 giorni a valori di 7,85 Log ufc/g. Nei campioni di latte inoculato e cagliata non è stata rilevata alcuna carica di coliformi. Mentre dal 1° giorno, con carica di 4,12 Log ufc/g, si è assistito a un loro progressivo aumento fino ad arrivare a 5,63 Log ufc/g al 15° giorno. Per quanto riguarda i lieviti, sono risultati assenti nei campioni latte e cagliata, crescendo poi durante la fase di conservazione del formaggio. L'andamento di crescita dei lieviti è stato simile a quello dei coliformi, differendo sui valori finali. La concentrazione di carica finale è stata di 6,82 Log ufc/g nel campione al 15° giorno.

In fig. 3, sono mostrati gli andamenti di crescita del ceppo L. acidophilus LA-5, dei coliformi e dei lieviti durante la produzione e la conservazione del formaggio. La crescita di L. acidophilus LA-5 è stata caratterizzata da una leggera diminuzione nel passaggio iniziale, tra i campioni di latte inoculato e cagliata, per poi raggiungere nei campioni a 15 giorni una concentrazione di 8,39 Log ufc/g. Rispetto alla caseificazione precedente, i coliformi hanno mostrano una

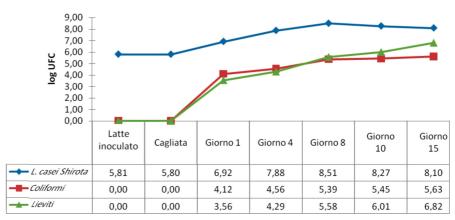


Fig. 2 - Dinamiche microbiche durante la produzione e la stagionatura dei formaggi prodotti con l'utilizzo di Lactobacillus casei Shirota. I valori sono espressi come Log unità formanti colonia per mL o g di prodotto e sono la media delle due prove effettuate.

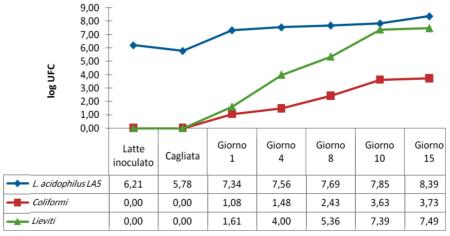


Fig. 3 - Dinamiche microbiche durante la produzione e la stagionatura dei formaggi prodotti con l'utilizzo di Lactobacillus acidophilus LA-5. I valori sono espressi come Log unità formanti colonia per mL o g di prodotto e sono la media delle due prove effettuate.

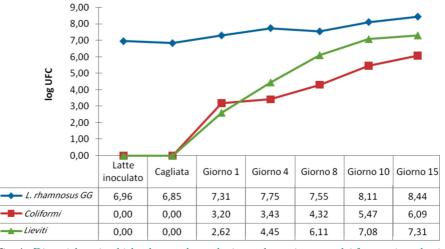


Fig. 4 - Dinamiche microbiche durante la produzione e la stagionatura dei formaggi prodotti con l'utilizzo di Lactobacillus rhamnosus GG. I valori sono espressi come Log unità formanti colonia per mL o g di prodotto e sono la media delle due prove effettuate.



Fig. 5 - Formaggio fresco prodotto in questo studio a diversi tempi di conservazione.

crescita sostanzialmente ridotta, spiegabile presumibilmente da una minore contaminazione iniziale e nei campioni di latte inoculato e cagliata non sono state rilevate colonie. Nei campioni del 1ºgiorno, la carica di coliformi è stata dell'ordine di 1 Log ufc/g ed è aumentata gradualmente fino a raggiungere nei campioni a 15 giorni valori di 3,73 Log ufc/g. I lieviti sono stati rilevati dal campionamento al 1° giorno registrando una carica di 1,61 Log ufc/g che è aumentata in maniera considerevole e graduale fino al 10° giorno, per poi mantenersi costante fino al 15° giorno (7,49 Log ufc/g).

Infine, in fig. 4 sono indicati gli andamenti di crescita del ceppo L. rhamnosus GG, dei coliformi e dei lieviti durante la produzione e conservazione del formaggio. La crescita del ceppo probiotico non ha evidenziato incrementi o decrementi significativi della carica. La carica iniziale è risultata essere più alta rispetto alle altre caseificazioni. Tale valore è aumentato nei successivi giorni di campionamento, raggiungendo il valore di

8 Log ufc/g nell'ultimo giorno di campionamento. I coliformi assenti in latte e cagliata hanno evidenziato una carica di 3,20 Log ufc/g al 1° giorno, raggiungendo nel campione a 15 giorni valori di 6,09 Log ufc/g. Come nelle altre caseificazioni, anche in questa, si è evidenziata l'assenza dei lieviti in latte e cagliata. La loro carica è aumentata dal 1° giorno di campionamento (2,62 Log ufc/g) fino ad arrivare ad una carica finale di 7,31 Log ufc/g.

Come mostrato in fig. 5, i formaggi freschi prodotti in questo studio hanno presentato comunque delle evidenti modificazioni già dall'ottavo giorno.

## **CONCLUSIONI**

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove è emersa la bassa capacità acidificante dei ceppi testati e questo ne ostacola l'applicazione in purezza nella produzione di formaggi. Di fondamentale importanza è risultata la stufatura, che ha favorito in modo significativo lo

sviluppo batterico e potrebbe essere vantaggiosamente utilizzata, dopo un'opportuna ottimizzazione dei parametri operativi, anche in una produzione industriale. A questo scopo sarà però necessario verifiare la possibilità di una consociazione dei batteri probiotici con i normali batteri starter utilizzati nella produzione di formaggi freschi.

Per quanto concerne invece lo sviluppo dei probiotici, si è potuta invece evidenziare una loro crescita durante le varie fasi produttive con valori della carica ancora significativi dopo 15 giorni di stagionatura e conformi a quelli che vengono scientificamente accettati come dose idonea per una temporanea colonizzazione intestinale (109- $10^7$  cellule vive) (Bottazzi, 2004).

#### RINGRAZIAMENTI

Gli Autori esprimono il loro ringraziamento al dott. Simone Guglielmetti, DISTAM, Università degli Studi di Milano, per aver fornito i tre ceppi di batteri probiotici.

#### BIBLIOGRAFIA

Bottazzi V. Latte-fermentati funzionali probiotici nuove opportunità per il benessere dell'uomo. Editore Èlite Communication Srl, Roma, 1-100, 2004.

FAO/WHO EXPERT CONSULTATION: "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food" London Ontario (Canada),

Morelli L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. Current Issues of Intestinal Microbiology, 1, 59-

Mucchetti G., Neviani E. Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza. Editore tecniche nuove, 1-101, 2006.

Tannock G.W. Probiotics and prebiotics. Where are we going? Caister Acad. Press, Norfolk, UK, 2002.

Torriani S., Marzotto M. Probiotici e prebiotici. In: Cocolin L., Comi G. (Editori), La Microbiologia Applicata alle Industrie Alimentari. Aracne Editrice, Roma, Italy, 337-358, 2007.