



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO  
FACOLTÀ DI SCIENZE AGRARIE E ALIMENTARI

Corso di laurea in Valorizzazione e Tutela  
dell'ambiente e del territorio montano

Sopravvivenza della microflora autoctona di formaggi  
di malga a latte crudo dopo digestione  
gastrointestinale *in vitro*

Relatore:  
Prof. Ivano De Noni

Laureanda:  
Viola Framba

Correlatore:  
Dott.ssa Elena Franciosi

Anno accademico 2012/2013



# Indice

<b>Capitolo 1 – Introduzione</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Il formaggio di malga</b>	<b>1</b>
1.1.1. Le malghe e l'alpeggio	1
1.1.2. I formaggi e i formaggi di malga	2
<b>1.2. Ecologia microbica dei formaggi di malga</b>	<b>6</b>
1.2.1. Benefici per la salute esercitati dai batteri lattici	8
<b>1.3. La digestione gastrointestinale <i>in vitro</i></b>	<b>10</b>
1.3.1. La digestione	10
1.3.2. Fase gastrica	11
1.3.3. Fase intestinale	12
<b>1.4. Il microbiota</b>	<b>16</b>
<b>Capitolo 2 – Scopo del tirocinio</b>	<b>19</b>
<b>Capitolo 3 – Materiali e Metodi</b>	<b>20</b>
<b>3.1. Campionamento</b>	<b>20</b>
3.1.1. Latte fermentato	20
<b>3.2. Digestione</b>	<b>21</b>
<b>3.3. Enumerazione dei microrganismi</b>	<b>23</b>
3.3.1. Terreni utilizzati	24
3.3.2. Isolamento da piastra dei presunti batteri lattici (LAB)	26
<b>3.4. Identificazione genotipica dei batteri lattici</b>	<b>26</b>
3.4.1. Estrazione del DNA	26
3.4.2. Caratterizzazione dei ceppi mediante PCR specie-specifiche	27
<b>3.5. Analisi statistica</b>	<b>29</b>

---

<b>Capitolo 4 – Risultati</b>	<b>30</b>
<b>4.1. Conte microbiche di formaggi di malga prima e dopo         digestione.....</b>	<b>30</b>
<b>4.2. Isolamenti e identificazione.....</b>	<b>31</b>
<b>4.3. Conte microbiche di latte intero inoculato con batteri         lattici (LAB).....</b>	<b>31</b>
<b>4.4. Conte microbiche di diversi tipi di latte inoculato con         batteri lattici (LAB).....</b>	<b>33</b>
<b>4.5. Conte microbiche di formaggio e panna.....</b>	<b>34</b>
<b>Capitolo 5 – Discussione</b>	<b>36</b>
<b>Capitolo 6 – Conclusione</b>	<b>41</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>42</b>

# Capitolo 1

## Introduzione

### *1.1. I formaggi di malga*

*Il nome di «formaggio» o «cacio» è riservato al prodotto che si ricava dal latte intero ovvero parzialmente o totalmente scremato, oppure dalla crema, in seguito a coagulazione acida o presamica, anche facendo uso di fermenti e di sale (R.D.L. 15 ottobre 1925, n. 2033).*

La malga è l'insieme dei fattori produttivi dove avviene l'attività di monticazione; è costituita da pascoli, fabbricati necessari per il ricovero degli animali e del personale, infrastrutture per le operazioni di mungitura e caseificazione.

Dall'unione di questi due termini nascono dei prodotti tradizionali legati al territorio: i formaggi di malga. Beni di nicchia con caratteristiche qualitative intrinseche ed inimitabili al di fuori dell'areale d'origine, caratterizzati da un legame profondo tra prodotto e territorio di produzione.

#### *1.1.1. Le malghe e l'alpeggio*

Le malghe sono parte integrante del paesaggio dell'arco alpino, una tradizione ben radicata con origini antichissime, documenti ne mostrano la presenza già verso il 3000 a.C. L'attività d'alpeggio è una pratica zootecnica che contribuisce in modo molto positivo al mantenimento del paesaggio di alta montagna, della sua biodiversità e alla tutela del territorio; permette inoltre di sfruttare risorse non utilizzabili in altro modo.

In Trentino la proprietà degli alpeggi è per la maggior parte pubblica, a nome di Comuni ed A.S.U.C. (amministrazioni separate dei beni di uso civico) che le affidano tramite aste, ma anche collettiva ed in alcuni rari casi privata. Fino agli inizi degli anni '50 risultavano iscritte al catasto ben 606 malghe per una superficie complessiva di circa 80000 ettari (Bovolenta, 2000). Nelle ultime stagioni sono state alpeggiate mediamente 300 malghe (circa 30000 ettari) con un carico di circa 8500 vacche da latte (pari al 32% del totale); la trasformazione del

latte in alpeggio viene attuata in circa 80 malghe, gli alpeggi che non lo lavorano in quota lo conferiscono ai caseifici di valle ([www.trentinoagricoltura.it](http://www.trentinoagricoltura.it)). Di solito ci si trasferisce in malga da metà giugno a metà settembre, ma il periodo varia in base all'altitudine che va dai 1000 ai 2200 m s.l.m.. Il bestiame monticato è prevalentemente di razza Bruna Italiana, viene fatto pascolare in modo libero o guidato. L'alimentazione è a base di foraggio fresco, integrato da mangimi. Le vacche in questo arco temporale cambiano "stile di vita", da parzialmente sedentarie passano ad una vita più attiva, caratterizzata da un maggior movimento e da un'alimentazione diversa di quella alla stalla. Questi cambiamenti portano ad un calo della produzione di latte, ma ne migliorano le proprietà organolettiche.

Le caratteristiche del pascolo possono influenzare la qualità sensoriale dei formaggi principalmente attraverso modifiche delle componenti del latte; ad esempio c'è un trasferimento diretto di alcuni componenti della frazione volatile dei foraggi al latte e quindi ai formaggi (Bugaud et al. 2001). Quando la bovina è alimentata al pascolo, soprattutto se di alta quota, la composizione del latte è diversa. Ci sono più sostanze aromatiche, in particolar modo terpeni, e cambia la composizione degli acidi grassi: aumentano considerevolmente gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) e i coniugati dell'acido linoleico (CLA). Tutto ciò è influenzato dalla composizione botanica del foraggio.

### *1.1.2. I formaggi e i formaggi di malga*

Il formaggio, dal greco "messo in forma", è un prodotto lattiero-caseario; rientra quindi nella categoria dei "prodotti trasformati risultanti dalla trasformazione di latte crudo o dall'ulteriore trasformazione di detti prodotti trasformati" (Regolamento CE n°853/2004).

In modo generico il formaggio prodotto nelle malghe del Trentino viene denominato "nostrano di malga", in realtà ogni malga produce un suo formaggio con caratteristiche uniche. Tali differenze sono determinate principalmente da tre fattori: la composizione botanica dei pascoli, la flora microbica locale e il tipo di lavorazione.

I formaggi analizzati, a pasta semidura, sono stati prodotti secondo le tecnologie tradizionali dell'arco alpino. La lavorazione del latte avviene a crudo e senza l'aggiunta di *starter* (in Figura 1 sono rappresentate in modo schematico le fasi

della lavorazione), il prodotto finale è dovuto interamente a fermentazioni microbiche del tutto spontanee.

Durante il processo produttivo del formaggio di malga il latte non raggiunge temperature elevate (max 45 °C), con questo riscaldamento si opera una pressione poco selettiva sull'ecosistema microbico (Mucchetti e Neviani, 2006); che, per questo, contiene ancora batteri lattici (LAB) mesofili e termofili. Secondo uno studio fatto su un formaggio di malga trentino il valore massimo di crescita microbica si raggiunge dopo circa 24 ore dalla lavorazione; con prevalenza della flora lattica di forma coccica, sia termofila che mesofila. (Poznanski et al., 2004).

Le forme ottenute in malga hanno peso variabile tra i 6 e i 12 kg; vengono stagionate su assi di legno in locali ventilati, a temperatura ed umidità controllate, e commercializzate già a pochi mesi di maturazione.



Figura 1: Rappresentazione schematica delle fasi di lavorazione del formaggio di malga, dal latte al prodotto finito.



### *Maturazione*

Il formaggio di malga subisce un processo di maturazione influenzato in gran parte dalle fermentazioni spontanee dalla microflora autoctona del latte, ma anche dalle condizioni climatiche (temperatura, umidità, ventilazione) dei locali di stagionatura (Framondino et al., 2004).

La maturazione del formaggio è un insieme di fenomeni fisici, microbiologici e biochimici che portano ad un prodotto finale stabile con determinate caratteristiche aromatiche.

Tra i fenomeni fisici troviamo la diffusione del sale, la formazione della crosta e la modificazione della struttura della pasta. Durante la fase di stagionatura il formaggio perde peso, grazie all'evaporazione dell'umidità si riduce il contenuto idrico, ma allo stesso tempo si forma la crosta che previene un'eccessiva disidratazione del formaggio e lo protegge da contaminazioni esterne. Tutti questi passaggi che avvengono durante la maturazione trasformano il formaggio in un ambiente ostile per i batteri, caratterizzato dalla presenza di sale, basso contenuto idrico, pH 4.9-5.3, bassa temperatura e scarsità di nutrienti (Turner et al., 1986). Queste difficili condizioni inibiscono molti gruppi microbici, tranne alcune specie di LAB che tollerano questo ambiente (Peterson e Marshall, 1990).

I batteri lattici danno un significativo contributo al *flavour*<sup>1</sup>, alla *texture*<sup>2</sup>, al valore nutrizionale ed alla sicurezza microbiologica del formaggio durante la stagionatura (Settanni e Corsetti, 2008). I LAB sono un gruppo molto eterogeneo di microrganismi, Gram positivi, ubiquitari, di forma cocco o bacillare, eterotrofi, non mobili, non sporigeni, anaerobi obbligati o facoltativi, acido-tolleranti e molto esigenti dal punto di vista nutrizionale. Questi batteri fermentano gli zuccheri secondo differenti processi metabolici, producendo prevalentemente acido lattico (Mucchetti e Neviani, 2006), che comporta un abbassamento del pH entro le prime 48 ore.

Durante la maturazione i batteri lattici sono responsabili della produzione di altri metaboliti, attraverso la liberazione di enzimi, che trasformano i diversi componenti della cagliata (grassi e proteine) in composti caratterizzanti il gusto e

---

<sup>1</sup> Termine inglese, indica la combinazione di gusto ed odore, ovvero di sapore (sensazione prodotta dalle sostanze chimiche sugli organi del gusto) e aroma (sensazione prodotta dalle sostanze chimiche sugli organi dell'olfatto) (Rapparini, F.).

<sup>2</sup> Tutti gli attributi meccanici (geometrici e di superficie) di un alimento percepibili attraverso recettori meccanici, tattili, e, quando appropriato, visivi e uditivi (ISO 9452:2008).

l'aroma finale del prodotto. I processi enzimatici principalmente coinvolti sono la proteolisi e la lipolisi; gli enzimi implicati non provengono solo dai microrganismi ma anche dal caglio e dal latte.

La proteolisi è un parametro molto importante per l'ecologia del formaggio e, specialmente, per la *texture* e il *flavour* finali. Questo fenomeno avviene grazie a proteasi e peptidasi che degradano le proteine con conseguente liberazione di amminoacidi liberi e peptidi. Gli amminoacidi prodotti, oltre a fungere da nutrimento per i batteri, contribuiscono direttamente al gusto di base del formaggio ed indirettamente all'aroma, in quanto precursori di altre reazioni cataboliche (Settanni e Moschetti, 2010). I prodotti di conversione degli amminoacidi, ottenuti attraverso reazioni di decarbossilazione, deaminazione, desolfurazione, ossidazione e riduzione danno origine a composti aromatici volatili quali ammine, aldeidi, alcoli, acidi ed indolo. Questi prodotti danno un contributo al sapore maggiore degli amminoacidi stessi (Fox e Wallace, 1997).

La lipolisi non è molto accentuata nei formaggi di malga e non è neanche ricercata perché dà origine ad aromi che deprezzano il prodotto. Le lipasi liberano acidi grassi dai trigliceridi; soprattutto quelli a media e corta catena contribuiscono al gusto finale del prodotto, ma non sempre in modo positivo (Marilley et al. 2004).

Il prodotto ottenuto a fine stagionatura è un formaggio a pasta semidura, con una maturazione di 60-90 giorni principalmente proteolitica. È caratterizzato da un 58% di sostanza secca, con un tenore in grasso di 40 g/100g s.s. e un tenore proteico di 48 g/100g s.s. (Framondino et al., 2004).

### *1.2. Ecologia microbica dei formaggi di malga*

I microrganismi che trasformano il latte in formaggio sono principalmente LAB. Questi batteri, che esercitano un'attività utile alla formazione del prodotto finale, costituiscono la microflora casearia. In questa microflora si possono trovare anche batteri probiotici, batteri in grado di interferire positivamente sulla salute umana. Nel latte però non si trovano solo LAB, ma anche batteri psicrotrofi, coliformi, etc., tuttavia sono i LAB a prendere il sopravvento già nelle prime fasi della lavorazione.

La microflora del latte deriva dall'ambiente "stalla", dalla cute dell'animale e dalle attrezzature usate per la mungitura e lo stoccaggio, ma di notevole rilievo per i formaggi di malga sono anche tutti i microrganismi derivanti dal pascolo e

dall'ambiente "malga". La carica batterica non deve essere eccessiva ed il limite massimo è un parametro legale. Per il contenimento della carica notevole importanza rivestono fattori quali la pulizia dell'impianto di mungitura, della stalla e dell'animale, in particolare della mammella; perciò la disponibilità di acqua potabile in malga è un fattore basilare. Queste "contaminazioni" esterne possono influenzare il rapporto tra i microrganismi potenzialmente utili per la caseificazione e quelli alterativi (Michel et al., 2001).

Nel formaggio di malga, essendo fatto da latte crudo, la carica batterica non viene abbassata prima della lavorazione mediante trattamenti, quindi tutta la biodiversità microbica contribuisce al *flavour* del prodotto finale. Inoltre, non essendo utilizzato lo *starter*, tutti i LAB hanno la possibilità di svilupparsi. Salvaguardare la microflora lattica autoctona significa non solo usufruire della funzione probiotica di questi microrganismi, ma anche tutelare la capacità di autodifesa del prodotto, sfruttandone l'attività di antagonismo nei confronti di batteri patogeni o banali eventualmente presenti (Lodi et al., 1994). La tecnologia di lavorazione è di notevole importanza per quanto riguarda la tipicità di un prodotto; tipicità che andrebbe persa abbattendo la microflora autoctona ed aggiungendo uno *starter* industriale. È infatti grazie alla microflora di partenza, diversa da ambiente ad ambiente, che si evidenzia il legame tra latte e territorio, ed in un secondo momento tra formaggio e territorio (Brasca et al., 2005).

La microflora del formaggio di malga viene selezionata dall'acidificazione della cagliata e dalla successiva maturazione, non tanto dalla temperatura di lavorazione che non essendo selettiva permette la crescita sia di batteri mesofili che termofili. L'abbassamento di pH consente alla microflora lattica di prendere il sopravvento, perché è l'unica in grado di tollerare bassi livelli di acidità. L'ambiente ostile che viene a formarsi esercita un'ulteriore pressione selettiva sulla microflora e solo alcune specie di LAB riescono a svilupparsi. Nel formaggio finale si ritroveranno parte dei batteri del latte, quelli sopravvissuti alla lavorazione ed alla maturazione, ed eventualmente batteri provenienti dall'ambiente di stagionatura (Mucchetti e Neviani, 2006).

Sono ancora pochi gli studi effettuati per identificare la microflora dei formaggi prodotti in malga. Da una ricerca condotta su alcune produzioni casearie dell'arco alpino si sono individuati i ceppi più rappresentativi dei formaggi di montagna. Tra questi si trovano: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactobacillus paracasei*

subsp. *paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc lactis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans* e *Streptococcus thermophilus*. L'ambiente, la qualità della materia prima e la pressione selettiva esercitata dalle tecniche di lavorazione differenziano la popolazione microbica sia sotto l'aspetto qualitativo che quantitativo (Brasca et al., 2006). Da un altro studio, effettuato su formaggi tipici trentini a pasta semidura prodotti da latte crudo, sono stati individuati i ceppi più rappresentativi a sei mesi di stagionatura; tra questi sono presenti *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Pediococcus pentosaceus* e *Streptococcus macedonicus* (Poznansky et al., 2005).

### 1.2.2. Benefici per la salute esercitati dai batteri lattici

A molti LAB coinvolti nella stagionatura del formaggio sono imputati vari benefici per la salute, ossia tali LAB sono detti probiotici.

I batteri probiotici sono “microrganismi non patogeni che si dimostrano in grado, una volta ingeriti in adeguate quantità, di esercitare funzioni benefiche per l'organismo” (Ministero della Salute, [www.salute.gov.it](http://www.salute.gov.it)). I batteri probiotici sono stati oggetto di innumerevoli studi, a partire da Metchnikoff (1908), vista l'ipotesi ormai accertata della loro importanza per la cura e la prevenzione di alcune malattie. I batteri probiotici appartengono per la maggior parte ai generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*; sono in grado di sopravvivere alle condizioni sfavorevoli del tratto digerente (acidità, presenza di bile) riuscendo ad insediarsi e riprodursi nell'intestino. Li arricchiscono e rafforzano il microbiota intestinale, contribuendo al suo corretto equilibrio fisiologico.

Gli alimenti probiotici sono quei cibi che contengono microrganismi probiotici vivi e attivi, che rimangono tali in numero significativo fino al termine di conservazione del prodotto per esercitare effetti utili sulla salute. Gli alimenti tradizionalmente fonte di probiotici sono yogurt, latti fermentati e formaggi (Zago et al., 2011).

Poco è noto della quantità ottimale di batteri probiotici vivi da somministrare; tale quantità non è in realtà di facile determinazione, è ceppo-dipendente e, probabilmente, è anche funzione del tipo di beneficio che si vuole apportare con la somministrazione. Certamente tale valore non può tuttavia essere basso, se si intende influenzare in modo misurabile la composizione del microbiota del

ricevente (Aureli et al., 2010). De Vuyst (2000) afferma che la minima concentrazione di probiotici che deve essere assunta per assicurare un favorevole impatto sulla salute del consumatore deve essere almeno di  $10^7$  ufc/g o mL. La tendenza attuale del dosaggio dei probiotici fa riferimento ad una porzione di cibo, la quale dovrebbe contenere un livello minimo di  $10^9$  ufc per die per ceppo (Linee guida su probiotici e prebiotici, Ministero della Salute, 2013).

I batteri probiotici presenti nei prodotti lattiero-caseari possono produrre peptidi bioattivi e acido  $\gamma$ -amminobutirrico (GABA) (Settanni e Moschetti, 2010); alcuni ceppi producono coniugati dell'acido linoleico (CLA), acidi grassi polinsaturi appartenenti alla famiglia degli omega 6 importanti per la prevenzione delle patologie tumorali ed altre malattie croniche quali aterosclerosi, obesità, perdita di densità ossea, diabete e malattie cardiache (McGuire et al., 1999).

Alcuni LAB liberano peptidi bioattivi durante il processo di degradazione delle proteine. I peptidi bioattivi sono specifici frammenti di proteine che hanno un impatto positivo sulle funzioni o condizioni del corpo; le proteine del latte sono considerate la loro principale fonte (Kitts e Weiler, 2003). Questi composti possono essere liberati dagli enzimi proteolitici dei LAB durante la maturazione del formaggio a partire da proteine originarie del latte: le proteine vengono degradate a peptoni, successivamente scomposti in peptidi, i quali possono avere funzioni bioattive. Solo nei formaggi a lunga stagionatura è possibile trovare peptidi bioattivi (FitzGerald e Murray, 2006). Attualmente nel formaggio sono stati identificati e caratterizzati peptidi ad azione oppioide, anti-trombotica, antiipertensiva, immunomodulatoria, antiossidante, antimicrobica, stimolanti l'assorbimento di minerali e la crescita (Regazzo, 2010). Per esercitare i loro benefici per la salute i peptidi bioattivi devono arrivare intatti nell'intestino, quindi sopravvivere alla digestione.

Alcuni LAB sintetizzano acido  $\gamma$ -amminobutirrico decarbossilando l'acido glutammico. Il GABA è un amminoacido che agisce da neurotrasmettitore inibitorio, è il responsabile della regolazione dell'eccitabilità neuronale e della regolazione del tono muscolare. Le sue funzioni benefiche sulla salute sono associate alla cura degli stati d'ansia e della depressione, promuove la crescita muscolare magra, accelera il metabolismo dei grassi e possiede attività oppioide (Settanni e Moschetti, 2010). Durante la maturazione del formaggio, un elevato livello di acido glutammico viene liberato dalle caseine native, maggiore è la

stagionatura del formaggio maggiore è la liberazione di acido glutammico, che è uno degli amminoacidi dominanti delle caseine (Siragusa et al., 2007). Da uno studio effettuato su un formaggio nostrano trentino a latte crudo a sei mesi di stagionatura si evidenzia un contenuto medio di 3029 mg/kg di acido glutammico; mentre tutti gli altri amminoacidi liberi registrano un valore inferiore a 1000 mg/kg (Larcher et al., 2005). È interessante notare che due ceppi di lattobacilli, produttori di GABA, selezionati da ceppi isolati da 22 formaggi italiani, sono sopravvissuti ad una simulazione della digestione gastrointestinale *in vitro* (Siragusa et al., 2007).

In questo tirocinio non sono stati digeriti i singoli ceppi ma l'intero alimento, perché è stato dimostrato come le matrici alimentari possano migliorare significativamente la protezione delle cellule batteriche durante il transito gastrointestinale. Infatti in uno studio eseguito da Leverrier et al. (2004) è stato verificato come la sopravvivenza alla digestione gastrointestinale *in vitro* di alcuni ceppi di propionibatteri fosse molto maggiore in latte fermentato che in coltura liquida.

### *1.3. La digestione gastrointestinale in vitro*

Nel corso del tirocinio è stata eseguita su alcuni campioni di formaggio, panna e latte fermentato la digestione gastrointestinale *in vitro*, per valutare la sopravvivenza dei LAB al transito nel tratto gastroenterico, primo passo per valutare i possibili benefici per la salute esercitabili dai batteri lattici. Si è seguito un modello *in vitro* perché più veloce e meno costoso rispetto a tecniche *in vivo*. La digestione *in vitro* consiste nel realizzare fedelmente in laboratorio tutte le condizioni che avvengono nella digestione dell'uomo. In particolare vengono simulate le condizioni di tempo, temperatura, agitazione, enzimi, pH e volumi dei succhi in relazione agli alimenti considerati. In laboratorio sono state mimate tutte le fasi della digestione tranne l'assorbimento e l'eliminazione degli scarti, non necessari ai fini del presente lavoro.

#### *1.3.1. La digestione*

La digestione è l'insieme di tutti i cambiamenti, dovuti a processi chimici e meccanici, che il cibo subisce nel canale alimentare grazie alla collaborazione di

vari organi (Anatomia e fisiologia, 1979). Nell'adulto il tratto gastrointestinale è un tubo di circa nove metri di lunghezza, che attraversa il corpo dalla bocca all'ano. Il lume del canale è in continuità con l'ambiente esterno, il che significa che il suo contenuto è tecnicamente all'esterno del corpo. Per questo i batteri che colonizzano l'intestino crasso non causano infezioni (Vander, 2011). La digestione è quel processo di dissoluzione e scomposizione delle macromolecole in molecole più piccole in grado di attraversare l'epitelio intestinale ed entrare così nel circolo ematico e linfatico. L'apparato digerente è formato da un insieme di organi che collaborano per scomporre gli alimenti nei loro elementi essenziali più facilmente assimilabili, fornendo l'energia ricavata alle cellule per il loro metabolismo ed eliminando gli scarti non necessari sotto forma di feci.

Le trasformazioni che subiscono gli alimenti sono riassumibili in quattro fasi: frammentazione meccanica, digestione, assorbimento ed espulsione sostanze di rifiuto. Carboidrati, grassi e proteine hanno bisogno di essere digeriti prima di essere assorbiti, mentre sali minerali, acqua e vitamine no.

Numerosi enzimi presenti nei diversi succhi digestivi catalizzano l'idrolisi degli alimenti. Gli enzimi sono "catalizzatori organici" che accelerano le reazioni chimiche senza comparire nei prodotti di reazione finali; sono tanto importanti che a volte la vita stessa è stata definita come "l'ordinato funzionamento di centinaia di enzimi". Esercitano la loro funzione in modo ottimale in un determinato range di pH: 1.5-3.5 per quanto riguarda lo stomaco; 6-7 per l'intestino e la bocca (Anatomia e fisiologia, 1979).

La digestione ha inizio nella cavità orale: i denti triturano e sminuzzano il cibo e la saliva, secreta dalle ghiandole salivari, inumidisce e lubrifica le particelle formatesi per facilitare la deglutizione. La saliva è una soluzione basica acquosa contenente muco ed enzimi, amilasi ed in piccola parte lipasi, le quali danno l'avvio rispettivamente alla digestione dei polisaccaridi e dei lipidi. I segmenti successivi sono la faringe e l'esofago, che non contribuiscono alla digestione ma sono la via utilizzata dal bolo per passare dalla bocca allo stomaco.

### *1.3.2. Fase gastrica*

Lo stomaco è un organo sacciforme di capacità variabile con robuste pareti muscolari che si muovono ritmicamente per mescolare il contenuto. Internamente è rivestito da una mucosa ricca di ghiandole che secernono il succo gastrico: una

miscela di muco, enzimi ed acido cloridrico, il pH è molto acido, attorno a 2.5. Il muco serve a proteggere la parete dai succhi digestivi che altrimenti la digerirebbero (Vander, 2011).

L'acido cloridrico viene secreto nello stomaco in risposta all'espansione della parete gastrica, ha il compito di iniziare a demolire i legami dell'alimento e denaturare le proteine. Inoltre, uccide la maggior parte dei batteri che entrano con il cibo, ma tale funzione non è completamente efficace visto che alcuni batteri sopravvivono e colonizzano l'intestino dando origine al microbiota intestinale.

L'enzima principale che agisce a livello dello stomaco è la pepsina, attivata grazie all'acidità dell'ambiente, è l'enzima che provvede alla digestione parziale delle proteine, rompendole in oligopeptidi. L'optimum di pH alla quale lavora è tra 1.5 e 3.5, con temperatura tra 37 °C e 42 °C (Anatomia umana e istologia, 2010). In basse quantità troviamo anche la lipasi; le lipasi salivari e gastriche scindono circa il 30% dei lipidi alimentari, il rimanente è digerito nel tratto intestinale.

La digestione a livello dello stomaco dura in media dalle due alle tre ore, ma dipende dalla quantità di cibo ingerito, il chimo a questo punto è pronto per passare nell'intestino tenue.

### *1.3.3. Fase intestinale*

L'intestino tenue è composto da tre segmenti: duodeno, digiuno e ileo per una lunghezza complessiva media di sei metri (Anatomia umana e istologia, 2010). La digestione va avanti nel duodeno grazie all'intervento dei succhi pancreatico ed enterico e della bile. Sono soluzioni acquose con pH basico (circa 8) per neutralizzare l'acidità del chimo proveniente dallo stomaco. L'emissione dei succhi digestivi è basata su stimoli principalmente ormonali.

- Nel succo pancreatico vi sono enzimi quali la tripsina e la chimotripsina, deputate alla digestione delle proteine, l'alfa amilasi dei polisaccaridi, la lipasi pancreatico dei lipidi, la fosfolipasi incaricata della rottura dei legami dei fosfolipidi, l'elastina per la digestione del collagene e la carbossipeptidasi che rompe i legami peptidici terminanti con -COOH.
- Il succo enterico è una miscela acquosa ricca di muco, anticorpi ed enzimi digestivi quali amilasi, maltasi, tripsina e lipasi.



- La bile è una soluzione acquosa prodotta dal fegato ed è costituita principalmente da acqua (95%), elettroliti, lipidi (sali biliari, colesterolo e fosfolipidi), proteine e pigmenti (bilirubina).

L'azione dei sali biliari permette l'assorbimento intestinale di lipidi e vitamine liposolubili; elimina numerose sostanze endogene ed esogene quali farmaci e ormoni, contribuisce a regolare la quantità di colesterolo presente nell'organismo e funge da agente batteriostatico. Nel tratto terminale dell'intestino tenue il 94% dei sali biliari viene assorbito e riportato al fegato attraverso la vena porta.

I sali biliari vengono sintetizzati a partire dal colesterolo (Figura 2); degradandolo si formano l'acido colico e i suoi derivati che vengono coniugati con glicina e taurina. Nel primo caso si forma acido glicocolico e nell'altro acido taurocolico, poi salificati con sodio e potassio a glicocolato e taurocolato.

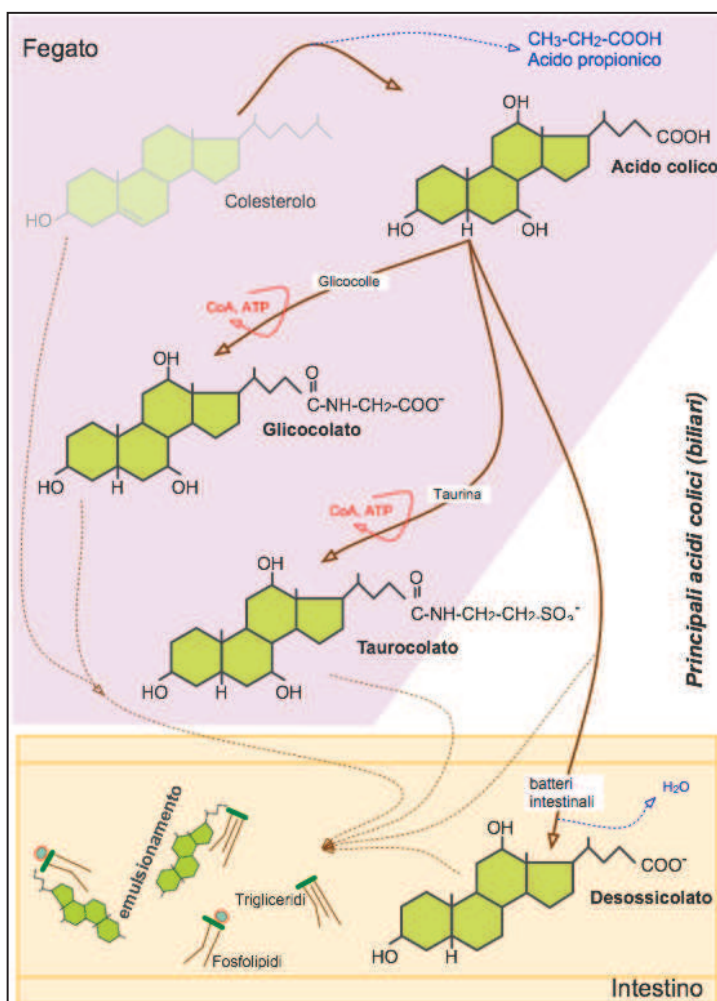


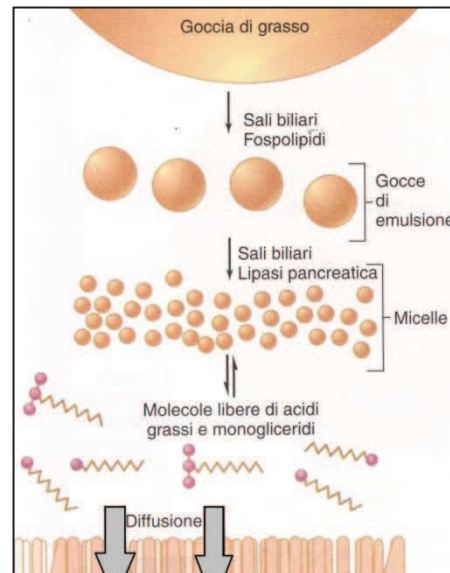
Figura 2: sintesi dei sali biliari a partire dal colesterolo. I prodotti ottenuti sono glicocolato e taurocolato. (Fonte: <http://it.wikipedia.org/wiki/Bile>)

La digestione delle proteine va avanti nei primi tratti dell'intestino grazie a proteasi pancreatiche, quali tripsina e chimotripsina, e intestinali. La tripsina

opera scindendo i legami peptidici che legano amminoacidi basici, come arginina e lisina, mentre la chimotripsina agisce idrolizzando i legami che coinvolgono tirosina, fenilalanina, triptofano, leucina e metionina. Tutti questi enzimi proteolitici collaborano per scindere le proteine in amminoacidi liberi e piccoli peptidi.

La digestione gastrointestinale dei grassi è ripartita in tre fasi principali: la dispersione dei globuli in particelle finemente suddivise, l'idrolisi enzimatica che rompe il legame tra glicerolo e acidi grassi e la conversione dei prodotti lipidici insolubili in prodotti assorbibili grazie all'azione dei sali biliari (Carey et al., 1983). I lipidi presenti negli alimenti sono insolubili in acqua e, una volta arrivati nello stomaco, si aggregano in grandi gocce lipidiche. La lipasi pancreatica, essendo un enzima idrosolubile, può esplicare la sua azione digestiva solo sulla superficie delle gocce lipidiche, ma se queste sono di grandi

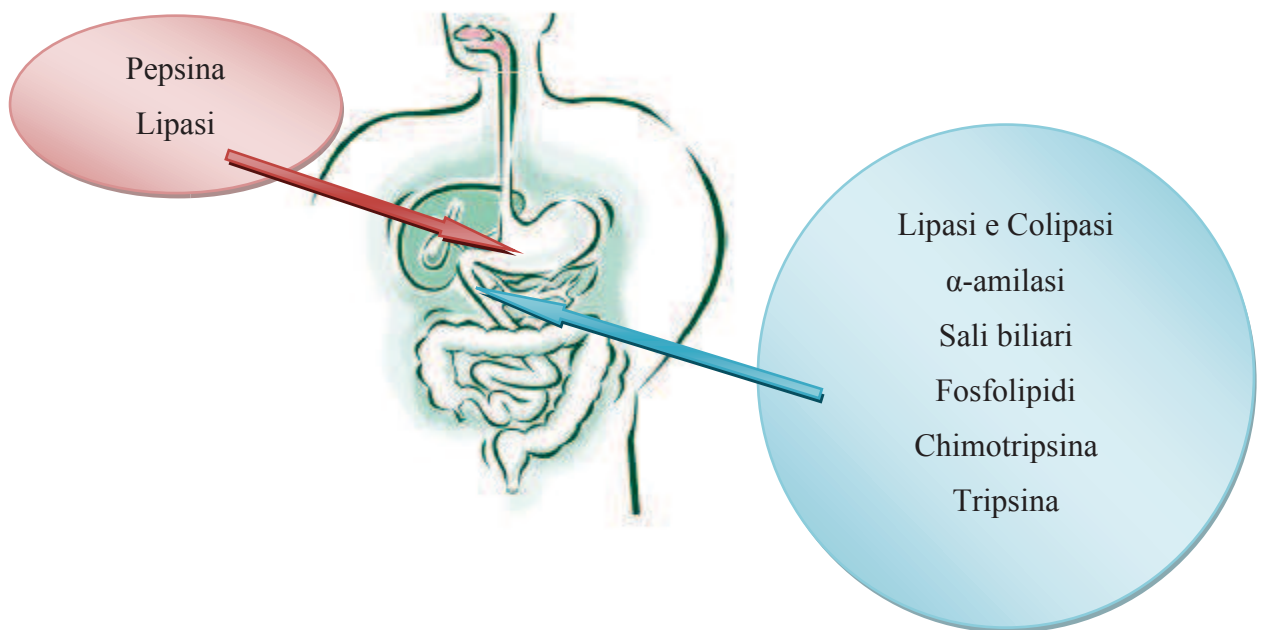
dimensioni il tempo necessario per la loro digestione è elevato. Grazie ai movimenti dello stomaco le gocce lipidiche vengono divise in gocce più piccole e gli agenti emulsionanti, fosfolipidi e sali biliari, ne impediscono la riaggregazione. Il rivestimento delle goccioline lipidiche con gli agenti emulsionanti compromette però l'accessibilità della lipasi al substrato lipidico. Per risolvere questo problema interviene la colipasi, un coenzima anfipatico secreto inattivo dal pancreas che viene attivato nel lume intestinale dalla tripsina (Wieloch, 1985); la quale permette l'adesione della lipasi ai globuli di grasso. Il legame tra i due enzimi, lipasi e colipasi, è influenzato dal pH, dalla concentrazione salina e dalla presenza dei sali biliari (Borgstrom et al., 1979). L'assorbimento dei prodotti insolubili ottenuti sarebbe molto lento se non fosse per una seconda azione svolta dai sali biliari: la formazione di micelle, strutture molto più piccole delle gocce di emulsione. Le micelle sono un mezzo per mantenere la maggior parte dei prodotti insolubili in piccoli aggregati solubili; sono composte da sali biliari, acidi grassi, monogliceridi e fosfolipidi; nel nucleo vi sono incluse anche vitamine liposolubili



**Figura 3** rappresentazione schematica della demolizione dei globuli di grasso a piccole micelle. (Fonte: Vander, 2011)

e colesterolo (Vander, 2011). Le micelle vengono continuamente distrutte e riformate, quando si rompono il loro contenuto è rilasciato in soluzione e viene reso disponibile per essere assorbito.

La digestione degli amidi, in parte avvenuta a livello salivare, va avanti a livello intestinale, le alfa amilasi delegate si trovano nel succo pancreatico. I polisaccaridi sono scomposti a monosaccaridi. Il pH ottimale delle amilasi varia tra 6.5 e 7; per questo motivo a livello dello stomaco non operano.



**Figura 4: rappresentazione schematica degli enzimi gastrici, enterici, pancreatici e dei succhi biliari che intervengono durante la digestione. (Fonte: Di Nunzio, 2012)**

La fase di assorbimento è delegata quasi interamente all'intestino tenue: i prodotti della digestione sono assorbiti attraverso le cellule epiteliali ed entrano nel sangue e/o nella linfa. Anche le vitamine, i minerali e l'acqua, che non richiedono la digestione enzimatica, sono assorbiti a questo livello. Il contatto tra superficie epiteliale e chilo è facilitato dalla motilità intestinale, indotta da muscoli lisci della parete. Questo movimento favorisce anche il lento avanzamento del materiale verso la parte terminale del canale digerente.

L'intestino crasso è lungo circa 1.6 metri ed è suddiviso in tre tratti: cieco, colon e retto; il colon è il tratto più esteso che occupa 1.4 metri (Anatomia umana e istologia, 2010). Ha il compito di accumulare temporaneamente il materiale non digerito, di cui una parte viene metabolizzata dal microbiota, e lo concentra assorbendone sali e acqua; il residuo è costituito da feci e gas. Le feci sono

rappresentate quasi interamente da batteri e da materiale ingerito che non è stato né digerito né assorbito.

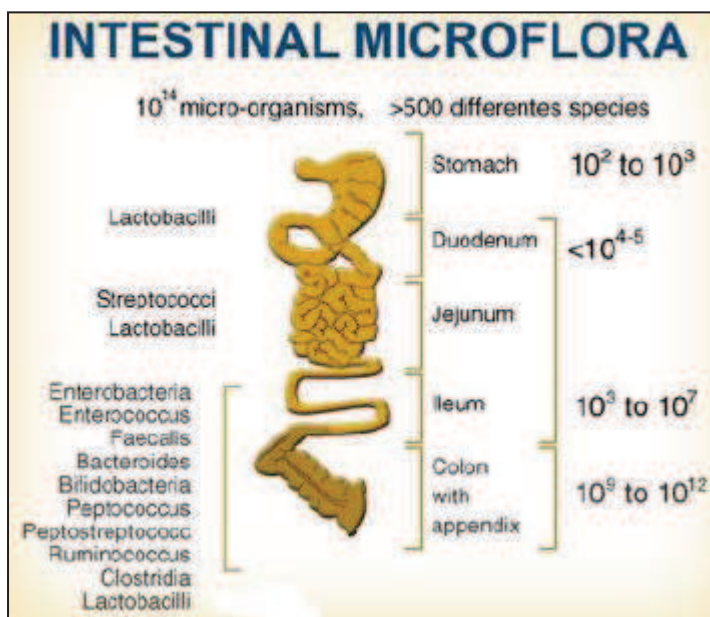
#### *1.4. Il microbiota intestinale*

Il microbiota intestinale è un ecosistema microbico che coesiste nell'intestino, per lo più concentrato nel colon (1-2 kg di batteri), che svolge un ruolo cruciale nella fisiologia umana. È costituito da una pluralità di nicchie ecologiche che ospitano una popolazione batterica formata da numerosissime specie, da 800 a 1000, con una variabilità genetica enorme: cento volte maggiore di quella dell'uomo.

Ogni porzione del tratto gastrointestinale è colonizzata da una microflora specifica, la cui composizione è il risultato dell'adattamento alle condizioni ambientali locali e delle interazioni di tipo commensalistico o parassitico che si stabiliscono sia tra i componenti della comunità microbica stessa, sia tra questa e l'organismo ospite. Infatti il microbiota è soggetto a diversi meccanismi di regolazione che lo mantengono costante e in equilibrio; meccanismi che intervengono sia tra microrganismi che tra microrganismi e ospite. I fattori che definiscono la composizione e la concentrazione microbica nelle varie porzioni dipendono in parte dall'ospite, in parte dai microbi e dalle loro interazioni, e in parte dalla dieta. I fattori mediati dall'ospite sono il pH, la presenza di enzimi, i sali biliari, la velocità del transito nei vari tratti, la concentrazione di ossigeno e dei nutrienti; mentre quelli microbici sono l'adesione, la mobilità, la flessibilità nutrizionale, i componenti antimicrobici e la velocità di generazione. La dieta è molto importante per quanto riguarda l'ingestione di fibre non digeribili, prodotti fermentati, farmaci ed alcol. I prodotti fermentati tradizionali fanno parte della dieta umana fin dai primi anni di vita, costituiscono dal 5 al 40% dell'assunzione giornaliera e sono da lungo associati a generali benefici sulla salute. La caratteristica unica di questi prodotti è la loro "vitalità": sono veicoli importanti di elevate quantità di batteri vivi nel corpo umano (The Intestinal Microbiota and Gut Health, 2013). Il formaggio, data la sua natura di prodotto fermentato, rientra anch'esso nei mezzi di trasporto di elevate quantità di batteri vivi nel corpo umano (Settanni e Moschetti, 2010); essendo un alimento con una percentuale di grasso considerevole (> 20%) e, caratterizzato da matrice solida e capacità tampone, protegge i batteri durante il transito nel tratto gastrointestinale molto più

efficientemente di un alimento fluido o viscoso, quale può essere un latte fermentato o uno yogurt (Ross et al., 2002; Cruz et al. 2009).

Nello stomaco la microflora è molto scarsa,  $10^2$  ufc/g, l'ambiente così acido e la presenza di ossigeno non sono ottimali per la crescita di molti microrganismi; i pochi presenti infatti sono aerobi, ad esempio è possibile trovare *Lactobacillus acidophilus*. In termini quantitativi la carica microbica totale aumenta progressivamente dallo stomaco all'intestino crasso, nel colon troviamo anche  $10^{12}$  ufc/g. I microrganismi arrivano vivi e vitali nell'intestino grazie ad una resistenza intrinseca del ceppo ai succhi gastrici e all'acidità, oppure sfruttando la protezione dell'alimento. La maggior parte dei gruppi batterici del colon (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* e *Clostridium*) è saccarolitica, tuttavia esistono notevoli differenze sia per le capacità degradative sia per le cinetiche di crescita.



**Figura 5: concentrazione batterica nel tratto gastrointestinale; sono evidenziate le specie più diffuse per ogni tratto. (Fonte: <http://missinghumanmanual.com/?tag=gut-flora>)**

I batteri si suddividono in utili, i probiotici e i commensali; e in dannosi, microrganismi patogeni che producono metaboliti tossici e cancerogeni. In condizioni salutari normali la microflora è in perfetta simbiosi con l'organismo. Il microbiota intestinale impedisce ai batteri patogeni di colonizzare l'intestino attraverso vari meccanismi quali l'aumento della velocità di transito intestinale, la modulazione del sistema immunitario, la competizione per i nutrienti e per lo spazio e l'amensalismo (una specie produce sostanze tossiche per un'altra specie). Ogni individuo ha una sua specifica "impronta digitale batterica", cioè un profilo di specie suo proprio, diverso da quello di altri individui; esiste tuttavia un *core* di

almeno 57 specie batteriche che può essere considerato comune a tutti (Aureli et al., 2010).

L'interazione tra microbiota ed ospite produce per entrambi vantaggi di varia natura. Le principali funzioni, ad oggi note, dotate di un effetto favorevole per l'ospite sono le seguenti:

- partecipazione alla formazione della barriera intestinale;
- resistenza alla colonizzazione di batteri patogeni grazie a competizione per spazio e nutrienti e produzione di sostanze ad azione antimicrobica;
- facilitazione dell'assorbimento di alcuni alimenti altrimenti non digeribili, ad esempio cellulose e pectine;
- produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA);
- produzione di vitamine: in particolare del gruppo B e K;
- stimolazione del sistema immunitario (GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue, "l'organo" immunitario più grande del corpo umano);
- degradazione di xenobiotici.

La microflora intestinale svolge quindi funzioni metaboliche, trofiche e protettive necessarie al mantenimento della salute dell'ospite; l'alterazione di una o più funzioni può determinare condizioni patologiche di varia entità.

# Capitolo 2

## Scopo del tirocinio

L'obiettivo di questo tirocinio è stato quello di valutare la capacità della microflora autoctona di formaggi trentini a latte crudo vaccino di sopravvivere alla digestione gastrointestinale *in vitro*. L'effetto della matrice e delle proprietà chimico-fisiche dell'alimento su tale capacità è stato studiato sottoponendo a digestione *in vitro* anche latti fermentati, ottenuti per inoculo con alcuni ceppi batterici isolati dalla microflora autoctona, e panna. La carica batterica di diversi gruppi microbici è stata valutata prima e dopo digestione *in vitro* mediante tecniche di microbiologia classica: spatolamento e conta su terreni selettivi.

# Capitolo 3

## Materiali e metodi

### 3.1. Campionamento

Sono stati campionati 18 formaggi a sei mesi di stagionatura prodotti nel corso dell'estate 2012 in una malga della provincia trentina posizionata a 2000 m s.l.m.. Al termine della stagionatura, effettuata in condizioni di temperatura e umidità controllate, la forma è stata campionata prelevando una fetta di circa 2.5 cm di spessore. La fetta è stata conservata sottovuoto in cella refrigerata a 4 °C fino al momento dell'analisi, avvenuta sempre entro una settimana dal giorno di campionamento.

Sono stati inoltre analizzati 3 campioni di panna d'affioramento (grasso 21%), prelevati durante 3 giornate di lavorazione del formaggio.

#### 3.1.1. Latte fermentato

Sono stati preparati 15 campioni di latte fermentato inoculati con tre ceppi di *Lactococcus lactis* e tre di *Lactobacillus paracasei* isolati dai formaggi dopo digestione. Le sei colture liquide di *Lactococcus lactis* e di *Lactobacillus paracasei* sono state inoculate all'1% in 15 aliquote da 30 mL ciascuna di latte UHT, nelle diverse tipologie di magro, parzialmente scremato e intero; ed incubate *overnight* a 30°C (Vinderola et al., 2002). Le colture fresche sono state ottenute inoculando (1%) i ceppi rispettivamente nei terreni liquidi M17 e MRS, ed incubati 24h a 30 °C. Nel dettaglio sono stati preparati:

- 3 campioni di latte intero inoculati ognuno con un ceppo di *Lc. lactis*;
- 3 campioni di latte intero inoculati ognuno con un ceppo di *Lb. paracasei*;
- 3 campioni di latte intero inoculati ognuno con due ceppi: un *Lc. lactis* e un *Lb. paracasei*;
- 3 campioni di latte magro inoculati ognuno con due ceppi: un *Lc. lactis* e un *Lb. paracasei*;



- 3 campioni di latte parzialmente scremato inoculati ognuno con due ceppi: un *Lc. lactis* e un *Lb. paracasei*.

### 3.2. Digestione

I campioni di formaggio, panna e latte fermentato sono stati sottoposti a digestione gastrointestinale *in vitro*. Sugli stessi campioni e sui rispettivi digeriti sono state determinate le conte microbiche.

Il processo digestivo *in vitro* è stato eseguito secondo il metodo descritto da Mandalari et al. (2008); suddiviso in fase gastrica e fase duodenale. Le soluzioni dei diversi enzimi (Sigma-Aldrich, St Louise, MO) per la digestione sono state conservate in frigorifero, se non diversamente indicato.

Tabella 1: soluzioni aggiunte durante la digestione gastrointestinale *in vitro*

	mg da aggiungere / ml di reazione digestiva	mg aggiunti / volume tot di reazione digestiva <sup>1</sup>	Soluzione “madre”
Pepsina da mucosa gastrica suina (601 U/mg)	0.1811	2.26	181 mg in 1 mL
Lipasi gastrica da <i>Rhizopus oryzae</i> (52 U/mg)	1.1516	14.39	575 mg in 5 mL
CaCl <sub>2</sub>	2.5635	48.71	120 mg in 5 mL
BisTris	0.1527	2.90	153 mg in 10 mL
Sodiotaurocolato	2.1507	40.86	2400 mg in 20 mL
Glicodeossicolato	1.8864	35.84	6 mg in 5 mL
Chimotripsina da pancreas bovino (1600 U/mg)	0.0037	0.070	18 mg in 5 mL
Tripsina da pancreas suino (13000-20000 U/mg)	0.0078	0.148	39 mg in 5 mL
Colipasi da pancreas suino (4000 U/mg)	0.0032	0.061	5 mg in 1,5 mL
Lipasi da pancreas suino (16.5 U/mg)	0.2222	4.22	576 mg in 5 mL
$\alpha$ -Amilasi da pancreas suino (50 U/mg)	0.4655	8.83	

<sup>1</sup> Il volume della fase gastrica è 12.5 mL mentre quello della fase duodenale è 19 mL.

### Fase gastrica

Sono stati pesati 5 g di formaggio e successivamente diluiti con 6.25 mL di NaCl (0.15M, pH 2.5) per g di campione. Il tutto è stato successivamente omogeneizzato con Stomacher (Bag Mixer, Interscience, Saint Nom, F) e il pH aggiustato a 2.5 con HCl 1M, considerando il pH stomacale di un adulto, (Mandalari et al. 2008). Da questo omogeneizzato sono stati prelevati 12.5 mL, corrispondenti a 2 g di campione iniziale, a cui sono stati aggiunti:

- 6.25 mL di vescicole lipidiche;
- 12.5 µL Pepsina da mucosa gastrica suina;
- 125 µL Lipasi gastrica da *Rhizopus oryzae*.

Gli omogeneizzati sono stati incubati a 37 °C sotto agitazione (-170 rpm) per due ore, in modo da simulare le condizioni di tempo, temperatura e agitazione dello stomaco (Mandalari et al., 2008).

Per preparare le vescicole lipidiche è stato seguito il protocollo descritto da Moreno et al. (2005). Le vescicole non sono conservabili in frigo, di conseguenza sono state preparate immediatamente prima del loro utilizzo con fosfatidilcolina da uovo (PC), disciolta in cloroformio (100 mg/mL). Sono stati usati 28 mg per campione, anziché 24 mg da protocollo, per tener conto delle perdite di volume dovute alla successiva evaporazione.

La soluzione è stata evaporata con Rotavapor (Buchi Labortechnik AG, Zurigo, CH) formando un film lipidico sulle pareti del pallone. Dopo circa 15 ore, il pallone è stato sganciato dal Rotavapor e riempito con Argon per prevenire l'ossidazione del film lipidico. Successivamente il film è stato idratato con 43.2 mL di NaCl (150 mM, pH 2.5). L'idratazione è stata favorita lasciando incubare il pallone su agitatore a 37 °C per 45 min (-170 rpm). Sono state aggiunte 5 biglie di vetro (2 mm di diametro) per favorire la miscelazione.

Dopo l'idratazione e dopo aver tolto le biglie di vetro si è passati alla fase di sonicazione (Digital Sonifier 250 & 450, Branson Ultrasonic Corporation, Danbury, Connecticut, USA), per aggregare i liposomi in vescicole lipidiche. A intervalli di 10-15 min, l'emulsione è stata raffreddata in ghiaccio in modo che la temperatura non superasse 60 °C. Si è sonicato finché il liquido da bianco perlaceo è diventato trasparente. Successivamente le vescicole sono state filtrate usando dapprima un filtro da 0.45 µm e in seguito uno da 0.22 µm.

### Fase duodenale

Al termine della fase gastrica il valore pH del digerito (19 mL) è stato corretto a 6.5 con NaOH 4M per simulare le condizioni duodenali (Mandalari et al., 2008).

In seguito sono stati aggiunti:

- 48.7  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub>;
- 190  $\mu$ L 2-Bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol (Bis Tris);
- 340  $\mu$ L sodio taurocolato;
- 300.8  $\mu$ L glicodeossicolato di sodio;

Si è controllato che il pH fosse rimasto invariato e successivamente sono stati aggiunti:

- 19  $\mu$ L Chimotripsina da pancreas bovino, conservata a -20°C;
- 19  $\mu$ L Tripsina da pancreas suino, conservata a -20°C;
- 19  $\mu$ L Colipasi da pancreas suino, conservata a -20°C;
- 36.1  $\mu$ L Lipasi da pancreas suino;
- 8.83 mg  $\alpha$ -Amilasi da pancreas suino.

Dopo un'ora di incubazione a 37 °C sotto agitazione (-170 rpm), l'omogeneizzato può essere considerato "digerito" ed è quindi possibile procedere con le diluizioni seriali e successivo spatolamento sui diversi terreni.

Il campione digerito che non è stato utilizzato è stato congelato in freezer a -80°C. Per quanto riguarda la panna e il latte fermentato il procedimento è stato analogo tranne la fase di omogeneizzazione, che è stata fatta con agitatore Vortex, anziché con Stomacher, data la diversa consistenza.

### 3.3. Enumerazione dei microrganismi

L'analisi microbiologica dei digeriti è stata eseguita mediante conta su piastra dopo diluizioni seriali in acqua peptonata sterile (1 g/L mycological peptone).

I campioni di formaggio prima della digestione hanno subito un trattamento preliminare di omogeneizzazione prima di procedere con le diluizioni seriali. A tal fine 5 g di formaggio sono stati diluiti in sodio citrato (2.63 g/L pH 5.5) fino ad ottenere un peso finale pari a 10 volte il peso iniziale del campione di formaggio. La sospensione così ottenuta è stata omogeneizzata con Ultraturrax (IKA S18N-19G, IKA Werke GmbH, Staufen, D). Questa prima diluizione 1:10 è servita per ottenere le altre diluizioni seriali.

Sono state allestite più diluizioni decimali, da  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ , e 200  $\mu\text{L}$  delle stesse sono stati inoculati su piastra per la conta dei microrganismi.

### 3.3.1. Terreni utilizzati

Di seguito sono riportate le composizioni e le indicazioni di utilizzo dei terreni. Ogni terreno è stato sterilizzato in autoclave per 15 min a 121 °C, se non diversamente indicato. Tutti i terreni e supplementi utilizzati sono stati forniti da Oxoid (Milano, I).

**PCA latte:** terreno utilizzato per il latte e il formaggio per determinare la carica batterica totale (incubazione a 30 °C in aerobiosi per 24 ore).

Diluizioni utilizzate:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ .

Componente	Quantità (g/L)
Tryptone	5.0
Estratto di lievito	2.5
Glucosio	1.0
Latte in polvere	10.0
Agar	9.0

**M17:** terreno utilizzato per il latte e il formaggio per la determinazione dei cocchi lattici mesofili (incubato a 30 °C in aerobiosi per 48 ore), e dei cocchi lattici termofili (incubato a 45 °C in anaerobiosi per 48 ore).

Diluizioni utilizzate:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ .

Componente	Quantità (g/L)
Tryptone	5.0
Soia peptone	5.0
Estratto di carne	5.0
Estratto di lievito	2.5
Acido ascorbico	0.5
Solfato di magnesio	0.25
Di-sodio- $\beta$ -glicerofosfato	19.0
Agar	11.0

**MRS:** terreno utilizzato per il latte e il formaggio per la determinazione dei bacilli lattici mesofili (incubato a 30 °C in anaerobiosi per 48 ore).

Diluizioni utilizzate:  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ .

Componente	Quantità (g/L)
Peptone	10.0
Lab-lemco powder	8.0
Estratto di lievito	4.0
Glucosio	20.0
Tween 80	1.0 ml
Di-potassio idrogenofosfato	2.0
Acetato di sodio tri-idrato	5.0
Tri-ammonio citrato	2.0
Solfato di magnesio epta-idrato	0.2
Solfato di manganese tetra-idrato	0.05
Agar	10.0

Il terreno va portato a pH 5.5 con acido lattico (Carlo Erba, Milano, I).

**MRS - VANCOMICINA:** terreno utilizzato per il latte e il formaggio per la determinazione dei bacilli lattici mesofili eterofermentanti (incubato a 30 °C in anaerobiosi per 48 ore).

Stessa composizione dell'MRS, non va portato a pH 5.5 e dopo la sterilizzazione va aggiunta sotto cappa la vancomicina: 8 µg/mL.

Diluizioni utilizzate:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ .

**KAA:** terreno per la determinazione degli enterococchi in latte e formaggio (incubazione a 37 °C in aerobiosi per 24 ore).

Diluizioni utilizzate:  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ .

Componente	Quantità (g/L)
Triptone	20.0
Estratto di lievito	5.0
Cloruro di sodio	5.0
Citrato di sodio	1.0
Esculina	1.0
Citrato ferrico di ammonio	0.5
Sodio azide	0.15
Agar	10.0

Prima della sterilizzazione si aggiunge, per 500 mL di terreno, un flacone da 1 mg di kanamycina ricostituito con 2 mL di acqua distillata.

**VRBA:** terreno per la determinazione dei coliformi in latte e formaggio (incubato a 37 °C in aerobiosi per 24 ore).

Diluizioni utilizzate:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ .

Componente	Quantità (g/L)
Estratto di lievito	3.0
Peptone	7.0
Cloruro di sodio	5.0
Sali biliari No. 3	1.5
Lattosio	10.0
Rosso neutro	0.03
Cristal violetto	0.002
Agar	12.0

Il terreno viene sterilizzato per ebollizione.

### 3.3.2. Isolamento da piastra dei presunti batteri lattici (LAB)

Sono stati fatti degli isolamenti da piastre di sei campioni digeriti. Sono state isolate mediamente tre colonie, scelte in modo casuale, dalle piastre contabili di M17 e MRS. Le colonie sono state moltiplicate negli stessi terreni in forma liquida impiegati per la conta e con le stesse condizioni di incubazione. Una volta cresciuti, gli isolati sono stati osservati al microscopio Motic (Motic, Milano, Italia) per determinarne la morfologia e la purezza; successivamente sono stati messi in glicerolo e congelati.

## 3.4. Identificazione genotipica dei batteri lattici

### 3.4.1. Estrazione del DNA

Per procedere all'identificazione genotipica è necessario dapprima ottenere il DNA dai ceppi isolati.

#### **Estrazione per lisi alcalina e shock termico:**

1. centrifugare 1 mL di coltura liquida a 10000 rpm per 5';
2. sospendere 2 colonie batteriche (2 mm di diametro) in 100  $\mu$ L di soluzione di lisi e incubarle per 15 min a 100°C;
3. centrifugare la sospensione per 1 min a 12000 rpm;
4. diluire la sospensione 20 volte in acqua distillata.

In ogni reazione si utilizzano 5  $\mu$ L della sospensione.

Composizione della soluzione di lisi: 25 mL di NaOH 0.1 M e 1.25 mL SDS 10% (Sodium dodecyl sulphate); si porta a volume (50 mL) con acqua bidistillata.

### 3.4.2. Caratterizzazione dei ceppi mediante PCR specie-specifiche

Per definire in modo preciso la specie dell'isolato sono state utilizzate PCR specie-specifiche. In particolare si è ricorso a due diverse PCR specie-specifiche, una per *Lb. casei*, *Lb. paracasei* e *Lb. rhamnosus* che è stata applicata a tutti gli isolati di forma bacillare e una per *Lc. lactis* ssp. *lactis* e *Lc. lactis* ssp. *cremoris* che è stata applicata a tutti gli isolati di forma coccica.

#### PCR specie-specifica per *Lb. casei/paracasei/rhamnosus*

A seconda del tipo di primer utilizzato questa PCR permette di discriminare le due specie, che daranno una banda di 290 bp solo in presenza del primer appropriato. È necessario quindi, per ogni isolato, eseguire due PCR con lo stesso ciclo di amplificazione, ma con diverse coppie di primer. Per questa PCR è stato seguito il protocollo di Ward e Timmins (1999).

Sequenza primer:

- Y2: 5'-CCCACTGCTGCCTCCTCCCGTAGGAGT-3'
- Casei: 5'-TGCACTGAGATTTCGACTTAA-3'
- Para: 5'-CACCGAGATTCAACATGG-3'

Per identificare *Lb. casei* viene utilizzata la coppia di primer Y2-Casei, per *Lb. paracasei* la coppia Y2-Para.

Composizione del mix per ogni reazione di PCR:

Buffer 10x (senza MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75 µL
dNTP's 20mM	0.5 µL
Primer Y2 100 µM	0.25 µL
Primer Casei/Para 100 µM	0.25 µL
Taq 5 U/µl	0.3 µL
H <sub>2</sub> O milliQ	a 25 µL
DNA	5 µL da estrazione per shock termico o

da estrazione con *Instagene*<sup>TM</sup> *matrix*

Programma termico (touchdown):

N° 1 ciclo	94°C 3'
N° 10 cicli	94°C 45''
	65°C 45'' (-1°C/ciclo)
	70°C 30''
N° 15 cicli	94°C 45''
	55°C 45''
	70°C 30''
N° 1 ciclo	72°C 4'

#### PCR specie-specifica per *Lc. lactis* ssp. *lactis/cremoris*

A differenza della precedente, questa PCR permette di discriminare le due specie utilizzando la stessa coppia di primer: infatti si ottiene una banda di 933 bp nel caso di *Lc. lactis* ssp. *lactis* e di 1100-1150 bp nel caso di *Lc. lactis* ssp. *cremoris* (Corroler et al., 1998).

Sequenza primer:

- LcLFor: 5'-CTTCGTTATGATTTTACA-3'
- LcLRev: 5'-CAATATCAACAATTCCAT-3'

Composizione della mix per ogni reazione di PCR:

Buffer 10x (senza MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µL
MgCl <sub>2</sub> 50mM	0.75 µL
dNTP's 20mM	0.25 µL
Primer LcLFor 100 µM	0.25 µL
Primer LcLRev 100 µM	0.25 µL
Taq 5 U/µl	0.25 µL
H <sub>2</sub> O milliQ	a 25 µL
DNA	5 µL da estrazione per shock termico o da estrazione con <i>Instagene</i> <sup>TM</sup> <i>matrix</i>

Programma termico (touchdown):



N° 1 ciclo	94°C 5'
N° 10 cicli	94°C 1'
	58°C 2' (-1°C/ciclo)
	72°C 2'
N° 20 cicli	94°C 1'
	48°C 2'
	72°C 2'
N° 1 ciclo	72°C 5'

I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio (Gibco BRL) al 2% in tampone TAE 1X, in seguito a colorazione con etidio bromuro 0.5 µg/mL (Invitrogen). Come marcatore di peso molecolare è stato utilizzato 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).<sup>3</sup>

### 3.5. *Analisi statistica*

I dati ottenuti dalle conte prima e dopo digestione sono stati elaborati statisticamente mediante analisi della varianza a una via (ANOVA).

---

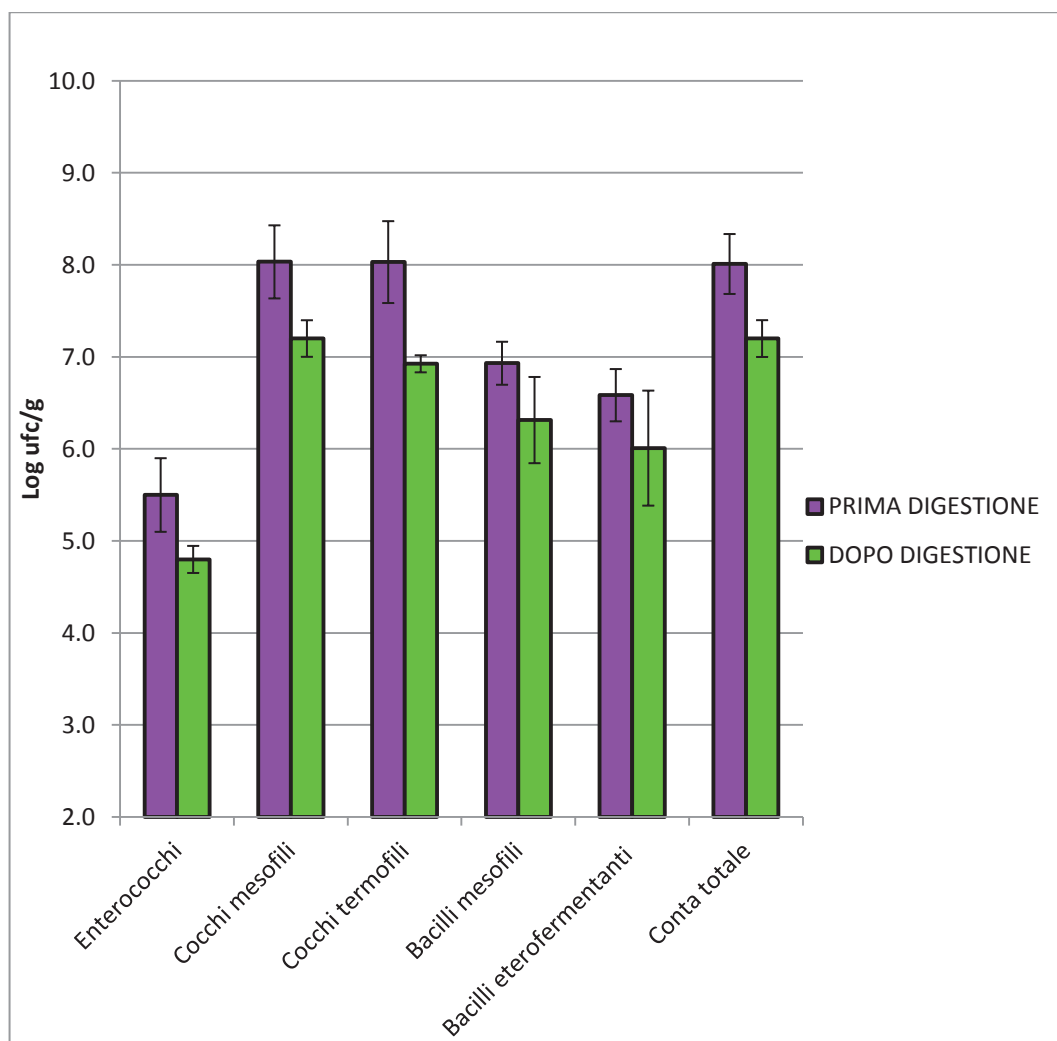
<sup>3</sup> Per tutte le reazioni di amplificazione, salvo diversa indicazione, è stata utilizzata BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline Ltd, London, UK) e sono state caricate su termociclatore PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research Inc., Whatman, MA, USA).

# Capitolo 4

## Risultati

### 4.1. Conte microbiche dei formaggi di malga prima e dopo digestione

Nel grafico 4.1 sono riportati i dati relativi alle cariche microbiche rilevate su vari terreni di crescita in 18 campioni di formaggio prima e dopo digestione gastrointestinale *in vitro*. Ogni dato rappresenta la media di 18 valori  $\pm$  intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).



**Grafico 4.1:** cariche microbiche rilevate nei campioni di formaggio prima e dopo digestione. Ogni colonna rappresenta la media di 18 valori. Le colonne viola riportano le conte prima della digestione, le colonne verdi dopo la digestione. Lungo l'asse delle ascisse sono rappresentati i diversi terreni utilizzati per la crescita. Le barre rappresentano l'intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).

I dati mostrano una riduzione della carica batterica dei formaggi dopo della digestione gastrointestinale *in vitro*.

Le conte di VRBA (coliformi) erano sempre inferiori a 10 ufc/g (dati non mostrati). Le conte batteriche su M17 a 30 °C (cocchi mesofili), a 45 °C (cocchi termofili), su PCA a 30 °C (conta totale) e su KAA (enterococchi) sono diminuite significativamente dopo la digestione. Le conte su MRS (bacilli mesofili) e su MRS – VAN (bacilli eterofermentanti) sono diminuite dopo digestione ma non significativamente ( $p < 0.05$ ).

Dal grafico si nota che i cocchi lattici, sia mesofili che termofili, sono il gruppo microbico principale sia prima che dopo digestione. Prima della digestione entrambi avevano una carica batterica media di 8.0 Log ufc/g. Dopo digestione la carica dei cocchi mesofili e termofili si è abbassata ad una media rispettivamente di 7.2 e 6.9 Log ufc/g. Le cariche medie di bacilli e bacilli eterofermentanti mesofili prima della digestione erano rispettivamente 6.9 e 6.5 Log ufc/g. Dopo digestione la carica si è abbassata non significativamente a 6.3 e 5.8. Questi due gruppi batterici mostravano una variabilità molto alta dopo digestione (valore minimo 5.2 Log ufc/g; valore massimo 6.8 Log ufc/g), variabilità misurabile anche dall'ampiezza dell'intervallo di confidenza.

#### 4.2. Isolamenti e identificazione

Sono stati isolati 36 ceppi da formaggio dopo digestione: 18 da M17 e 18 da MRS. Ogni isolato è stato osservato al microscopio al fine di determinare la morfologia cellulare. Tutti gli isolati da M17 erano cocchi, mentre tutti quelli isolati da MRS erano bacilli.

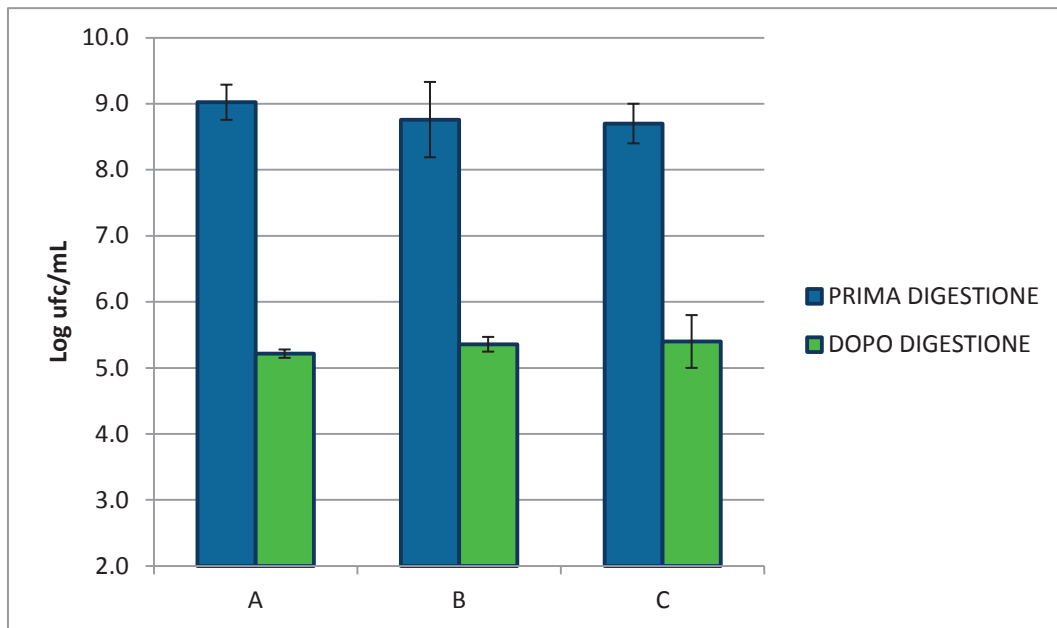
Per ogni ceppo isolato ed osservato è stata fatta un'estrazione veloce del DNA utile per le successive PCR. Dai risultati delle PCR specie-specifiche è emerso che tre cocchi su 18 appartenevano alla specie *Lactococcus lactis* e tre bacilli a *Lactobacillus paracasei*. Questi ceppi sono stati utilizzati nelle prove successive.

#### 4.3. Conte microbiche di latte intero inoculato con batteri lattici (LAB)

Nel grafico 4.2 sono riportati i dati relativi alle medie delle cariche microbiche totali (PCA 30 °C) prima e dopo digestione gastrointestinale *in vitro* rilevate in:

- A, 3 campioni di latte intero inoculato con tre ceppi di *Lactococcus lactis*;
- B, 3 campioni di latte intero inoculato con tre ceppi di *Lactobacillus paracasei*;
- C, 3 campioni di latte intero inoculato con tre ceppi di *Lc. lactis* e tre ceppi di *Lb. paracasei*.

Ogni dato rappresenta la media dei 3 valori  $\pm$  intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).



**Grafico 4.2:** Carica microbica totale rilevata prima e dopo digestione di latte intero inoculato 24h prima con diversi ceppi di *Lc. lactis* e *Lb. paracasei*. Ogni colonna rappresenta la media di 3 valori. Sull'asse delle ascisse troviamo i valori prima e dopo digestione del latte intero inoculato rispettivamente con tre ceppi di *Lc. lactis* (A), tre di *Lb. paracasei* (B) e con tre ceppi di *Lc. lactis* e tre ceppi di *Lb. paracasei* (C). Le barre rappresentano l'intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).

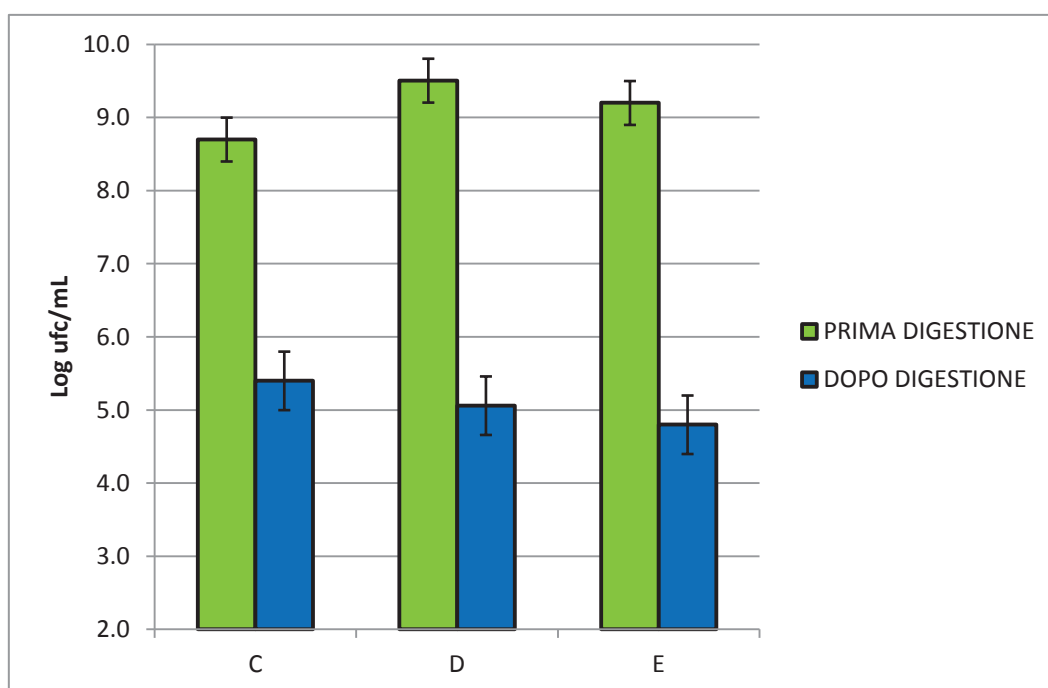
Da questo grafico si può notare come la carica microbica da prima a dopo digestione cali significativamente in tutti e tre i casi. La carica totale media prima della digestione è di 9.0 Log ufc/mL per i latti inoculati 24h prima con *Lc. Lactis* (A), 8.8 Log ufc/mL per quelli inoculati con *Lb. paracasei* (B) e 8.7 Log ufc/mL per quelli inoculati con la miscela di ceppi (C). Dopo digestione la carica media si riduce significativamente di 3.8 fattori logaritmici nei campioni A, 3.4 nei B e 3.3 nei C. I valori della carica batterica, sia prima che dopo digestione, sono molto simili in tutte le tre prove indipendentemente dal ceppo utilizzato. Quindi non c'è una maggiore resistenza al tratto gastrointestinale dovuta alle caratteristiche intrinseche dei cocchi, dei bacilli, o della loro interazione.

#### 4.4. Conte microbiche di diversi tipi di latte inoculati con batteri lattici (LAB)

Nel grafico 4.3 sono riportati i dati relativi alle cariche microbiche totali (PCA 30 °C) prima e dopo digestione gastrointestinale *in vitro* di campioni di latte inoculati 24 h prima con sei ceppi di *Lc. lactis* e *Lb. paracasei*:

- C, 3 campioni di latte intero (almeno 3.5% di grasso);
- D, 3 campioni di latte parzialmente scremato (tra 1.5 e 1.8% di grasso);
- E, 3 campioni di latte magro (meno di 0.5% di grasso).

Ogni dato rappresenta la media dei 3 valori  $\pm$  intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).



**Grafico 4.3:** Carica microbica totale rilevata prima e dopo digestione in latte intero (C), latte parzialmente scremato (D), latte magro (E) inoculati 24h prima con tre ceppi di *Lc. lactis* e tre ceppi di *Lb. paracasei*. Ogni colonna rappresenta la media di 3 valori. Le barre rappresentano l'intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).

Il grafico mostra un significativo calo della carica microbica da prima a dopo digestione. La carica microbica media prima della digestione era 8.7; 9.5 e 9.2 Log ufc/mL rispettivamente in C, D ed E. La riduzione è stata di 3.3 fattori logaritmici per il campione C e di 4.4 per i campioni D ed E; con cariche microbiche totali medie dopo digestione pari a 5.4, 5.1 e 4.8 Log ufc/mL rispettivamente in C, D ed E.

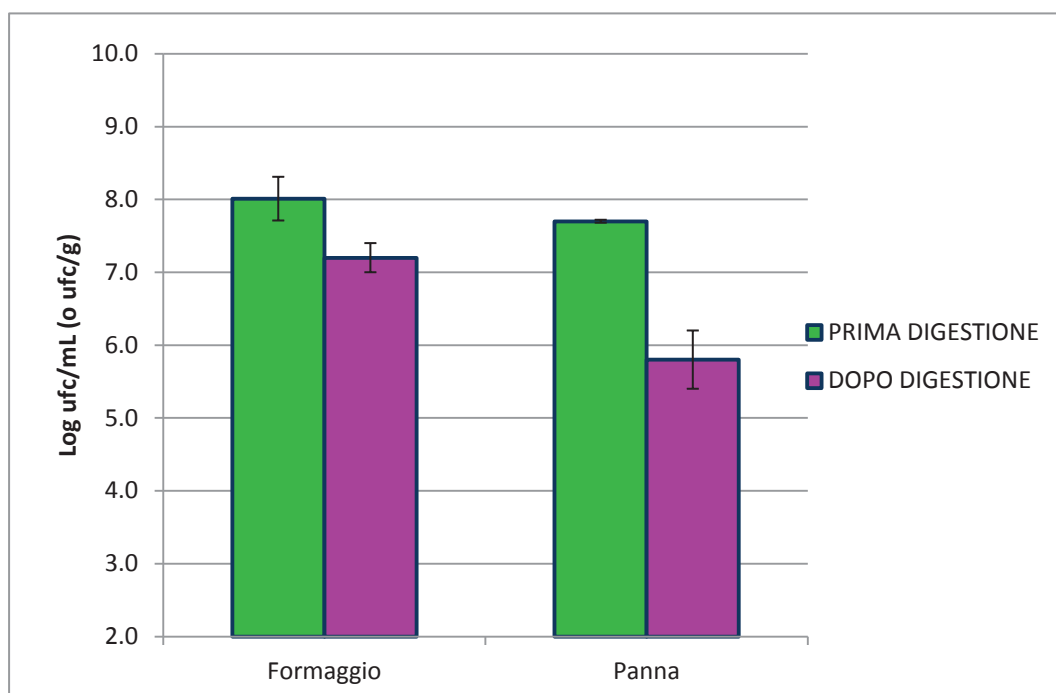
La carica del latte intero fermentato è diminuita da prima a dopo digestione di un Log in meno (3.3 contro 4.4) rispetto a quello parzialmente scremato e magro, quindi il contenuto in grasso influisce positivamente sulla resistenza al passaggio nel tratto gastrointestinale.

#### 4.5. Conte microbiche di formaggio e panna

Nel grafico 4.4 sono riportati i dati relativi alle cariche microbiche totali (PCA 30 °C) prima e dopo digestione gastrointestinale *in vitro* di:

- 18 campioni di formaggio (grasso 23%);
- 3 campioni di panna (grasso 21%);

Tutti i valori sono considerati con  $\pm$  intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).



**Grafico 4.4:** Carica microbica totale media di 18 campioni di formaggio e 3 campioni di panna, prima e dopo digestione. Le barre rappresentano l'intervallo di confidenza ( $p < 0.05$ ).

I dati mostrano un calo significativo in tutti e due i casi. La carica totale media del formaggio prima della digestione era pari a 8.0 Log ufc/g, dopo digestione è diminuita a 7.2 Log ufc/g. La panna aveva una carica totale media prima della digestione di 7.7 Log ufc/mL, e dopo digestione è calata a 5.8. Log ufc/mL.

La carica totale media è diminuita di 0.8 e 1.9 fattori logaritmici rispettivamente in formaggio e panna. Considerando la riduzione (3,3 log) di carica evidenziata per il latte intero fermentato (grafici 4.3 e 4.4), è possibile evidenziare una differenza molto chiara tra i tre prodotti, probabilmente legata sia alla *texture* dell'alimento che al contenuto lipidico.

# Capitolo 5

## Discussione

In letteratura esistono molte pubblicazioni riguardanti la digestione gastrointestinale *in vitro* di batteri lattici come singoli ceppi o come miscele di essi, digeriti sia nel loro terreno culturale che in latte fermentato (Faye et al., 2012; Leverrier et al., 2004); ma ci sono davvero pochi studi sulla digestione *in vitro* di formaggi o di altri prodotti fermentati.

In questo tirocinio si è voluto esaminare come i microrganismi contenuti in un formaggio di malga (da latte crudo e a fermentazione spontanea) sopravvivessero al passaggio nel tratto gastrointestinale mediante un modello di digestione *in vitro*. Le conte microbiche sono state determinate per ogni campione prima e dopo digestione per poterne valutare la sopravvivenza.

Nei campioni di formaggio a sei mesi di stagionatura, prima della digestione, la carica microbica totale era molto elevata,  $10^8$  ufc/g. Risultato in linea con quelli ottenuti da uno studio effettuato su formaggi nostrani trentini a latte crudo, dove si è osservato come la carica batterica rimanga elevata fino a fine stagionatura (6-8 mesi) con valori di  $10^6$ - $10^8$  ufc/g (Poznansky et al., 2005). Le conte sui vari terreni selettivi evidenziano come il gruppo dei cocchi, sia mesofili che termofili, risulti dominante su tutti gli altri. La presenza consistente di lattococchi a fine maturazione è stata riportata anche in precedenti lavori riguardanti formaggi prodotti con latte crudo (Poznansky et al., 2004). Inoltre, la co-presenza di ceppi mesofili e termofili nello stesso prodotto non è insolita nei formaggi artigianali fatti senza l'aggiunta di uno *starter* commerciale (Cogan et al., 1997). I bacilli mesofili hanno presentato una carica minore dei lattococchi di un fattore logaritmico, con un valore di circa  $10^7$  ufc/g; risultato comparabile a quello di un altro formaggio nostrano da latte crudo, dove i lattobacilli mesofili a 7 mesi di stagionatura mostravano una carica di  $3.1 \times 10^6$  ufc/g (Mucchetti e Mondinelli). Gli enterococchi sono presenti con una carica di  $3.2 \times 10^5$  ufc/g prima della digestione, risultato simile a quello dello studio di Mucchetti e Mondinelli, dove



la carica registrata a 7 mesi di stagionatura era pari a  $2.8 \times 10^6$  ufc/g. La famiglia delle *Enterococcaceae* è considerata microflora tipica di produzioni casearie artigianali e a latte crudo (Mucchetti et al., 1982). Questo fatto è spiegato dall'adattabilità degli enterococchi a condizioni ambientali avverse ad altri gruppi microbici; infatti sono in grado di crescere in presenza di elevate condizioni di sale ed acidità (Giraffa, 2003). Seppure la presenza di questi batteri è spesso associata ad una contaminazione di origine fecale, occorre sottolineare che essi rappresentano anche parte della popolazione microbica delle superfici fogliari di molte essenze vegetali, e si ritrovano comunemente nell'ambiente. Va considerato il loro ruolo, di fondamentale importanza, nella conduzione delle fermentazioni e nella definizione delle caratteristiche sensoriali dei formaggi a latte crudo (Cogan et al., 1997).

Dopo la digestione gastrointestinale *in vitro* dei formaggi le cariche sono diminuite in tutti i gruppi microbici, ma non sempre in maniera significativa: i cocchi, sia mesofili che termofili, e gli enterococchi sono calati di circa un fattore logaritmico, mentre i bacilli sono diminuiti meno di un Log e non in maniera significativa. La carica totale è passata da 8 a 7.2 Log ufc/g, da questo dato si deduce che parte della microflora del formaggio sopravvive alla digestione *in vitro*, e che nell'intestino arriva un elevato numero di microrganismi, circa  $10^7$  ufc/g. Questa elevata sopravvivenza potrebbe essere dovuta alle caratteristiche del formaggio, che contiene una percentuale di grasso considerevole ( $> 20\%$ ) ed è caratterizzato da una matrice solida, ma anche ad una resistenza intrinseca dei ceppi all'acidità ed ai succhi gastroenterici.

Per analizzare la resistenza dei ceppi sono stati fatti degli inoculi in latte intero con ceppi isolati da formaggi precedentemente digeriti (tre ceppi di *Lc. lactis* e tre di *Lb. paracasei*). Sia i cocchi che i bacilli non hanno mostrato una particolare resistenza alla digestione, infatti le cariche sono diminuite in media di 3.6 fattori logaritmici. Anche la miscela di cocchi e bacilli, realizzata per valutare il possibile aumento di resistenza dovuto all'interazione tra i due ceppi, non ha portato ad una maggiore sopravvivenza, dato che le cariche sono calate comunque di 3.3 fattori logaritmici dopo digestione. Caratteristiche che potrebbero aver causato il calo notevole della carica nel latte fermentato sono sia la matrice, più liquida e meno consistente, che protegge meno i batteri durante il passaggio nel tratto

gastrointestinale, che il minor contenuto di grassi, 3.5% del latte intero fermentato rispetto al 23% del formaggio. Quindi si può dedurre che l'elevata sopravvivenza nel formaggio non sia dovuta ad un'intrinseca resistenza dei ceppi.

Per determinare quanto il contenuto lipidico incidesse sulla resistenza alla digestione sono stati digeriti tre tipologie di latte fermentato: intero, parzialmente scremato e magro; inoculati con ceppi di *Lc. lactis* e *Lb. paracasei*. I ceppi in latte intero hanno mostrato una maggior sopravvivenza rispetto a quelli inoculati in latte parzialmente scremato e magro; infatti la carica da prima a dopo digestione è diminuita di 3.3 fattori logaritmici in confronto ai 4.4 fattori logaritmici delle altre due tipologie di latte. Si può affermare quindi che un leggero aumento della percentuale di grasso determina una maggior resistenza alla digestione, infatti un contenuto lipidico del 2% in più (rispetto al latte fermentato parzialmente scremato), o del 3% in più (rispetto al latte fermentato magro), comporta un aumento della carica microbica di un fattore logaritmico.

Per valutare se la sopravvivenza fosse dovuta al contenuto lipidico e/o alla *texture* dell'alimento o alla resistenza intrinseca dei ceppi sono state allestite delle prove con panna da affioramento. La panna ha un contenuto lipidico (21%) simile a quello del formaggio (23%) ma una *texture* più simile a quella del latte fermentato (non sono presenti le micelle caseiniche del formaggio ed ha una consistenza viscosa come il latte dopo fermentazione). La differenza di carica totale nella panna da prima a dopo digestione è stata di 1.9 fattori logaritmici; ossia maggiore di 0.8 fattori logaritmici osservati nel formaggio, ma minore di 3.3 fattori logaritmici del latte intero fermentato. Il formaggio, avendo un contenuto lipidico del 23% ed una matrice solida, protegge i batteri durante il transito nel tratto gastrointestinale molto più efficientemente di un alimento fluido o viscoso, quale può essere un latte fermentato, uno yogurt o la panna (Ross et al., 2002; Cruz et al. 2009). Si può perciò dedurre che i fattori che concorrono alla protezione dei microrganismi durante il transito nel tratto gastrointestinale sono sia le proprietà fisico-chimiche dell'alimento, ed in particolare il contenuto lipidico, che le sue proprietà reologiche, come la *texture*.

Da questi risultati si può evincere come sia importante l'interazione tra microflora e matrice alimentare durante il passaggio nel tratto gastrointestinale. L'effetto protettivo della matrice è confermato anche da altri studi, che in parallelo hanno digerito batteri in coltura liquida e in latte fermentato. Ad esempio, nello studio

condotto da Faye et al. (2012), è stata effettuata la digestione *in vitro* di 9 ceppi di batteri lattici ed è stato rilevato come alcuni di essi abbiano beneficiato significativamente della presenza del latte fermentato come matrice alimentare, registrando un incremento notevole di carica rispetto alla digestione degli stessi ceppi in brodo di coltura liquido. Un altro studio, eseguito da Leverrier et al. (2004), ha valutato la tolleranza agli stress gastrointestinali di ceppi di propionibatteri in coltura liquida e inclusi in matrici alimentari (perle di alginato e latte fermentato): la sopravvivenza alla digestione gastrointestinale *in vitro* è stata maggiore in latte fermentato che in coltura liquida. Dai risultati conseguiti in entrambi gli studi è stato evidenziato come il latte fermentato proteggesse notevolmente i batteri. Questo fatto è stato verificato anche da altri autori, che hanno dimostrato come la presenza di prodotti e ingredienti alimentari migliori la vitalità del microrganismi durante il transito gastrico (Huang e Adams, 2004; Zarate et al., 2000).

Quindi, matrici alimentari solide e con un buon contenuto lipidico, come il formaggio, possono migliorare significativamente la protezione delle cellule batteriche nel tratto gastrointestinale e permettere il loro arrivo nell'intestino come cellule vive. Il formaggio è appunto considerato un conveniente veicolo per la consegna di batteri vitali all'intestino in un numero sufficiente tale da produrre effetti di promozione della salute negli esseri umani (Burns et al., 2008). Il valore intrinseco dei prodotti fermentati, quali veicolo di batteri vivi nell'intestino, è stato studiato anche da Bunte et al. (2000), che hanno dimostrato come un ceppo di *Lb. paracasei*, ingerito come componente di insaccati fermentati, sia stato ritrovato nelle feci umane, quindi sopravvissuto al transito nel tratto gastrointestinale.

Con studi più approfonditi dovrà essere studiata la capacità dei batteri sopravvissuti di instaurarsi nell'intestino, arricchendo il microbiota intestinale, ed eventualmente esercitare effetti benefici per la salute. Per esercitare tali effetti i probiotici devono essere ingeriti in quantità di almeno  $10^9$  ufc per die (Linee guida su probiotici e prebiotici, Ministero della Salute, 2013), pertanto 50 grammi di formaggio di malga stagionato a pasto garantirebbero tale approvvigionamento. Infatti la carica di un formaggio di malga a fine stagionatura è di  $10^8$  ufc/g, e di questi  $10^7$  ufc/g sopravvivono a digestione arrivando vitali nell'intestino; lo

yogurt e i lattici fermentati a fine *shelf life* potrebbero contenere una carica insufficiente ( $<10^7$  ufc/g) ad esplicare effetti probiotici (Vinderola et al., 2000). La possibile attività probiotica dei formaggi di malga richiede tuttavia ulteriori e approfonditi studi per dimostrare la reale capacità di insediarsi nell'intestino e di produrre effetti benefici.

# Capitolo 6

## Conclusioni

L'obiettivo di questo lavoro di tirocinio era la valutazione della resistenza dei microrganismi contenuti negli alimenti al passaggio nel tratto gastrointestinale mediante un modello di digestione *in vitro*. Sono stati analizzati campioni di formaggio di malga a sei mesi di stagionatura, panna e latte fermentato, per poter confrontare alimenti con diversa matrice e diverse proprietà fisico-chimiche. Le cariche dei vari gruppi microbici sono state valutate prima e dopo digestione mediante conta su piastra.

Dai risultati ottenuti si evince come il formaggio sia il miglior vettore di batteri, per l'elevato tenore lipidico e per la *texture* dell'alimento. La matrice solida infatti esercita una maggior protezione delle matrici viscosi nei confronti dei microrganismi.

La carica microbica totale del formaggio che arriva vitale nell'intestino dopo digestione è pari a  $10^7$  ufc/g, valore consistente che potrebbe influenzare notevolmente il microbiota intestinale. Questo fatto però dovrà essere verificato con ulteriori studi per valutare la capacità dei batteri di instaurarsi nell'intestino ed eventualmente esercitare attività probiotiche a beneficio della salute del consumatore.

# Bibliografia

**Anthony, C. P., Thibodeau, G. A.** (1979). *Anatomia e fisiologia*. The C. V. Mosby company, St. Louise, Missouri.

**Aureli, P., Capurso, L., Castellazzi, A.M., Clerici, M., Giovannini, M., Morelli, L., Poli, A., Pregliasco, F., Salvini, F., Zuccotti, G.V., Cricelli, C., Danese, S., Delle Fave, G., Fatati, G., Marrocco, W.** (2010). *Probiotici e salute, stato dell'arte basato sulle evidenze*. Pacini Editore S.p.A., Pisa, Italia.

**Bentivoglio, M., Bertini, G., Cavaletti, G. A., Del Fiacco, M., Esposito, V., Geuna, S., Giacobini, G., Giannetti, S., Granato, A., Maffione, A. B., Marmiroli, P. L., Ottani, V., Papa, M., Passiatore, C., Quartu, M., Raspanti, M., Robecchi, M. G., Savio, T., Toesca, A., Valentino, B., Vercelli, A., Zancanaro, C.** (2010). *Anatomia umana e istologia*. Edizioni Minerva Medica, Torino, Italia.

**Borgstrom, B., Erlanson-Albertsson, C., Wieloch, T.,** (1979). *Pancreatic colipase: chemistry and physiology*. Journal of Lipid Research, (20), 805-816.

**Bovolenta, S.** (2000). *Il pascolo alpino come strumento di valorizzazione del territorio e di qualificazione dei prodotti caseari locali. La realtà del Trentino e la sperimentazione nel settore dell'alpeggio*. Agribusiness Paesaggio & Ambiente n. 3.

**Brasca, M., Lodi, R., Morandi, S., Todesco, R.** (2006). *Isolamento e studio della microflora autoctona di alcune produzioni casearie lombarde*. Scienza e tecnica lattiero-casearia, 57, (5), 331-343.

**Brasca, M., Lodi, R., Morandi, S., Todesco, R., Vanoni, L.** (2005). *Isolamento*

*e studio della microflora autoctona e caratteristica di alcune produzioni casearie dell'arco alpino. Caratterizzazione di formaggi tipici dell'arco alpino: il contributo della ricerca. Temi, Trento. Pp 197-207.*

**Bugaud, C., Buchin, S., Coulon, J.B., Hauwuy, A., Dupont, D. (2001).**

*Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk. Lait 81, 401-414.*

**Bunte, C., Hertel, C., Hammes, W. P. (2000).** *Monitoring and survival of Lactobacillus paracasei LTH 2579 in food and the human intestinal tract. System. Appl. Microbiol. 23, 260.*

**Burns, P., Patrignani, F., Serrazanetti, D., Vinderola, G.C., Reinheimer, J., Lanciotti, R. (2008).** *Probiotic crescenza cheese containing Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus manufactured with high-pressure homogenized milk. J. Dairy Sci. 91, 500-512.*

**Carey, M. C., Small, D. M., Bliss, C. M. (1983).** *Lipid digestion and absorption. Annual Review of Physiology. 45, 651-677.*

**Cogan, T. M., Barbosa, M., Beuvier, E., Bianchi-Salvadori, B., Cocconcelli, P. S., Fernandes, I., Gomez, J., Gomez, R., Kalantzopoulos, G., Ledda, A., Mediana, M., Rea, M. C., Rodriguez, E. (1997).** *Characterization of the lactic acid bacteria in artisanal dairy products. Journal of Dairy Research, 64, 409-421.*

**Cruz, A.G., Buriti, F.C.A., de Souza, C.H.B., Fonseca, J.A.F., Saad, S.M.I., (2009).** *Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. Trends Food Sci. Technol. 20, 344-354.*

**De Vuyst, L., (2000).** *Technology aspects related to the application of functional starter cultures. Food Technol. Biotechnol. 38, 105-112.*

**Di Nunzio, M. (2012).** *Esempio di valutazione degli effetti delle tecnologie*

*alimentari sulla digeribilità degli alimenti* Presentazione CIBUS Parma 2012.

**Faye, T., Tamburello, A., Vegarud, G. E., Skeie, S.** (2012). *Survival of lactic acid bacteria from fermented milks in an in vitro digestion model exploiting sequential incubation in human gastric and duodenum juice*. J. Dairy Science 95, 558-566.

**FitzGerald, R.J., Murray, B.A.** (2006). *Bioactive peptides and lactic fermentations*. J. Dairy Technol. 59, 118-125.

**Fox, P.F., Wallace, J.M.** (1997). *Formation of flavour compounds*. Adv. Appl. Microbiol. 45, 17-85.

**Framondino, V., Gasperi, F., Biasioli, F., Endrizzi, G., Cescatti, G., Giacomelli, F., Bruni, E., Avancini, A., Vettori, M., Pecile, A.** (2005). *Formaggi trentini prodotti con latte di malga*. Caratterizzazione di formaggi tipici dell'arco alpino: il contributo della ricerca. Temi, Trento.

**Giraffa, G.** (2003). *Functionality of enterococci in dairy products*. Int. J. Food Microbiol. 88, 215-222.

**Gotcheva, V.** (2013). *Gut microbiota: contribution of bacteria from traditional fermented foods*.(p. 7). Libro degli abstract: The Intestinal Microbiota and Gut Health: Contribution of the Diet, Bacterial Metabolites, Host Interactions and Impact on Health and Disease. Valencia, 2013.

**Huang, Y., Adams, M.C.** (2004). *In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria*. Int. J. Food Microbiol. 91, 253-260.

**Kitts, D.D., Weiler, K.** (2003). *Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery*. Curr. Pharm. Des. 9, 1309-132.



**Larcher, R., Nicolini, G., Bertoldi, D., Bontempo, L.** (2005). *Azotati a basso peso molecolare in formaggi tipici*. Caratterizzazione di formaggi tipici dell'arco alpino: il contributo della ricerca. Temi, Trento.

**Leverrier, P., Fremont, Y., Rouault, A., Boyaval, P., Jan, G.** (2005). *In vitro tolerance to digestive stresses of propionibacteria: influence of food matrices*. Food Microbiology 22, 11–18.

**Lodi, R., Brasca, M.** (2006). *La microflora autoctona dei formaggi delle Alpi*. Scienze e tecnica lattiero-casearia, 57 (2), 77-85.

**Lodi, R., Malaspina, P., Brasca, M.** (1994). *I batteri lattici: un parametro di qualità per i formaggi freschi*. Ind. Latte 30 (4), 3-16.

**Mandalari, G., Faulks, R. M., Rich, G.T., Lo Turco, V., Picout, D. R., Lo Curto, R. B., Bisignano, G., Dugo, P., Dugo, G., Waldron, K. W., Ellis, P. R., Wickham, M. S. J.** (2008). *Release of Protein, Lipid, and Vitamin E from Almond Seeds during Digestion*. J. Agric. Food Chem. 56, 3409–3416.

**Marilley, L., Casey, M. G.** (2004). *Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains*. Int. J. Food Microbiol., 90, 139-159.

**McGuire, M. A., McGuire M. K.** (2000). *Conjugated linoleic acid (CLA): A ruminant fatty acid with beneficial effects on human health*. J. Anim. Sci. 77, 1-8.

**Michel, V.A., Hauwuy, A., Chamba, J.F.** (2001). *La flore microbienne des laits crus de vache: diversité et influence des conditions de production*. Lait 81, 575-592.

**Ministero della Salute**, Linee guida sui probiotici e prebiotici, (2013).  
[http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_1016\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_allegato.pdf)

**Moreno, F. J., Mackie, A. R., Mills, C. E. N.** (2005). *Phospholipid interactions protect the milk allergen R-lactalbumin from proteolysis during in vitro digestion*. J. Agric. Food Chem. 53, 9810–9816.

**Mucchetti, G., Neviani, E.** (2006). *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza*. Tecniche nuove, Milano, IT.

**Mucchetti, G., Neviani, E., Todesco, R., Lodi, R.** (1982). *Ruolo degli enterococchi nei formaggi italiani. Attività lipolitica e caseinolitica*. Latte 7, 821-829.

**Mucchetti, G., Mondinelli, R.** *Relazione tecnica sulla produzione di formaggio Nostrano Valtrompia*.  
[http://nostrano-valtrompia.it/file/relazione\\_tecnica.pdf](http://nostrano-valtrompia.it/file/relazione_tecnica.pdf)

**Norma ISO 9452:2008**

**Peterson, S.D., Marshall, R.T.** (1990). *Non-starter lactobacilli in Cheddar cheese: a review*. J. Dairy Sci. 73, 1393-1410.

**Poznansky, E., Cavazza, A., Schiavon, S., Franciosi, E., Cappa, F., Cocconcelli, P. S.** (2005). *Biodiversità e dinamiche delle popolazioni microbiche dei formaggi nostrani trentini*. Caratterizzazione di formaggi tipici dell'arco alpino: il contributo della ricerca. 175-186 Temi, Trento.

**Poznansky, E., Cavazza, A., Cappa, F., Cocconcelli, P. S.** (2004). *Indigenous raw milk microbiota influences the bacterial development in traditional cheese from an alpine natural park*. Int. J. Food Microbiol. 92, 141-151.

**Rapparini, F.** *Gli aromi e la ricerca scientifica*. Supplementi al dizionario di chimica e chimica industriale ([www.minerva.unito.it](http://www.minerva.unito.it)).

- Regazzo, D.** (2010). *Bioactive peptides from milk proteins: focusing on peptides displaying immunomodulatory activity*. [Tesi di dottorato].
- Ross, R.P., Fitzgerald, G., Collins, K., Stanton, C.** (2002). *Cheese delivering biocultures e probiotic cheese*. *Aust. J. Dairy Technol.* 57, 71-78.
- Settanni, L., Corsetti, A.** (2008). *Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation*. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 123-138.
- Settanni, L. e Moschetti, G.** (2010). *Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits*. *Food Microbiol.* 27, 691-697.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Di Cagno, R., Rizzello, C.G., Coda, R., Gobbetti, M.** (2007). *Synthesis of g-aminobutyric acid by lactic acid bacteria isolated from a variety of Italian cheeses*. *Appl. Environ. Microbiol.* 22, 7283-7290.
- Smith, B. A.** (2004). *Formation of Amino Acid Derived Cheese Flavour Compounds*.
- Turner, K.W., Lawrence, R.C., Levriere, J.** (1986). *A microbiological specification for milk for aseptic cheese making*. *Dairy Sci. Technol.* 21, 249-254.
- Vinderola, G. C., Costa, G. A., Regenhardt, S., Reinheimer, J. A.** (2002). *Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria*. *International Dairy Journal* 12, 579–589.
- Vinderola, C.G., Prosello, W., Ghilberto, T.D., Reinheimer, J.S.** (2000). *Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinean Fresco cheese*.

J. Dairy Sci. 83, 1905-1911.

**Widmaier, E. P., Raff, H., Strang, K. T.** (2011). *Fisiologia Vander*. Casa editrice ambrosiana, Milano.

**Wieloch, T.** (1985). *Trypsin activation of porcine procolipase. Kinetics of activation and effects on lipid binding*. FEBS Letters 2587, 185, num 1.

**Zago, M., Fornasari, M. E., Carminati, D., Burns, P., Suarez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G.** (2011). *Characterization and probiotic potential of Lactobacillus plantarum strains isolated from cheeses*. Food Microbiology Aug; 28 (5), 1033-40.

**Zarate, G., Perez-Chaia, A., Gonzalez, S., Oliver, G.** (2000). *Viability and B-galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids*. J. Food Prot. 63, 1214-1221.