

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA CAMPUS DI CESENA  
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA RELAZIONE FINALE:

**Effetto di batteri lattici probiotici  
microincapsulati sulle proprietà chimico-  
fisiche e microbiologiche di Squacquerone  
funzionale**

RELAZIONE FINALE IN:

LABORATORIO DI MICROBIOLOGIA APPLICATA

Relatore:

Prof.ssa Rosalba Lanciotti

Presentato da:

Ana Muschei

Correlatori:

Dott.ssa Francesca Patrignani

Dott.ssa Diana I. Serrazanetti

**Sessione Unica**

Anno Accademico 2015-2016



## INDICE:

|   |          |
|---|----------|
| <b>1.CAPITOLO PRIMO – INTRODUZIONE.....</b>   | <b>7</b> |
| 1.0 Prodotti lattiero-caseari.....  | 7        |
| 1.1 Formaggio.....  | 8        |
| 1.1.1 Definizione.....  | 8        |
| 1.1.2 Breve storia del formaggio.....   | 8        |
| 1.1.3 Processo di caseificazione.....   | 9        |
| 1.1.4 Classificazione dei formaggi.....   | 11       |
| 1.2 Squacquerone di Romagna DOP.....  | 12       |
| 1.2.1 Disciplinare dello Squacquerone DOP.....  | 12       |
| 1.2.2 Diagramma di flusso e produzione.....   | 14       |
| 2.0 Colture starter.....  | 15       |
| 2.1 Lattoinnesto di <i>Streptococcus thermophilus</i> .....                               | 16       |
| 3.0 Alimenti funzionali.....  | 17       |
| 3.1 Formaggio funzionale.....   | 19       |
| 4.0 Co-starter.....   | 19       |
| 5.0 Probiotici.....   | 20       |
| 5.1 <i>Lactobacillus crispatus</i> .....  | 22       |
| 5.2 <i>Lactobacillus paracasei</i> .....  | 22       |
| 6.0 Tecnologie per mantenere vitali i microrganismi funzionali in matrici alimentari..... | 22       |
| 6.1 Microincapsulazione .....   | 23       |
| 6.1.1 La microincapsulazione applicata ai probiotici.....                                 | 25       |
| 6.1.2 Applicata ad alimenti funzionali.....   | 28       |

**2.CAPITOLO SECONDO – OBIETTIVI.....31**

**3.CAPITOLO TERZO – MATERIALI E METODI.....35**

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.0   | Processi di pre-caseificazione   |    |
| 1.1   | Ceppi impiegati: <i>Lactobacillus crispatus</i> e <i>Lactobacillus paracasei</i> ..... | 35 |
| 1.2   | Analisi ceppi.....   | 35 |
| 1.2.1 | Microscopia a scansione elettronica .....  | 36 |
| 1.3   | Creazione dell'inoculo.....  | 36 |
| 1.4   | Creazione di pellet di cellule.....  | 36 |
| 1.5   | Creazione delle capsule.....   | 36 |
| 1.6   | Campionamento.....   | 37 |
| 2.0   | Processo di produzione dello Squacquerone.....   | 37 |
| 3.0   | Analisi delle Squacquerone.....  | 41 |
| 3.1   | Analisi chimico-fisiche: pH e $a_w$ .....  | 41 |
| 3.2   | Analisi microbiologiche.....   | 41 |
| 3.3   | Analisi reologiche.....  | 43 |
| 3.4   | Analisi di proteolisi e determinazione del grado di proteolisi.....                    | 43 |
| 3.5   | Analisi sensoriale: panel test.....  | 47 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>4.CAPITOLO QUARTO – RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b> | <b>49</b> |
| 1.0 Risultati chimico-fisici.....                       | 53        |
| 2.0 Risultati microbiologici.....                       | 55        |
| 3.0 Risultati reologici.....                            | 60        |
| 4.0 Risultati di proteolisi.....                        | 64        |
| 5.0 Risultati sensoriali.....                           | 73        |
| <br>  |           |
| <b>5.CAPITOLO QUINTO – CONCLUSIONE .....</b>            | <b>77</b> |
| <br>  |           |
| <b>6.BIBLIOGRAFIA.....</b>                              | <b>79</b> |



# 1.CAPITOLO PRIMO – *Introduzione*

## 1.0 Prodotti lattiero-caseari

I prodotti lattiero-caseari sono dei prodotti alimentari, ad alto rendimento energetico, ottenuti dalla lavorazione del latte all'interno di caseifici specializzati. Si tratta ad esempio di: siero di latte, sieroproteine, lattosio, ricotta, crema di latte o panna, burro, latticello, formaggio, caseina e latti fermentati (come yogurt, latte cagliato, buttermilk, kefir, yakult, kumiss) (Reg. CE 1234/2007). Questi derivati sono dei prodotti più stabili, nati dalla necessità di avere a disposizione alimenti a base di latte meno deperibili dello stesso latte fresco.

Tra i prodotti lattiero-caseari più diffusi vi sono la ricotta, il burro, il formaggio e i latti fermentati. Di seguito vengono riportate le loro caratteristiche peculiari.

La ricotta, precisamente un latticino, è ottenuta dalla coagulazione delle sieroproteine del latte.

Il burro, un'emulsione dell'acqua in grasso, è ottenuto dalla lavorazione della panna, o crema di latte.

Il formaggio è un prodotto solido o semisolido, fresco o stagionato, derivato dalla coagulazione acida o presamica del latte intero, totalmente o parzialmente scremato oppure dalla crema di latte facendo uso di fermenti e sali da cucina.

I latti fermentati, o preparazione latte speciali, sono <<*prodotti ottenuti per coagulazione del latte, senza sottrazione di siero, ad opera esclusiva di microrganismi della fermentazione prevalentemente acida ovvero acido-alcoolica, specifici di ciascun latte fermentato, mantenuti vivi e vitali ed in quantità elevata fino alla data di validità riportata sul contenitore*>> (R.D. del 1929).

In particolare, ad esempio, lo yogurt è ottenuto, in aggiunta a quanto detto prima, esclusivamente dall'azione di due microrganismi specifici in associazione: *Lactobacillus del brueckii subsp. Bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Le sue caratteristiche e proprietà, sono dovute alla presenza dei suddetti microrganismi vivi e vitali in quantità non inferiore a 10 milioni per grammo di prodotto, fino alla data di validità riportata sul contenitore. Il latte cagliato, invece, come gli altri latti fermentati, è ottenuto dalla lavorazione e azione di altri microrganismi, diversi da quelli citati per lo yogurt, in particolare dall'opera di *Lb. acidophilus*, *St. thermophilus*, *Lactococcus lactis*,

*Lactococcus diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, ad una temperatura di 20-30°C. Il buttermilk è lavorato con tipiche colture mesofile da burro, che lo arricchiscono di composti aromatici. Il kefir, invece, è ottenuto da un'ampia varietà di microrganismi appartenenti a diversissime specie in simbiosi: Lieviti, Lactobacilli, Lattococchi mesofili e Acetobacter. Lo Yakult, tipico giapponese, è una bevanda a base di latte fermentato a opera di *L. casei Shirota*.

## **1.1 Formaggio**

### **1.1.1 Definizione**

Vi sono diverse definizioni del formaggio. Dal punto di vista legislativo vi è una classica definizione riportata nel *D.L. 15.10.1925 n. 2033*: <<*il formaggio è il prodotto che si ottiene dalla coagulazione acida o presamica del latte intero o parzialmente o totalmente scremato o dalla crema, anche facendo uso di fermenti o di sale da cucina*>>. Mentre a livello del CODEX Alimentarius, <<*il formaggio è il prodotto fresco o stagionato, solido o semisolido ottenuto per coagulazione di latte, latte scremato, latte parzialmente scremato, crema, crema di siero o di latticello, soli o in combinazione tra loro, e per cessione parziale del siero che si separa da questa coagulazione*>>.

### **1.1.2 Breve storia del formaggio**

Il formaggio è un prodotto nato all'ombra del latte, e insieme hanno portato nel tempo scarse documentazioni che ne testimoniassero la ricchezza qualitativa e l'importanza nutrizionale. Nonostante ciò, in addizione all'elevata deperibilità, vi sono rimaste valide citazioni di questo prodotto, oggi tanto pregiato. Con la produzione del latte e dunque con l'addomesticazione degli animali lattiferi, prima capra, poi pecora e successivamente vacca e alternative interessanti come giumenta, bufala, cammello e lo yak, si è passati pian piano alla trasformazione della materia prima ottenendo prodotti particolari.

Prime notizie del formaggio si ricavano da ritrovamenti preistorici di utensili di terracotta forati, presumibilmente impiegati per far sgocciolare il siero e trattenere la cagliata. Si tratta di ritrovamenti datati al 6000 a. C. ma a cui comunque non è stata attribuita grande rilevanza (Ottogalli, 2001). Dei riscontri ben documentati si hanno a partire dalla nascita di grandi imperi, e precisamente da quello sumero in Mesopotamia. Si hanno avuti documenti come *'Fregio del latte'* del 3000-2500 a. C.; *'Storia degli animali'* di Aristotele in cui si parla di coagulanti vegetali e di caglio; *'Corpus Hippocraticum: Della dieta'* di Ippocrate in cui vengono effettivamente elogiate le



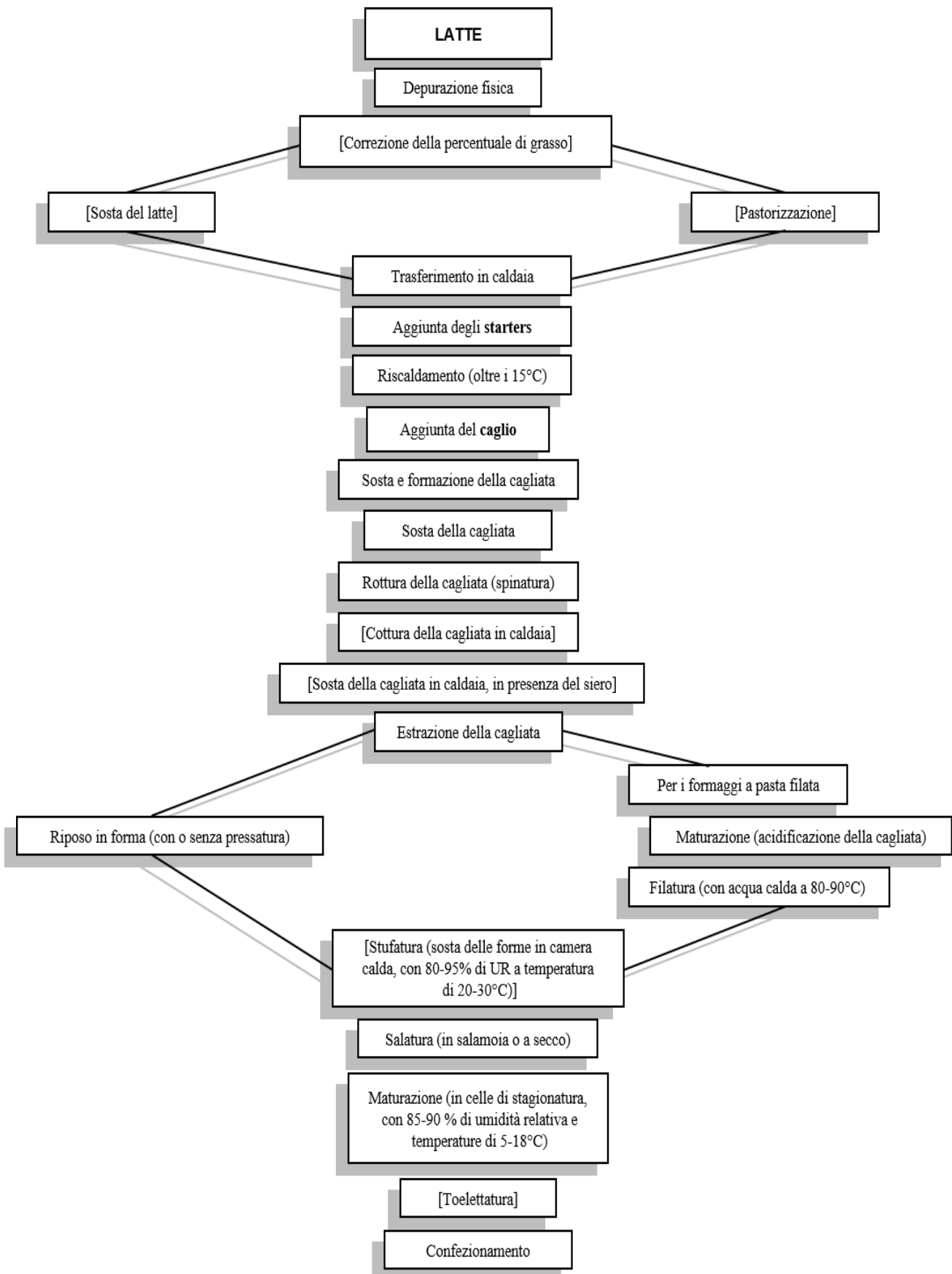
peculiari caratteristiche di questo prodotto nutritivo. Altri riferimenti si hanno nelle commedie di Plauto attraverso nomignoli affettuosi come ‘*dulciculus caseus*’ e ‘*meus molliculus caseus*’ ; in ‘*Summa lacticinorum*’, vero e proprio trattato sul latte e i suoi derivati, del medico Pantaleone da Condienza, 1477, sono riportate notizie sugli aspetti tecnologici e nutrizionali; e vari altri.

Col passare dei secoli, e con la nascita del vero e proprio settore lattiero-caseario, si è attribuita sempre maggiore importanza al formaggio come alimento presente ad ogni pasto, tanto da ricordare la famosa citazione di un colto gastronomo francese dell’Ottocento, Brillat-Savarin, in ‘*Fisiologia del gusto*’: <<*Un pasto senza formaggio è come una donna senza un occhio.*>>!

### **1.1.3 Processo di caseificazione**

Il processo di caseificazione (figura 1.1) è rappresentato da una serie di azioni atte a far aggregare le micelle caseiniche in un’unica maglia proteica, la cagliata, per separarla dal siero. Tale cagliata è un insieme di proteine, grasso, frazioni dello stesso siero, microrganismi vari, enzimi, che andranno a trasformare la stessa nel formaggio prestabilito. Sono tutte quelle azioni che vanno dalla preparazione del latte, quindi dalla lavorazione della cagliata, ricca in microrganismi ed enzimi utili a trasformare tutti i suoi componenti; attraverso il cambio di forma della cagliata, da soluzione a gel, caratterizzato da una precisa consistenza; alla preparazione per la successiva e ultima fase di stagionatura o maturazione.

Fig. 1.1 : Diagramma di flusso della produzione del formaggio (tra le parentesi quadre sono indicate le operazioni che sono eseguite solo in alcune produzioni).



### 1.1.4 Classificazione dei formaggi

La classificazione classica dei formaggi viene fatta basandosi su alcuni parametri caratterizzanti questo ricchissimo prodotto:

- **tipo di latte** impiegato: si possono avere latte vaccini, pecorini, bufalini e caprini;
- **contenuto in grasso**, espresso sulla sostanza secca: esistono il formaggio grasso, il cui contenuto è superiore al 35% sulla sostanza secca; il formaggio leggero, se il contenuto di grasso è compreso tra il 20 e il 35% sulla sostanza secca; il formaggio magro, se inferiore al 20% sulla sostanza secca;
- **consistenza**, in rapporto alla percentuale d'acqua: formaggio a pasta molle, il cui contenuto in acqua supera il 45%, questo tipo di formaggio può o meno presentare la crosta; formaggio a pasta semidura, se il contenuto percentuale di acqua è compreso tra il 35 e il 45%; formaggio a pasta dura, se è inferiore al 35%;
- **tecnologia** usata per la **produzione** e temperatura di lavorazione della cagliata: si hanno così formaggio a pasta cruda, se la cagliata non è soggetta ad alcun riscaldamento ad eccezione della temperatura di coagulazione; formaggio a pasta semicotta, se il riscaldamento della cagliata è inferiore ai 48°C; formaggio a pasta cotta, se le temperature superano i 48°C; formaggio a pasta filata, se la cagliata viene filata in acqua calda a 70-90°C; formaggio erborinato, se il latte è aggiunto di muffe che andranno a influire sulla maturazione dello specifico prodotto conferendone particolari caratteristiche;
- **periodo di stagionatura**: si hanno formaggio fresco, se ottenuto per coagulazione acida o presamica non sono sottoposto a stagionatura, e va consumati in breve tempo dalla produzione; formaggio stagionato a maturazione breve, se questa non supera i 30 giorni; formaggio stagionato a maturazione media, non oltre i 6 mesi; formaggio stagionato a maturazione lenta, se questa è superiore ai 6 mesi.
- **denominazione**: distingue i formaggi in formaggi a Denominazione di Origine Protetta (DOP), ovvero in <<formaggi prodotti in zone geograficamente delimitate, osservando usi locali leali e costanti e le cui caratteristiche merceologiche derivano prevalentemente dalle condizioni proprie dell'ambiente di produzione>> (Capo I, art.2. L. 10.4.54 n. 125); formaggi a Indicazione Geografica Protetta (IGP), ovvero <<formaggi prodotti sul territorio nazionale, osservando usi

leali e costanti, le cui caratteristiche merceologiche derivano da particolari caratteristiche delle materie prime o della tecnica di produzione>> (Capo I, art. 2. L. 10.4.54 n. 125); formaggi ‘Specialità tradizionale garantita’ (STG), ovvero <<formaggi la cui specificità consiste nel rispetto di un dettagliato metodo di produzione tradizionale, mentre manca un legame con una zona geografica: possono, pertanto, essere prodotti su tutto il territorio nazionale.>> (Reg. CE n. 509/2006); formaggi tradizionali, detti anche ‘regionali’ sono in numero superiore a 450, tra cui lo Squacquerone.

## **1.2 Squacquerone di Romagna DOP**

Lo Squacquerone di Romagna DOP è un formaggio fresco molle, a pasta poco legata, dall’aspetto quasi squagliato. Di fatto, il nome ‘squacquerone’ è legato alle sue caratteristiche esteriori, di una cagliata che si espande, quindi, in dialetto, che ‘squaquera’, e assume la forma del contenitore.

È un formaggio presamico o presamico-acido, con un alto tasso di umidità, (58-65%), ottenuto dalla lavorazione del latte intero vaccino pastorizzato aggiunto di fermenti lattici vivi e autoctoni, sale e caglio. È un alimento molto nutritivo della tavola romagnola, tradizionalmente prodotto e consumato con una piadina. In passato veniva prodotto solo d’inverno come accennò il Panzini : <<Una specie di formaggio molle che fanno i contadini d’inverno in Romagna>> (Raduano et al. 2014).

Si presenta bianco, incline ad un bianco madreperla, compatto a prima vista ma come detto facilmente squagliabile. Presenta un aroma gradevole di latte, leggermente acidulo ma delicato, con retrogusto erbaceo. La sua produzione, e il reperimento del latte, avviene esclusivamente in determinate zone.

### **1.2.1 Disciplinare dello Squacquerone DOP**

Lo Squacquerone ha assunto la denominazione DOP, dal 2013, per l’unicità delle sue caratteristiche. È prodotto, come accennato prima, esclusivamente in un particolare ambiente geografico, l’Emilia Romagna. In dettaglio, come citato nell’Art.3 del ‘*Disciplinare di produzione Squacquerone di Romagna DOP*’ <<la zona di produzione coinvolge la provincia di Ravenna, provincia di Forlì-Cesena, provincia di Rimini, provincia di Bologna e parte del territorio della provincia di Ferrara delimitata a ovest dalla Strada Statale n.64 (Porrettana) e a nord dal fiume Po>>. Inoltre, ogni fase di produzione e ogni persona, fisica o giuridica, venuta a contatto con il processo, sono registrate per garantire la tracciabilità del prodotto.

L'etichettatura di questo prodotto deve presentarlo come 'Squacquerone di Romagna – Denominazione d'Origine Protetta' o 'Squacquerone di Romagna –DOP', accompagnata dal logo comunitario, nome, ragione sociale e l'indirizzo dell'azienda produttrice/confezionatrice. Questo prodotto deve essere conservato ad una temperatura compresa tra 0 e +6°C. Infine <<il marchio esterno, riportato sull'involucro esterno protettivo del formaggio deve essere 'Squacquerone di Romagna in caratteri Sari Extra Bold Inclinato con colori ammessi blu pantoni 2747 e bianco di dimensioni proporzionali alla confezione>> come di seguito riportato (figura 1.2)

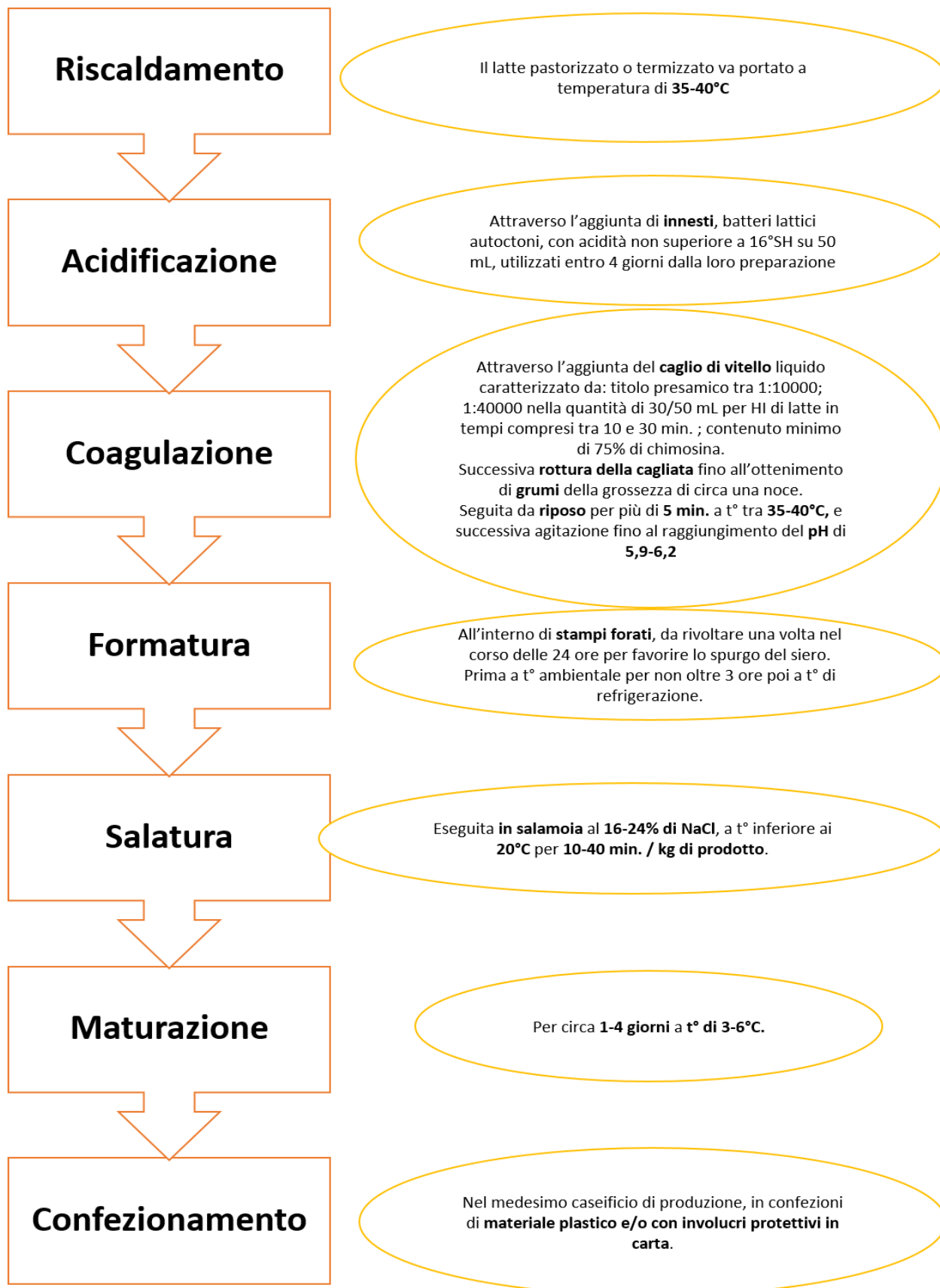
Fig. 1.2 : marchio Squacquerone di Romagna DOP da riportare sull'involucro esterno della confezione.



***Squacquerone***  
***di Romagna***

## 1.2.2 Diagramma di flusso e produzione

In figura 1.3 è riportato il diagramma di flusso e di produzione dello Squacquerone di Romagna DOP:



## 2.0 Colture starter

La coltura starter, innesto o ‘fermento’, è costituita da una o più colture microbiche che vengono aggiunte al latte in caldaia per avviare il processo fermentativo ovvero per favorirne la moltiplicazione e la loro attività. Gli starter servono al latte per favorire la metabolizzazione dei componenti presenti, la formazione di un involucro esterno, crosta, o per permettere lo sviluppo fungino tipico dei formaggi erborinati. Di base può essere impiegato un **innesto naturale** o **selezionato**. L’innesto naturale è fabbricato direttamente in caseificio secondo tradizioni tipiche: se si utilizza il latte si parla di latte-innesto; se invece si utilizza il siero, si parla di siero-innesto; in caso si utilizzi la scotta, ovvero il liquido ottenibile dalla ricotta, si parla di scotta-innesto. In questo primo caso generale, la flora batterica della coltura è mista, in cui prevalgono una o più specie. L’innesto selezionato, invece, viene scelto e preparato in laboratori specializzati in forma liquida, congelata o liofilizzata, che quindi deve essere pre-trattato dal caseificio stesso prima dell’utilizzo. Anche in questo secondo caso si tratta di una coltura microbica pura o mista.

La produzione industriale di formaggio richiede una standardizzazione qualitativa del prodotto, motivo per cui vengono richieste colture selezionate. Queste sono preparate in laboratorio secondo criteri fondati su analisi di ricerca condotte durante la caratterizzazione tecnologica dei ceppi impiegati. I singoli ceppi vengono isolati da habitat naturali al fine di promuovere e trasferire determinate peculiarità al formaggio finale. La maggior parte di queste colture sono batteri lattici termofili (Neviani et al., 2006; Neviani et al., 1993), assieme a differenti biotipi di *St. thermophilus*, si possono avere miscele di *St. thermophilus* e *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, oppure associazioni di *Lb. helveticus*, *Lb. delbrueckii* spp. *bulgaricus* e *Lb. delbrueckii* spp. *lactis*, oppure anche miscele di lattococchi mesofili. Ogni produzione ha la sua miscela caratteristica (tabella 1.1 , Anil et al.,2016).

Tab. 1.1 Anil et al.,2016 : i principali microrganismi impiegati come colture starter nei prodotti lattiero-caseari fermentati:

**Table 1.1** Microorganism Commonly Used as Starter Cultures in Fermented Dairy Products

| BACTERIA  | YEASTS  | MOLDS   |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>B. adolescentis</i>, <i>B. brevis</i>,<br/><i>B. bifidum</i>, <i>B. infantis</i>, <i>B. lactis</i>,<br/><i>B. longum</i></li> <li>• <i>Brevibacterium</i> (<i>Bre.</i>) <i>linens</i>,<br/><i>Bre. casei</i></li> <li>• <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>Lc. lactis</i><br/>subsp. <i>cremoris</i>, <i>Lc. lactis</i> subsp.<br/><i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i></li> <li>• <i>Leu. mesenteroides</i> subsp.<br/><i>dextranicum</i>, <i>Leu. mesenteroides</i><br/>subsp. <i>mesenteroides</i>,<br/><i>Leu. cremoris</i></li> <li>• <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>,<br/><i>Lb. reuteri</i>, <i>Lb. casei</i>,<br/><i>Lb. fermentum</i>, <i>Lb. plantarum</i>,<br/><i>Lb. helveticus</i>, <i>Lb. acidophilus</i>,<br/><i>Lb. paracasei</i>, <i>Lb. rhamnosus</i></li> <li>• <i>Propionibacterium</i> (<i>P.</i>)<br/><i>freudenreichii</i> subsp.<br/><i>freudenreichii</i>, <i>P. freudenreichii</i><br/>subsp. <i>shermanii</i></li> <li>• <i>Str. thermophilus</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Candida kefir</i></li> <li>• <i>Kluyveromyces</i><br/><i>marxianus</i></li> <li>• <i>Saccharomyces</i><br/><i>cerevisiae</i></li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Aspergillus oryzae</i></li> <li>• <i>Geotrichum candidum</i></li> <li>• <i>Mucor rasmussen</i></li> <li>• <i>Penicillium roquefortii</i>,<br/><i>P. camemberti</i></li> </ul> |

## 2.1 Lattoinnesto di *Streptococcus thermophilus*

Lo *Streptococcus thermophilus* è un batterio lattico termofilo, appartenente alla famiglia della Streptococcaceae, sferico o ovoidale, aggregato in coppie o catenelle. È un microrganismo Gram positivo, anaerobio e aerotollerante che non genera spore ed è privo di motilità, è omofermentativo con basse velocità di crescita sui 18 e i 20°C, temperatura ottimale di sviluppo tra i 37 e i 42°C, e buona capacità di resistenza a trattamenti di termizzazione e pastorizzazione a 62°C per 20-30 minuti. I suoi habitat naturali sono principalmente le superfici delle mucose umane ed animali, il tratto gastro-intestinale, però si ritrova anche nel terreno, nelle acque e su superfici di piante ed alimenti. Viene introdotto come coltura naturale nel latte e di conseguenza esplica la sua attività nella formazione del formaggio. Insieme al *Lb. bulgaricus* costituisce i fermenti lattici dello yogurt



e, una volta introdotti nell'organismo, vanno a stimolare il corretto funzionamento e la regolarità della flora intestinale. Lo *Streptococcus*, in particolare, è considerato un probiotico per le sue funzionalità positive sull'organismo. Ad esempio va a migliorare l'assimilazione dello zucchero presente in maggiore quantità nel latte, il lattosio, ottenendo acido lattico come principale prodotto di fermentazione, e a ridurre di conseguenza i tipi di intolleranza alimentare. È un batterio in grado di disgregare la cisteina, grazie ad una particolare proteasi che presenta, e a produrre diacetile dal citrato. In generale gli Streptococchi lattici fanno parte dei microrganismi gamma emolitici, privi di natura patogena, regolatori della flora intestinale e del sistema immunitario.

### **3.0 Alimenti funzionali**

Il concetto di alimento funzionale venne introdotto nel 1984 in Giappone come riferimento a quei prodotti che presentano effetti fisiologici favorevoli, grazie ad alcuni particolari componenti. Si tratta di componenti, intesi come ingredienti intrinseci o come aggiunti appositamente durante la trasformazione del prodotto alimentare.

In generale tutti gli alimenti sono da considerarsi funzionali se assunti a certi livelli, ma l'ADA, l'Associazione Dietetica Americana, precisa che gli alimenti funzionali includono tutti quei alimenti che vengono rafforzati, arricchiti, o migliorati e che presentano, quindi, effetti benefici sulla salute quando vengono assunti come parte integrante di una dieta varia. In ogni caso, gli alimenti funzionali non hanno un significato legale negli Stati Uniti d'America e non sono ufficialmente riconosciuti come appartenenti ad una categoria, secondo FDA, la Food Drug Administration.

L'IFIC, il Consiglio Internazionale dell'Informazione Alimentare, considera alimenti funzionali qualsiasi alimento o parte di alimento che può promuovere la salute e il benessere del consumatore se aggiunto ad una dieta base.

A livello europeo, la Commissione Europea ritiene che gli alimenti funzionali siano tali se vi è una dimostrazione scientifica sufficiente della sua influenza benefica sulla salute dell'ospite, al di là di adeguati effetti nutrizionali. Inoltre tali alimenti devono essere in grado di migliorare la salute e il benessere o di ridurre i rischi di malattie. Questo implica che non si tratta di pillole o medicine, ma di alimenti funzionali facenti parte di una dieta.

Ci sono diverse classificazioni degli alimenti funzionali. Si possono avere gli **alimenti** convenzionali **interi**, facilmente identificabili dal consumatore ad esempio frutta e verdura, che naturalmente contengono sostanze benefiche per la salute; si possono avere **alimenti modificati**, ovvero rafforzati, arricchiti o addizionati di elementi funzionali come di calcio, sali minerali in

genere, oppure ad esempio le barrette energetiche formulate con componenti bioattivi; si possono avere **alimenti medicali**, come ad esempio tutte le formulazioni per diabetici. Altre categorie di alimenti funzionali possono raggruppare gli alimenti maggiormente indirizzati ad una particolare categoria di consumatori, come ad esempio **alimenti per usi speciali** come quelli consumati in aggiunta ad una dieta speciale, che non necessitano di prescrizione medica, ad esempio gli alimenti senza glutine.

Ci sono tante altre classificazioni degli alimenti funzionali, la maggior parte sono basati sulla funzione nutrizionale e salutare che presentano, ma anche sui processi tecnologici messi in atto per il raggiungimento di tali prodotti. Questo perché per alimenti funzionali si intende alimenti modificati, in quanto arricchiti e rafforzati.

La scelta del tipo di alimenti funzionale da costruire poi mettere sul mercato alimentare dipende da moltissimi fattori.

Lahteenmaki et al. (2010), in Food Policy, hanno preso in considerazione il mercato degli alimenti funzionali e il mercato degli alimenti aggiunti di ingredienti nuovi, e hanno notato che l'alimento presentato come avente effetti benefici sulla salute è meglio percepito rispetto ad un altro alimento presentato come arricchito con un nuovo ingrediente.

Nonostante ciò, il lancio di un nuovo prodotto alimentare può avere un alto tasso di fallimento, che aumenta nel caso di alimenti funzionali. Questo perché la produzione di alimenti funzionali presenta elevati costi, in quanto molto complessa e rischiosa.

Altro fattore da tenere in conto è la fiducia che tale prodotto può o meno far sviluppare nel consumatore. Per quanto riguarda quest'aspetto, è più produttivo aggiungere un principio attivo ad un alimento che già di per sé è considerato salutare (Szakaly et al., 2012). Inoltre, anche se si tratta di un alimento con effetti benefici sulla salute il consumatore non è molto disposto a consumarlo se questo ha sapori peggiori dell'alimento originale (Verbeke, 2006).

La formulazione di alimenti funzionali, quindi modificati, viene fatta soprattutto per conformarsi all'idea della funzionalità che il dato alimento deve mostrare verso la salute del consumatore. Riguardando il processo contrario, ovvero principio attivo che poi si andrà a includere nell'alimento, è questo primo ad essere la chiave del processo. I principi attivi, isolati da ambienti consoni, vengono caratterizzati in dettaglio e identificati al fine di introdurli appunto negli alimenti. Dal lato di questi ultimi, i prodotti alimentari maggiormente consumati sono i prodotti lattiero caseari.

### 3.1 Formaggio funzionale

Gli alimenti aventi effetti terapeutici sulla salute del consumatore sono nati moltissimi anni fa e oggigiorno per la maggior parte sono alimenti arricchiti dai processi di fermentazione che includono. Ad esempio si hanno il *miso* in Giappone, il *sufu* in Cina, il *tempeh* in Indonesia, il *dosa* in India, lo *yogurt* e il *formaggio* a livello europeo e degli Stati Uniti d'America.

I prodotti fermentati a base di latte includono una coltura batterica fermentativa, che andrà poi a preservare o migliorare la shelf life del prodotto originale. Si parla maggiormente di colture batteriche selezionate di *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Streptococcus* che vanno a conferire caratteristiche peculiari al prodotto. Nella scelta effettuata per tali colture ci si può focalizzare sull'identificazione e caratterizzazione di ceppi dotati di attività benefica sulla salute del consumatore al fine di ottenere un prodotto funzionale, in questo caso, un formaggio funzionale.

Bisogna ricordare inoltre, che il formaggio per le sue caratteristiche chimico-compositive, di texture, e per il suo elevato consumo può essere considerato un idoneo vettore di effetti benefici sulla salute del consumatore. Il formaggio si presenta in qualità di carrier come un valido prodotto alimentare in grado di trasportare principi attivi nell'organismo umano. Questo perché è in grado di fare da tampone all'ambiente acido dello stomaco, e grazie alla sua consistenza è in grado di proteggere i relativi principi attivi che può contenere durante il transito gastro-intestinale (Burns et al., 2008; Gomes et al., 2009).

### 4.0 Co-starter

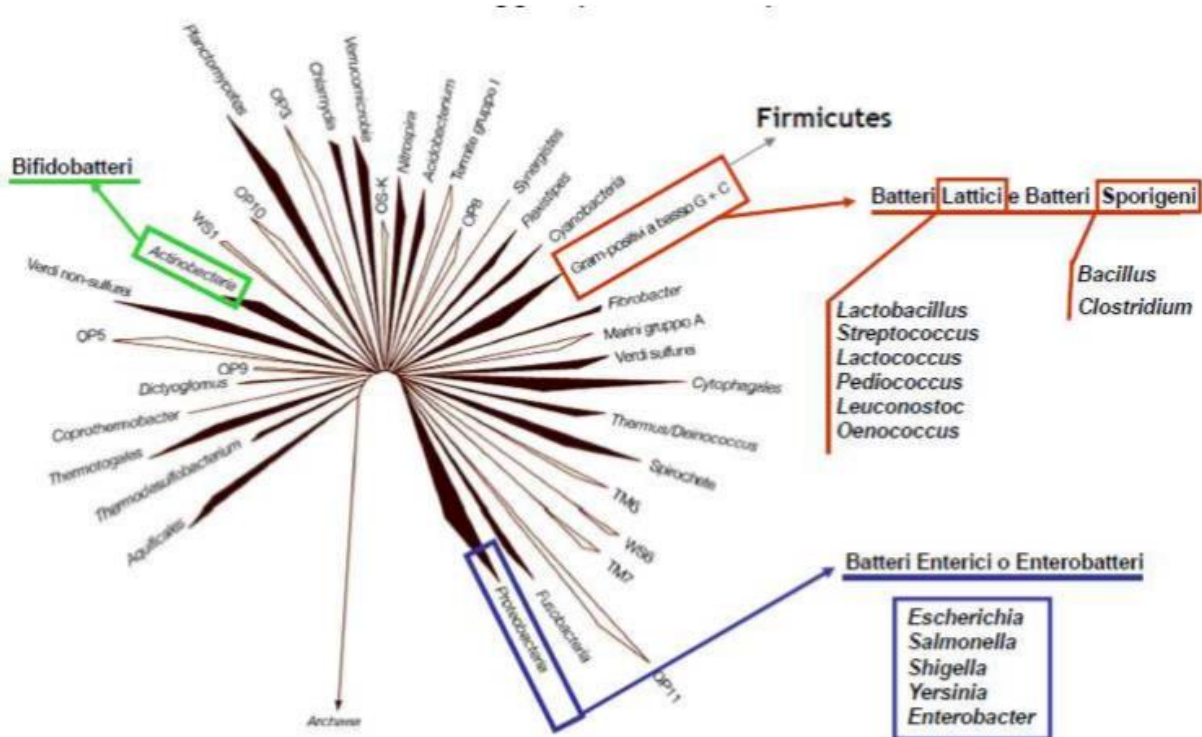
I co-starter sono dei ceppi microbici che affiancano l'attività dei batteri lattici, LAB, utilizzati come colture innesto nella produzione del formaggio. La maggior parte di questi batteri appartengono al genere *Lactobacillus*, della famiglia delle *Lactobacillaceae*. Si tratta di microrganismi bastoncellari (0,5-1,5µm in larghezza e 1,5-8 µm in lunghezza) procarioti omofermentativi Gram-positivi, catalasi negativi, anaerobi facoltativi o microaerofili, non sporigeni, e spiccati produttori di acido lattico come maggior metabolita. La relazione filogenetica all'interno del genere *Lactobacillus* (più di 180 specie) si basa fondamentalmente su un gene, il 16S rRNA.

Sono microrganismi caratterizzati da complesse necessità nutrizionali (amminoacidi, carboidrati, peptidi Sali minerali, vitamine e derivati degli acidi nucleici), generalmente mesofili, con temperatura di sviluppo intorno a 30°C, e pH che va da 4.5 a 6.5.

Gli habitat di questi microrganismi sono prevalentemente alimenti, come il latte, il formaggio, burro e prodotti fermentati a base di latte (Bettache et al.,2012), succhi vegetali, vino e birra, ma anche la cavità orale e il tratto gastrointestinale, in particolare.

I *Lactobacillus* possono essere suddivisi in tre sottogruppi in base al tipo di fermentazione che fanno. Vi sono così gli **omofermentanti obbligati**, che producono acido lattico a seguito della fermentazione degli zuccheri; gli **eterofermentanti facoltativi**, che fermentano gli zuccheri esosi ad acido lattico, mentre gli zuccheri pentosi ad acido lattico, acido acetico, etanolo ed acido formico; infine vi sono gli **eterofermentanti obbligati**, che a seguito di fermentazione degli zuccheri producono acido lattico, acido acetico, acido formico, etanolo e CO<sub>2</sub>.

Attraverso la combinazione di diverse metodiche molecolari e filogenetiche sono stati individuati all'interno del genere *Lactobacillus* 15 gruppi, riportati in figura 1.4.



## 5.0 Probiotici

I probiotici sono dei <<microrganismi vivi, che se somministrati in adeguate quantità, vanno ad esercitare funzioni benefiche sull'organismo ospite>> (FAO e OMS 2001). In generale si parla di batteri lattici (**LAB**), *Lactobacilli*, ma anche di *Bifidobacterium* che insieme rappresentano le due specie microbiche caratterizzate da un'elevata attività probiotica. I benefici che apportano

successivamente all'ingestione riguardano un rilevante miglioramento della salute intestinale, a seguito della regolazione del microbiota già presente. Questi probiotici vanno a stimolare e sviluppare il sistema immunitario, a sintetizzare e migliorare l'assorbimento dei nutrienti alimentari, vanno a ridurre i sintomi dell'intolleranza al lattosio, e a ridurre il rischio di determinate patologie. Il loro potenziale benefico si manifesta solo se rimangono vitali in numero significativo fino al termine di conservazione del prodotto, ciò è relativo alla ceppo-specificità tra le sue attività metaboliche o funzionali e quelle dell'ospite (Aureli et al.; 2010). Bisogna tenere presente che la definizione del gruppo FAO/OMS non prende in considerazione l'origine del ceppo, quindi non implica la provenienza umana, ma si concentra sulle funzionalità dell'agente probiotico. Il rapporto che si viene a sviluppare tra l'ospite e il probiotico assunto è relazione della funzionalità dello stesso, ovvero dell'importanza della somministrazione dei batteri vivi, della loro quantità, dei benefici che ne apportano e della sicurezza d'uso a cui ne consegue un uso razionale.

La somministrazione del probiotico può avvenire sia attraverso l'ingestione di una matrice alimentare fermentata da parte di un batterio benefico, sia attraverso un surplus alla dieta con un concentrato batterico. Si tratta comunque di batteri vivi, capaci di oltrepassare le barriere gastriche, giungere all'intestino, raggiungere una simbiosi con il microbiota intestinale e infine esplicare le proprie funzioni.

Spesso si parla di quantità ottimale del batterio probiotico da somministrare, e dato che il fine si misura attraverso l'influenza che questo ha verso l'organismo ospite, quindi verso il suo microbiota, si deve appunto tener conto della dose assunta. L'AFSSA riporta che la dose di probiotico ingerito è un fattore importante per ottenere una successiva colonizzazione in numero sufficiente dei vari tratti dell'intestino. Nonostante ci siano scarse basi scientifiche al riguardo, si parla di  $10^6$  e oltre CFU/mL per l'intestino tenue, in particolare nel tratto dell'ileo, e  $10^8$  CFU/g per l'intestino crasso (Aureli et al., 2011; AFSSA, 2005).

Le funzioni probiotiche si hanno in particolare dei batteri lattici, *Lactobacillus*, e dello *St. thermophilus*, impiegato come lattoinnesto nella produzione dello Squacquerone.

Nello studio sono stati presi in considerazione i seguenti due ceppi del *Lactobacillus*: *L. crispatus* e *L. paracasei*:

### 5.1 *Lactobacillus crispatus*

*Lactobacillus crispatus*, appartenente alla famiglia delle Lactobacillaceae, si ritrova nell'ambiente vaginale, ed è ritenuto probiotico in quanto svolge attività anti infettive sul tratto urinario. È stato studiato e considerato un agente anti vaginiti batteriche (Siroli et al., sottomesso).

### 5.2 *Lactobacillus paracasei*

*Lactobacillus paracasei* è un microrganismo ampiamente utilizzato per le sue proprietà fermentative e probiotiche nelle produzioni lattiero casearie, nelle preparazioni di vari antisettici e altri formulazioni mediche (Jiang Y., et al., 2015; Smokvina et al., 2013). Si ritrova normalmente in diverse parti del corpo, come ad esempio bocca e intestino (Jiang, et al., 2015).

## 6.0 Tecnologie per mantenere vitali i microrganismi probiotici in matrici alimentari

A seguito della scelta del tipo di *Lactobacillus* da impiegare come co-starter, bisogna garantire la loro sopravvivenza ai trattamenti che la matrice alimentare attraversa. La stabilità dei microrganismi probiotici, quindi il loro sviluppo è influenzato da molti fattori come:

-dal **pH della matrice**, infatti ogni microrganismo ha un suo intervallo di pH ottimale di sviluppo, ad esempio il *Lb. acidophilus* sviluppa meglio tra 5.5 e 6.0 mentre il *Bifidobacterium* ha un intervallo di sviluppo di 6.0 e 7.0;

-dalla presenza eccessiva o meno di **ossigeno**, e dal **potenziale redox** della matrice, che va ad influenzare direttamente alcune cellule inibendone la crescita oppure può promuovere la produzione di perossido, tossico per *Lb. acidophilus* ad esempio, oppure a ossidazione inoltrata, con formazione di radicali tossici per le cellule probiotiche;

-dal contenuto in **perossido di idrogeno**, tossico ad esempio per *Lb. acidophilus* (Mortazavian et al., 2005; Dave et al., 1997; Mortazavian et al., 2006);

-dal contenuto in **cellule somatiche** già presenti nella matrice latte;

-dagli **additivi** presenti, come NaCl, zuccheri, l'aspartame, componenti aromatici, agenti coloranti e aromatizzanti (Vinderola et al., 2002); e dai **nutrienti** di cui la matrice è composta, in quanto questi

andranno a soddisfare tutte le esigenze nutrizionali dei microrganismi e a permetterne di conseguenza la sopravvivenza;

-dalla **temperatura** e **tempo** di trattamento e stoccaggio, in quanto ogni ceppo ha le sue richieste ambientali di temperatura e tempo di sopravvivenza in ambienti alimentari soggetti a shelf-life relativamente corta;

-dai **materiali di imballaggio** e confezionamento della matrice, ad esempio i contenitori in vetro hanno una ridotta permeabilità all'ossigeno, quindi permettono una più facile sopravvivenza dei batteri lattici.

La stabilità quindi viene garantita mediante l'impiego di idonee condizioni di trasformazione della materia prima, e mediante l'utilizzo di probiotici resistenti o la cui resistenza può essere migliorata. Una delle tecnologie maggiormente impiegate è la microincapsulazione.

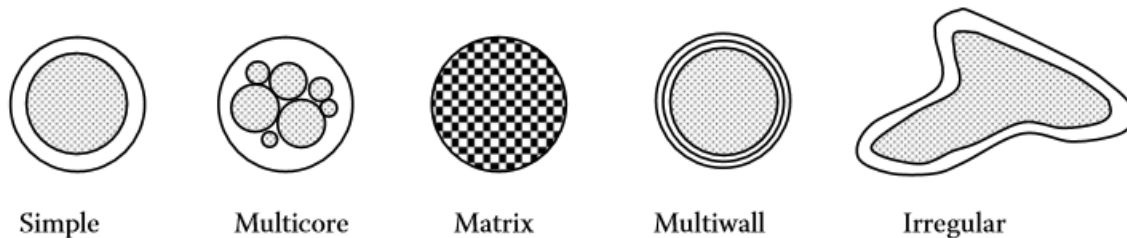
## 6.1 La microincapsulazione

Lo sviluppo dei prodotti microincapsulati ha avuto inizio nel 1950 con il National Cash Register Company (USA) nella ricerca di rivestimenti sensibili alla pressione per la fabbricazione di carta auto copiante (Green e Scheicher, 1955). Oggigiorno questa tecnologia è ampiamente utilizzata in diversi ambiti, farmaceutico, chimico, cosmetico, alimentare e nell'industria della stampa.

Nell'industria alimentare, la microincapsulazione può essere impiegata come tecnologia in grado di aumentare la vitalità dei probiotici introdotti in alimenti funzionali, conferendone stabilità. Essa può essere definita come un processo che permette di circondare o di avvolgere piccole particelle solide, liquide o gassose, considerate ingredienti sensibili, in piccole capsule, di materiale polimerico resistente, che vanno da 1 a 1000  $\mu\text{m}$  (Champagne and Fustier, 2007; Nazzaro et al., 2012).

Vi sono molti metodi fisici, chimici e fisico-chimici, applicati nella produzione di microcapsule. Tra i metodi fisici vi è lo **spray drying**, lo **spray chilling / cooling**, il **rivestimento a letto fluido con essiccamento a spruzzo**, l'**estrusione**, la **liofilizzazione** e la **co-cristallizzazione** (Gibbs et al., 1999; Gouin, 2004; Desai e Park, 2005); tra i metodi chimici vi sono la **polimerizzazione interfacciale** e l'**inclusione molecolare** (Desai e Park, 2005); mentre tra le metodiche fisico-chimiche vi è la **coacervazione**, l'**intrappolamento dei liposomi** e la **separazione della fase organica** (Gibbs et al., 1999; Desai e Park, 2005). In generale sono preferibili lo spray drying, l'estrusione e il freeze drying.

La scelta del metodo dipende dall'economia di trasformazione, dalla sensibilità del principio attivo, dalle dimensioni delle particelle di microcapsule che si vogliono ottenere, dalle proprietà fisico-chimiche di base dell'involucro esterno. Si possono infatti avere differenti tipologie di strutture delle microcapsule, come riportato in figura 1.5 (Quek et al., 2016) :



In tabella 1.2 (Quek et al., 2016), vi sono esempi di ceppi di *Lactobacillus* impiegati nelle diverse tecnologie di microincapsulazione :

Microencapsulation of Bioactive Food Ingredients by Frequently Used Techniques in Food Industry

| Category | Core<br>Examples  | Wall  | Frequently Used Technique<br>for Microencapsulation | References                 |
|----------|---|---|---|----------------------------|
|          | <i>L. gasseri</i> ,<br><i>Bifidobacterium</i><br><i>bifidum</i> | Sodium alginate coated with<br>chitosan       | Extrusion   | Chávarri et al. (2010)     |
|          | <i>L. plantarum</i>   | Calcium alginate coated with<br>whey proteins | Extrusion and freeze drying                         | Gbassi et al. (2009)       |
|          | <i>L. paracasei</i> ,<br><i>B. lactis</i>                       | Milk proteins                                 | Emulsification and<br>centrifugation                | Heidebach et al. (2009)    |
|          | <i>L. casei</i> ,<br><i>B. lactis</i>                           | Calcium alginate                              | Emulsification                                      | Homayouni et al. (2008)    |
|          | <i>L. acidophilus</i>   | Sodium alginate                               | Emulsification and freeze drying                    | Kim et al. (2008)          |
|          | <i>L. acidophilus</i>   | Calcium alginate                              | Extrusion   | Chandramouli et al. (2004) |



## 6.1.2 La microincapsulazione applicata ai probiotici

Uno dei motivi per cui la microincapsulazione viene applicata ai probiotici è che il consumatore moderno predilige alimenti in grado di apportargli benefici, e il composto biologicamente attivo in grado di soddisfare questa richiesta sono appunto i probiotici.

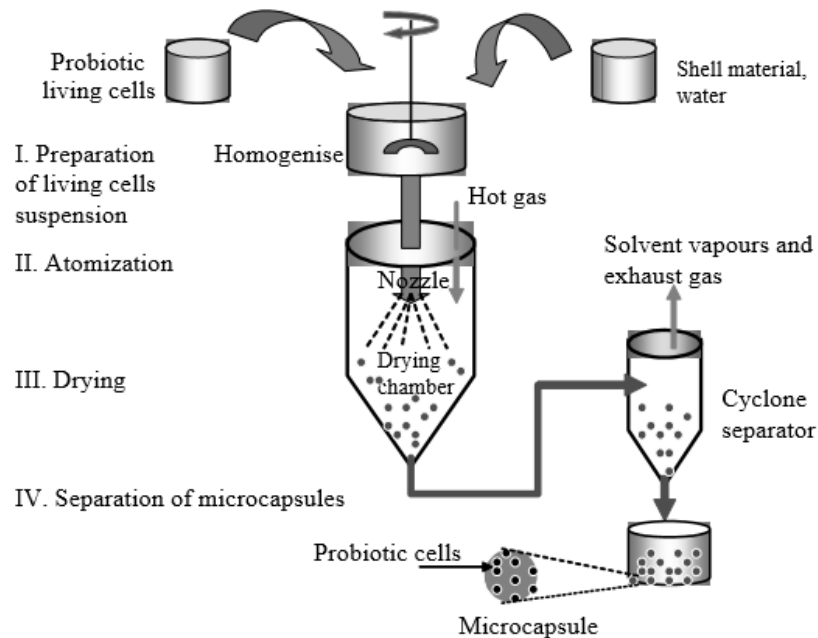
Negli ultimi anni il mercato e la ricerca si sono concentrati sulla produzione di alimenti funzionali, aggiunti di probiotici. Si parla sia dei comuni alimenti come yogurt, formaggi, gelato, sia di alimenti come succhi, salse, biscotti, cioccolata e altri. (Stefan et al., 2014; Bourgain et al., 2011).

I probiotici sono particolarmente adatti alla trasformazione, che la microincapsulazione implica, grazie alle loro caratteristiche rilevanti di crescita e sopravvivenza ai diversi trattamenti e alla conservazione di alimenti, alle ottime resistenze verso l'acidità, la bile e vari enzimi, durante il transito nel tratto gastrointestinale (Randheera et al., 2010).

Le tecnologie di microincapsulazione più impiegate sono: lo **spray drying**, lo **spray freeze drying**, il **rivestimento a letto fluido con essiccamento a spruzzo**, l'**estrusione** e l'**emulsione**, e le **alte pressioni di omogeneizzazione** (Champagne e Fustier, 2007; De Vos, 2010; Manojlović et al., 2009; Bourgain et al., 2011).

Lo **spray-drying** è una tecnica di incapsulazione molto utilizzata nell'industria alimentare (Gharasallaoui et al., 2007; Drusch, 2007). Presenta i vantaggi di poter essere applicato su larga scala, un'elevata resa di produzione, può essere applicato a diversissimi biocomponenti e le microcapsule finali sono facilmente disperdibili in acqua. Gli svantaggi di questo metodo sono: la complessità delle attrezzature e le condizioni di non uniformità della camera di essiccazione. Nell'applicazione di questa tecnica vengono ben controllati: la temperatura e il tempo di trattamento, il tipo di particelle da ottenere, i materiali dell'involucro e le condizioni di conservazione. In figura 1.6 (Stefan et al., 2014) vi è schematizzato il metodo dello spray drying:

Fig. 1.6 (Stefan et al., 2014) : il metodo dello spray-drying impiegato nel processo di incapsulazione di probiotici

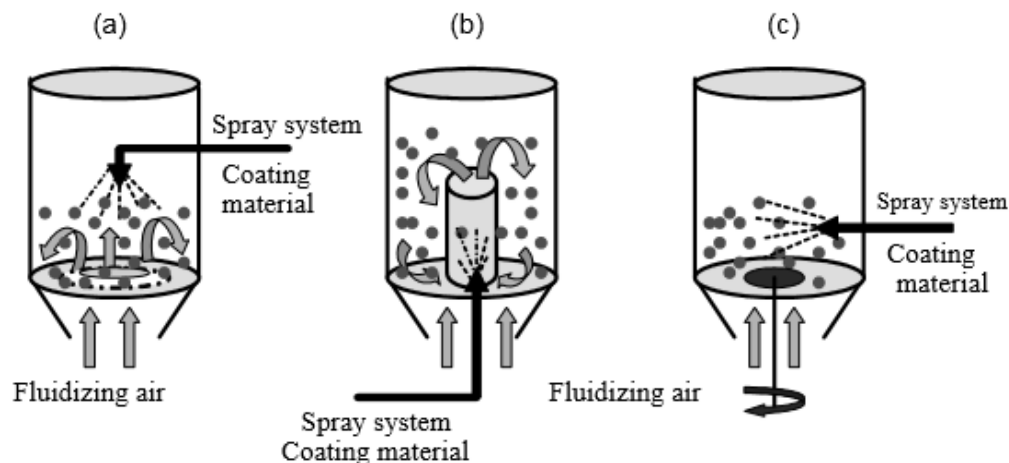


. Schematic presentation of the spray-drying probiotic encapsulation process.

Lo **spray freeze drying** è un metodo simile al precedente, vi differisce solo per il modo in cui sono legate le goccioline prodotte dall'atomizzazione. In questo caso, le goccioline contenenti le cellule probiotiche sono congelate con liquido criogenico come il nitrogeno, poi vengono essiccate nel liofilizzatore. Per aumentare la stabilità dei fattori probiotici, vengono utilizzati differenti crioprotettivi come l'amido, il saccarosio, il fruttosio, il lattosio, il mannosio, il glutammato monosodico, il sorbitolo, il trealosio, le proteine della soia e le maltodestrine al 20% (Capela et al., 2006; Chavez e Ledebor, 2007). È un metodo relativamente molto costoso, poiché presenta consumi elevati, ma viene comunque molto utilizzato per i microprobiotici.

La tecnica del **rivestimento a letto fluido con essiccamento a spruzzo** utilizza un sistema a spruzzo per ricoprire le particelle attive (Frey e Hall, 2004). È molto utilizzato per rivestire svariati tipi di materiali: lipidi, acidi grassi, caseine, derivati celluloso litici, alginato (Champagne e Fustier, 2007). La metodica è rappresentata in figura 1.7 (Stefan et al., 2014; Champagne e Fusier, 2007; Burgain et al., 2011).

Fig. 1.7 (Stefan et al., 2014) : rappresentazione schematica della tecnica di rivestimento a letto fluido



**Fig. 3.** Schematic presentation of the fluid bed coating technology: (a) fluid bed top spray-coating; (b) fluid bed bottom spray-coating with the Würster device; (c) fluid bed tangential spray-coating. Adapted from Champagne and Fustier (2007) and Burgain et al. (2011).

La tecnologia dell'**estrusione** e l'**emulsione** sono particolarmente impiegate per l'incapsulamento dei probiotici. La prima è la più semplice nella produzione di microsferiche di probiotici, caratterizzata dall'essere economica, biocompatibile, flessibile, di produzione su piccola scala, che porta alla formazione di capsule dalle dimensioni particolarmente influenzabili dalla viscosità della soluzione di gelificante impiegato, dal diametro dell'orifizio e dalla distanza tra la siringa e la soluzione di cloruro di calcio impiegata.

Gli agenti gelificanti possono essere soluzioni di cloruro di calcio per alginato, cloruro di potassio per la carragenina e di tripolifosfato per il chitosano, mentre l'enzima transglutaminasi per il caseinato (Stefan et al., 2014).

L'alginato di sodio, polimero lineare poliuronico, in particolare è l'agente gelificante più utilizzato in quanto insapore, insolubile in acqua fredda e debolmente solubile in acqua calda, caratterizzato da elevata biocompatibilità, economicità, semplicità, non tossicità e buona digeribilità intestinale.

Dall'altra parte la tecnologia dell'emulsione è costosa in quanto necessita di olio vegetale per la produzione dell'emulsione.

Le **alte pressioni di omogeneizzazione** invece è una tecnologia continua o semicontinua che prevede di applicare pressioni tra 60 e 400 MPa ad alimenti fluidi per pochi millisecondi (Paquin et al., 2003), all'interno dell'omogeneizzatore. Questo strumento è costituito da una pompa, che spinge il fluido sotto pressione, attraverso uno stretto orifizio, verso una valvola di omogeneizzazione con conseguente micronizzazione delle particelle (Middelberg, 1995).

Successivamente il sistema viene sottoposto ad una depressione ultrarapida che comporta l'evaporazione del fluido e la conseguente formazione di bolle di vapore all'interno del liquido, per il cosiddetto fenomeno della cavitazione. Questo permette a seguito del collasso delle bolle di racchiudere le particelle in sospensione incluse le cellule probiotiche. Uscito dall'omogeneizzatore, il fluido viene raffreddato per minimizzare il danno termico dovuto al moto violento che porta all'aumento di temperatura di circa 2-2.5°C ogni 10 MPa di incremento della pressione (Popper e Knorr, 1990).

Il prodotto finale così ottenuto presenta caratteristiche interessanti che riguardano la struttura e conformazione del sistema proteine-lipidi-polisaccaridi, viene alterata l'attività degli enzimi del substrato (Thiebaud et al., 2003; Iucci et al., 2006), si ha una migliore stabilità del prodotto, con conseguente alterata viscosità (Lanciotti et al., 2004; Patrignani et al., 2007); e si hanno ulteriori miglioramenti a livello delle caratteristiche organolettiche del prodotto così micronizzato (Guerzoni et al., 1999).

### **6.1.3 La microincapsulazione applicata ad alimenti funzionali**

In campo alimentare, la microincapsulazione è ampiamente utilizzata nel processo di produzione di alimenti funzionali, utile a proteggere i principi attivi durante il processo di trasformazione e conservazione. Vi migliora la bioaccessibilità ed efficacia degli ingredienti, e la percezione olfattiva e gustativa. I componenti bioattivi introdotti negli alimenti mediante questa tecnologia possono essere sia lipo- che idro- solubili, inclusi i probiotici, lipidi e acidi grassi, coloranti, polifenoli, enzimi, vitamine e minerali.

Le capsule impiegate devono essere di materiale resistente in grado di rimanere stabili alle diverse trasformazioni alimentari e a proteggere, quindi, il composto bioattivo che racchiudono. Non è da tralasciare il fatto che comunque non devono cambiare il gusto o snaturare i prodotti in cui vengono addizionate.

Requisiti importanti nella scelta della tipologia di capsula da impiegare possono essere la sua stabilità, l'affinità verso il solvente dell'alimento, a cui deve essere appunto affine altrimenti non andrebbe poi a facilitare l'assorbimento di ciò che ne racchiude, ed avere buone capacità di emulsione. Altre caratteristiche importanti possono essere buone rese all'incapsulazione, buona resistenza a stress ossidativi, buone proprietà reologiche, come viscosità e resistenza al taglio. Le capsule devono, inoltre, essere di origine alimentare e non andare a infierire con i principi attivi che vanno a racchiudere, né con gli alimenti dove vi sono contenuti.

I materiali maggiormente utilizzati in campo alimentare sono i carboidrati, proteine, lipidi e loro derivati utilizzati singolarmente o in combinazione con un opportuno involucro. In tabella 1.3 (Quek et al., 2016) vengono raggruppati i principali tipi di materiali e loro proprietà.

Tab. 1.3 (Quek et al., 2016): i materiali delle capsule maggiormente impiegati e loro proprietà generali

| Common Types of Wall Materials and Their Properties      |  |  |   |
|--|--|--|---|
| Wall Material  | Common Properties  | Common Examples  |   |
| Carbohydrates  | <i>Gums</i> (good emulsifiers)   | <i>Gums</i>  |   |
|  | Alginates—Varying water solubility   | Alginates: Chávarri et al. (2010); Homayouni et al. (2008)   |   |
|  | Agar—Strong gelling agent, water soluble   | Agar: Champagne (2013)   |   |
|  | Gum arabic—Strong film former, low viscosity in aqueous solutions, water soluble | Gum arabic: Chranioti and Tzia (2014); Samborska and Czelejewska (2014)  |   |
|  | <i>Starches</i> (widely available)   | <i>Starches</i>  |   |
|  | Dextrins—Emulsifier, strong film former, water soluble                           | Dextrins: Ahn et al. (2008)  |   |
|  | Maltodextrin—Nonsweet, good oxidation protection, water soluble                  | Maltodextrin: Thirundas et al. (2014); Wang et al. (2014)  |   |
|  | Cyclodextrins—Forms stable inclusion complexes, poor water solubility            | Cyclodextrins: da Rosa et al. (2014); Szente and Szejtli (2004); Tao et al. (2014)                                       |   |
|  | <i>Celluloses</i> —Widely available, water insoluble                             | <i>Celluloses</i> (including methyl/ethyl/hydroxypropylcellulose): Koupantsis et al. (2014); Setchell et al. (2005)      |   |
|  | <i>Others</i>  |  |   |
|  | Chitosan—Gelling agent, emulsifier, strong film former, water insoluble          | Chitosan: Bastos et al. (2012); Donhowe and Kong (2014); No et al. (2007)  |   |
|  | Inulin—Prebiotic, moderately water soluble                                       | Inulin: Fernandes et al. (2014); Franck (2002)   |   |
|  | Proteins   | Gelatine—Gelling agent, water soluble, inexpensive   | Gelatine: Soukoulis et al. (2014); Wang et al. (2014) |
|  |  | Whey proteins—Gelling agent, emulsifier, water soluble   | Whey proteins: Chen et al. (2013)                     |
| Soy proteins   |  | Soy proteins: Gao et al. (2014); Nesterenko et al. (2014)  |   |
| Caseinates—Emulsifier, strong film former, water soluble |  | Caseinates: Hogan et al. (2001); Srinivasan et al. (1999)  |   |
| Lipids   | Plant oils—Low boiling temperature, water insoluble                              | Plant oils: Alvim et al. (2013); Wilson and Shah (2007); Zoet et al. (2011)  |   |
|  | Waxes—Water impermeable; water insoluble   | Waxes (including beeswax and carnauba wax): Blanco-Pascual et al. (2014); Drusch and Mannino (2009); Kuang et al. (2010) |   |
|  | Phospholipids—Liposomal formation; water insoluble                               | Phospholipids: Alvim et al. (2013); Moraes et al. (2013)   |   |



## 2.CAPITOLO SECONDO – *Obiettivi*

Il legame tra alimentazione e salute è riconosciuto fin dai tempi antichi: come disse Ippocrate, “*Fa che il cibo sia la tua medicina e che la medicina sia il tuo cibo*”. Questo legame è sempre più al centro dell’attenzione del consumatore moderno, per il quale l’alimentazione non deve soltanto soddisfare i fabbisogni nutrizionali dell’organismo ma anche costituire uno strumento per la prevenzione e, persino, la cura di malattie e patologie. Da questo punto di vista i cosiddetti alimenti funzionali (functional foods) costituiscono un importante strumento a disposizione del consumatore, in congiunzione con uno stile di vita adeguato, per raggiungere i propri obiettivi salutistici.

La Commissione europea sulla Functional Food Science in Europa (FUFOSE) coordinata dall’International Life Science Institute (ILSI) ha definito gli alimenti funzionali come prodotti alimentari aventi, oltre alle caratteristiche nutrizionali di base, effetti benefici su una o più funzioni dell’organismo umano, migliorando le condizioni generali o fisiche dell’organismo e diminuendone il rischio di insorgenza di malattie. Il termine functional food è stato introdotto in Giappone ed è stato declinato in numerose definizioni classificabili secondo quattro categorie principali (Doyon e Labrecque, 2008): le caratteristiche dell’alimento, i benefici salutistici, il livello degli attributi funzionali presenti e l’attitudine al consumo, cioè il fatto che l’alimento sia di per sé parte della normale dieta (Griffiths et al., 2009; Sirò et al., 2008; Tripathi & Giri., 2014).

Considerando le differenti possibilità disponibili a livello industriale, gli alimenti che promuovono la salute del consumatore possono essere classificati in 3 gruppi:

- 1) alimenti con specifiche funzionalità intrinseche
- 2) alimenti fortificati con ingredienti naturali capaci di garantire una specifica funzionalità
- 3) alimenti con microrganismi probiotici e composti prebiotici

In ogni caso diversi approcci tecnologici e biotecnologici possono essere sviluppati, soprattutto nel settore lattiero-caseario, per conferire specifiche funzionalità. In particolare, l’aggiunta di microrganismi, dotati di specifiche caratteristiche funzionali, quali attività anti *Candida* o battericida e/o attività probiotica, possono essere addizionati come co-starter in prodotti tradizionali quali i formaggi a pasta molle, identificati come carrier ottimali da un’ampia letteratura. Uno dei limiti principali di questa proposta riguarda il mantenimento della vitalità e delle caratteristiche dei microrganismi funzionali addizionati nel sistema e contemporaneamente il fatto che il loro effetto

non si espliciti peggiorando la qualità organolettica del prodotto rispetto allo standard che il consumatore si aspetta di trovare.

Diversi approcci biotecnologici possono essere applicati al fine di mantenere stabili e vitali i microrganismi funzionali addizionati in fase di processo e al fine di evitare un eccessivo impatto organolettico sul prodotto alimentare funzionale.

In questo contesto, l'obiettivo principale di questa sperimentazione è stato quello di valutare le potenzialità applicative di due diversi ceppi di batteri lattici aggiunti come co-starter funzionali, insieme alla coltura starter multiceppo aziendale appartenente alla specie *St. thermophilus*, per la produzione dello Squacquerone di Romagna DOP. Tutte le prove sono state effettuate su scala semi industriale, in collaborazione con il caseificio Mambelli. Come co-starter sono stati selezionati, durante sperimentazioni precedenti, un ceppo di *Lb. crispatus* BC4, isolato da ambiente vaginale, caratterizzato da provate attività anti *Candida* (Parolin et al., 2015) e battericida verso i principali ceppi patogeni e degradativi alimentari e un ceppo probiotico di *Lb. paracasei* A13 isolato da yogurt argentino. Questi microrganismi sono in grado di crescere in latte, a bassi valori di pH e a diverse concentrazioni saline (Patrignani et al., 2009; Siroli et al., sottomesso). Al fine di mantenere costante la vitalità e la funzionalità dei ceppi target i due ceppi sono stati addizionati, in fase di caseificazione, anche nella loro forma microincapsulata tramite alte pressioni di omogeneizzazione.

La microincapsulazione con sostanze idrocolloidali è uno dei metodi utilizzati per incrementare la sopravvivenza dei microrganismi probiotici in ambienti caratterizzati da condizioni chimico-fisiche proibitive (Anal e Singh, 2007). Infatti essa viene identificata come tecnica promettente di protezione dei probiotici e dei microrganismi funzionali in genere alle condizioni ambientali avverse a cui possono essere esposti quando si trovano nella loro forma planctonica nei lattici fermentati e durante il passaggio nel tratto gastro-intestinale dell'uomo (Krasaekoopt et al., 2004).

Pertanto sono state prodotte cinque diverse tipologie di Squacquerone contenenti i microrganismi funzionali nella loro forma libera (planctonica) o microincapsulati come co-starter e un mix di ceppi di *St. thermophilus* normalmente utilizzato come starter aziendale. I formaggi ottenuti sono stati caratterizzati a livello microbiologico, chimico-fisico, reologico e sensoriale. Inoltre sono stati studiati i profili proteolitici dei prodotti ottenuti in rapporto al microrganismo funzionale utilizzato e alla sua modalità di immissione in caldaia durante il processo produttivo. È noto infatti che la proteolisi è il fenomeno più importante per la maturazione dei formaggi (anche di quelli a breve maturazione) e la definizione delle loro caratteristiche sensoriali. Infatti dalla proteolisi dipendono la reologia e la microstruttura del formaggio nonché il suo sapore e l'aroma. Infatti i prodotti della



proteolisi rappresentano i precursori di numerosissime molecole volatili e non che caratterizzano il prodotto stesso. Infatti sebbene i consumatori siano sempre più orientati verso prodotti salutistici, le caratteristiche sensoriali restano il principale criterio di scelta dei prodotti alimentari. È noto che, sebbene la gamma di prodotti funzionali sia enormemente aumentata negli ultimi anni, questi spesso sono dotati di caratteristiche sensoriali scadenti rispetto ai corrispondenti prodotti tradizionali.



### **3.CAPITOLO TERZO – *Materiali e metodi***

#### **1.0 Processi di pre-caseificazione**

##### **1.1 Ceppi impiegati**

I ceppi impiegati come co-starter nel processo di caseificazione sono stati:

- *Lactobacillus crispatus* BC4, appartenente al Dipartimento di farmacia e biotecnologie dell'Università di Bologna, isolato da ambiente vaginale di donne sane;
- *Lactobacillus paracasei* A13, appartenente all'Istituto di Lattologia Industriale, UNLCONICET, Santa Fe, Argentina, isolato da yogurt.

Entrambi appartenenti alla famiglia delle *Lactobacillacee*, sono stati selezionati per le loro attitudini probiotiche di difesa dell'organismo. Sono stati inoculati sia tal quali che microincapsulati tramite alte pressioni di omogeneizzazione. La microincapsulazione è stata sviluppata al fine di verificare la vitalità e la funzionalità dei ceppi inoculati come co-starter in Squacquerone di Romagna DOP.

##### **1.2 Analisi ceppi**

È stata eseguita un'analisi dei ceppi impiegati per verificarne la purezza, quindi di base si è eseguita un'analisi microbiologia e microscopica dei ceppi.

I campioni di *Lb. crispatus*, BC4, in giara per l'anaerobiosi, e di *Lb. paracasei*, A13, sono stati inoculati in provette con MRS, e successivamente posti in termostato a 37°C per 24 / 48 ore. L'avvenuta crescita dei ceppi, visibile per la torbidità delle provette, ha permesso di proseguire con il campionamento per spatolamento su piastra di MRS agarizzato, poi in termostato a 37°C per 24 / 48 ore. Successivamente a seguito dell'avvenuta crescita, è stata eseguita un'analisi microscopica dei ceppi per verificarne la purezza.

Verificata la purezza i ceppi sono stati stoccati a -20°C. Per garantirne la vitalità questi sono stati inizialmente inoculati in provetta con 9 ml di MRS, De Man, Rogose, and Sharpe (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) e incubati a 37°C per 24 / 48 ore (*Lb. crispatus* è stato sempre messo in condizioni di anaerobiosi). Successivamente le colture sono state messe in eppendorf con glicerolo 50% e poi stoccate a -20°C.

### **1.2.1 Microscopia a scansione elettronica**

I campioni di microcapsule sono state sottoposte ad analisi dell'immagine tramite microscopia a scansione elettronica, in accordo con Vernocchi et al., 2008

### **1.3 Creazione dell'inoculo del co-starter non incapsulato**

Sono stati prelevati in condizioni di sterilità 500 µL della coltura pura stoccata a -20°C e sono state inoculate provette da 9 mL di terreno di coltura liquidi di MRS, De Man, Rogose, and Sharpe (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito), sia per il *Lb. paracasei* che *Lb. crispatus*. Le provette sono state incubate a 37°C per 24 ore in anaerobiosi, in quanto *Lb. crispatus* è anaerobio obbligato, mentre il secondo è anaerobio facoltativo. Successivamente il contenuto delle provette è stato trasferito in beute contenenti 5 L di terreno di coltura e sono state incubate a 37°C per 24 ore. Questo ha permesso lo sviluppo microbico con il raggiungimento della carica di nostro interesse.

### **1.4 Creazione del pellet di cellule**

L'obiettivo è stato ottenere le cellule dei co-starter, da inoculare nel latte o successivamente da trattare con la microincapsulazione. Ottenuto l'inoculo, in beutone da 5 L, dopo 24 ore a 37°C, è stato centrifugato a 8000 giri per 15 min per ottenere il pellet e il surnatante in due tubotti cilindrici sterili. Il surnatante è stato scartato di volta in volta, mentre si è proceduti a raccogliere il pellet di cellule. Quest'ultimo è stato raccolto e poi risospeso in 200 mL di BPW, Buffered Peptone Water (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito), per essere inoculato in 1 L di latte intero UHT, mentre nella seconda replica si è proceduti a raccogliere il pellet destinato all'omogeneizzazione sotto pressione per ottenere le capsule.

### **1.5 Creazione delle capsule**

La creazione delle capsule è stata eseguita mediante l'uso di un omogeneizzatore ad alte pressioni, modello PANDA GEA (Niro Soavi, Parma, Italia). Tale strumento ha permesso l'omogeneizzazione del fluido mentre veniva forzato ad attraversare una valvola molto stretta ad una velocità superiore alla velocità del suono. Successivamente il sistema è stato sottoposto ad una depressione ultrarapida che ha portato alla formazione di bolle di gas all'interno del liquido. Precisamente nella camera di omogeneizzazione è stata diminuita la distanza tra le particelle per l'aumento della pressione, fino a 2000 bar, con successivo allungamento e formazione di bolle d'aria dell'ordine del micron. Questa fase di alte pressioni è servita a creare un'emulsione, da rompere poi con Cloruro di Ca.

Sono stati impiegati:

- 200 mL di olio vegetale,
- 1 mL di Tween 80,
- 25 mL di cellule del pellet
- 100 mL di Alginato di Na, ( $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$ ) al 3 %

e a seguito di agitazione su piastra riscaldante, sono stati trasferiti nell'omogeneizzatore, che ha favorito, appunto grazie alle alte pressioni, la formazione di un'emulsione di particelle incapsulate. A questa miscela è stato aggiunto il carbonato di calcio,  $\text{CaCO}_3$  0,1 M, per favorire l'aggregazione delle microparticelle incapsulate. I recipienti con l'omogeneizzato biancastro sono stati conservati a 4°C per 24 ore e il giorno successivo è stato centrifugato il contenuto a 4000 rpm per 10 minuti in Falcon sterili, al fine di separare il surnatante dalle cellule microincapsulate. Queste ultime sono state raccolte e sospese in 1 L di latte, pronto per l'inoculo in caseificio. L'intero processo di microincapsulazione è stato eseguito sia per il ceppo *Lb. crispatus* che per *Lb. paracasei*, rispettivamente per i campioni BC4 in vasca B2 e A13 in vasca C3.

## 1.6 Campionamento

Sono state eseguite analisi microbiologiche di base sui ceppi BC4 e A13 per verificarne la purezza; successivamente campionamenti sul terreno di coltura di MRS, 5L, ricco in cui il ceppo ha sviluppato; sul campione della prima centrifuga; sul pellet di cellule centrifugate e poi risospese in 200 mL di acqua fisiologica e acqua peptonata rispettivamente per i non incapsulati e incapsulati. Inoltre è stata eseguita un'analisi microbiologica sul primo Falcon sterile centrifugato, per verificare il quantitativo di cellule pre-inoculo del latte da portare in caseificio.

## 2.0 Processo di produzione dello Squacquerone

Il processo di caseificazione è stato svolto presso il caseificio Mambelli Srl, S. Maria Nuova di Bertinoro (FC). L'obiettivo principale è stato quello di produrre 5 tipi di Squacquerone impiegando 4 tipologie diverse di colture co-starter, tra incapsulate e non incapsulate. Le tipologie impiegate sono state:

A1 – lattoinnesto di *St. thermophilus* aggiunto di co-starter *Lb. crispatus* BC4 non incapsulato

B 2– lattoinnesto di *St. thermophilus* aggiunto di co-startet *Lb. crispatus* BC4 incapsulato

C3 - lattoinnesto di *St. thermophilus* aggiunto di co-starter *Lb. paracasei* A13 non incapsulato

D4 - lattoinnesto di *St. thermophilus* aggiunto di co-starter *Lb. paracasei* A13 incapulato

E5 – lattoinnesto di *St. thermophilus* (il campione di controllo)

La produzione dello Squacquerone presso azienda Mambelli Srl, S. Maria Nuova di Bertinoro (FC) è stata eseguita in diversi passaggi, di seguito riportati.

1. Il latte è stato pre-riscaldato in caldaia di coagulazione a temperatura controllata fino a 42°C.

2. È stato suddiviso in cinque vasche da 100 L, denominate rispettivamente A1, B2, C3, D4, E5; è stato misurato un pH di 6.28

3. In ogni vasca sono stati aggiunti 4 L di latto-innesto di *St. thermophilus*

4. Dopo 40 minuti sono stati aggiunti 700 g di sale (0,7%)

5. Sono stati aggiunti i co-starter rispettivamente di *Lb. crispatus* BC4 e *Lb. paracasei* A13 incapsulati e non e contemporaneamente è stato creato un campione controllo privo di co-starter

6. È stato aggiunto il caglio in quantità di 37 mL

7. Si è proseguiti con la rottura della cagliata (figura 3.1) e trasferimento dei granuli, grandezza noce, in contenitori cilindrici forati.

Fig. 3.1 : rottura cagliata



Fig. 3.2 : messa in forma



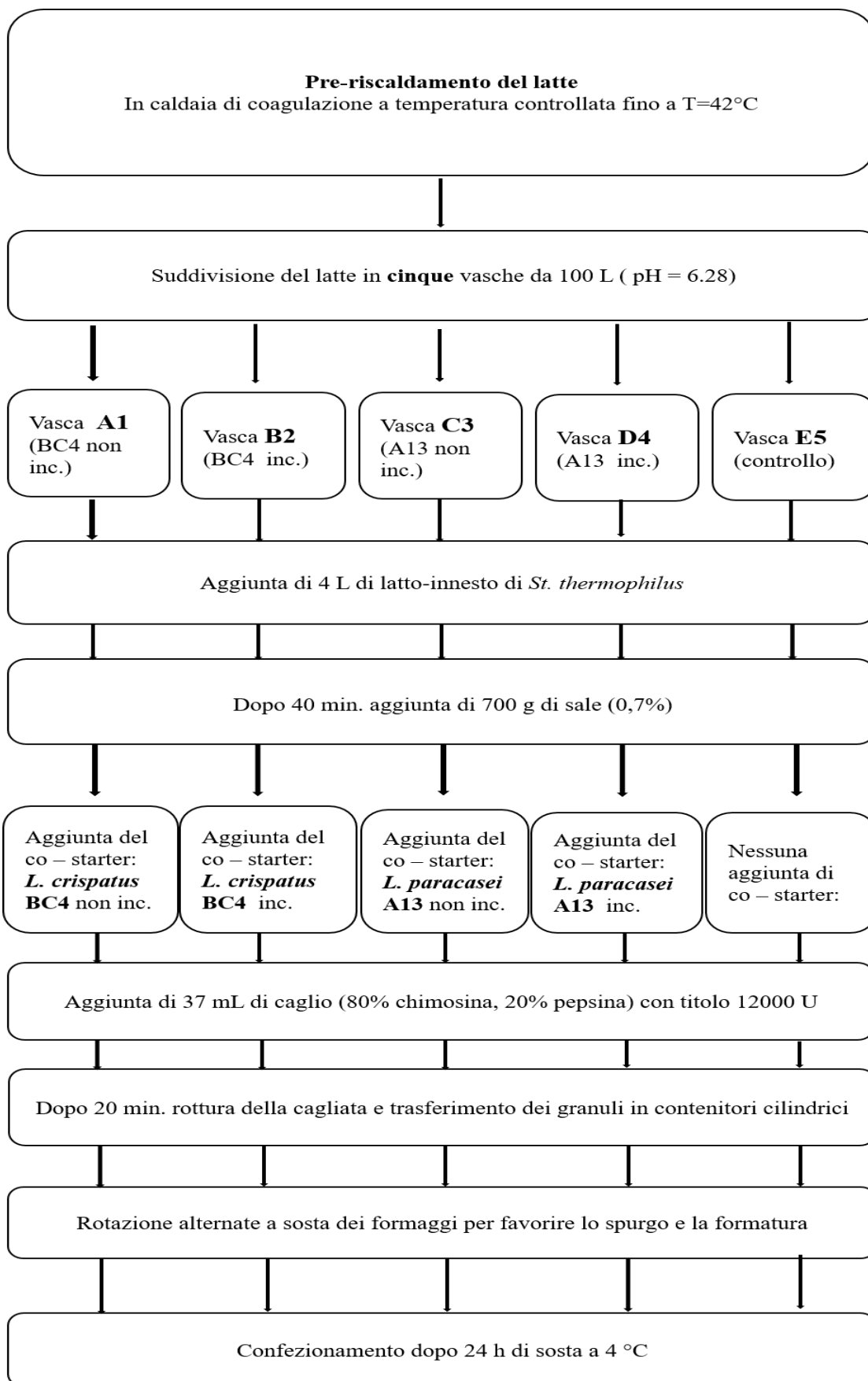
8. Sono state capovolte le forme di formaggio per favorire lo spurgo del siero (figura 3.2).

9. Dopo riposo in cella il prodotto è stato confezionato e stoccato a 4°C (figura 3.3)

Fig. 3.3 : 5 tipologie di Squacquerone prodotte



Tab. 3.1 : Processo di produzione dello Squacquerone presso azienda Mambelli Srl., S. Maria Nuova di Bertinoro (FC).





### **3.0 Analisi dello Squacquerone**

Le analisi svolte sullo Squacquerone, prodotto dal nostro gruppo in azienda Mambelli Srl, sotto supervisione dei colleghi in loco, sono state mirate alla valutazione innanzitutto della qualità microbiologica e della sua conformità verso i limiti microbiologici generici per questo tipo di prodotto. Oltre a ciò, è stata eseguita un'accurata valutazione delle proprietà svolte dal prodotto in questione dovute ai particolari tipi di inoculi applicati durante la produzione. Quindi le analisi sono state mirate alla valutazione dell'andamento della shelf-life del prodotto, e di come il trascorrere del tempo ne influenzasse la resistenza dei probiotici incapsulati e non.

#### **3.1 Analisi chimico-fisiche: pH e $a_w$**

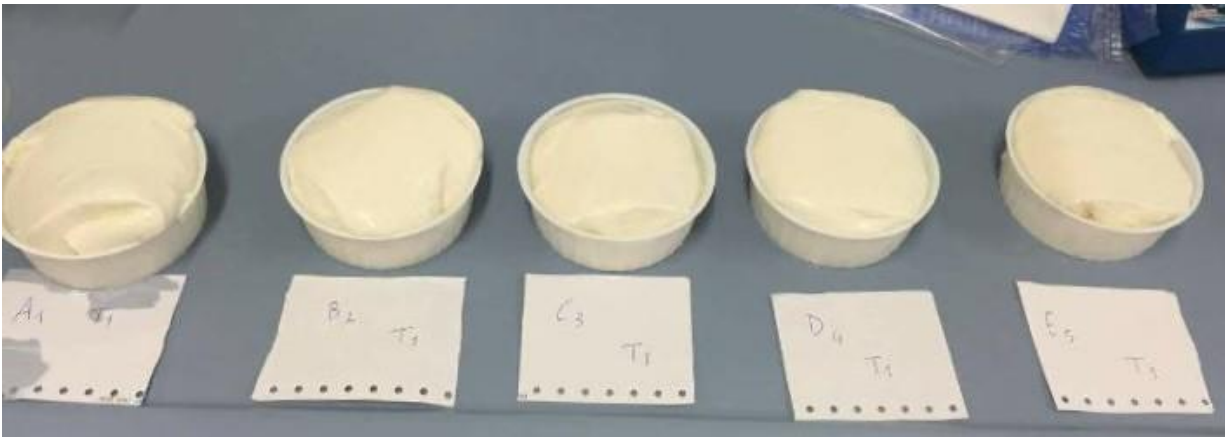
Il **pH** delle 5 tipologie di Squacquerone è stato misurato dopo 1, 4, 6, 8, 11, 13 e 15 giorni dalla caseificazione, con un pH-metro (BASIC 20, Crison, Modena, Italy). La misurazione, eseguita in doppio, prevede, dopo aver calibrato lo strumento, di inserire la sonda del pH-metro all'interno del sacchetto con 5 g di campione e 5 mL di soluzione fisiologica previamente omogeneizzato.

L'attività dell'acqua,  $a_w$ , delle 5 tipologie di Squacquerone è stata misurata con lo strumento aqua lab 4te (decagon devices). Un'aliquota di campione è stata messa sul porta campione, detto anche navicella, questa è stata posizionata sullo strumento di lettura, è stato chiuso e si è eseguita la lettura in doppio.

#### **3.2 Analisi microbiologiche**

Sono state eseguite analisi microbiologiche su campioni di latte e di siero prelevati in azienda. Di base, è stato impiegato l'acqua fisiologica (0,9 % di NaCl) per l'analisi dei ceppi non incapsulati mentre per i campioni incapsulati è stato impiegato il BPS, Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stati Uniti) per la prima analisi. Altre analisi microbiologiche sono state eseguite sulle cinque tipologie di Squacquerone subito dopo la caseificazione e dopo 1, 4, 6, 8, 11, 13 e 15 giorni di conservazione a 4°C (figura 3.4).

Fig. 3.4 : Squacqueroni A1, B2, C3, D4 ed E5 pronti per le analisi



Avendo a disposizione cinque campioni, di cui due sono stati inoculati con le colture co-starter incapsulate, si hanno di base due diverse modalità di analisi. Per quanto riguarda il campione A1, C3 ed E5, si è proceduto prelevando 200 g di prodotto e lo si è sospeso in altrettanti mL di soluzione fisiologica. Si è omogeneizzato, per mezzo di uno stomacher per circa 2 minuti e si è proceduti con il campionamento in provette di acqua fisiologica.

Per quanto riguarda il campione B2 e D4, con i co-starter incapsulati, si è proceduto prelevando 200 mL dal campione e lo si è sospeso in PBS, Phosphate Buffered Saline (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, Stati Uniti). Successivamente lo si è messo in agitazione per 60 minuti per favorire la rottura delle capsule.

In seguito si è prelevato 1 mL per diluizione, da sospendere in 9 mL di soluzione fisiologica sterile. Il numero di diluizioni che è stato preso in considerazione è relativo al carico microbico atteso in log UFC/g presente nella matrice. I successivi campionamenti in piastra, in doppio, sono stati eseguiti inoculando un aliquota di 100  $\mu$ L o di 1 mL rispettivamente se per spatolamento o per immersione, su terreni selettivi come MRS, MRS LP, YPD, M17 e VRBA secondo lo schema (tabella 3.2) :

|               | <b>A1</b>  | <b>B2</b>  | <b>C3</b>  | <b>D4</b>  | <b>E5</b>  |
|---------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>MRS</b>    | A1 I T(n)  | B2 I T(n)  | /          | /          | /          |
|               | A1 II T(n) | B2 II T(n) |            |            |            |
| <b>MRS LP</b> | /          | /          | C3 I T(n)  | D4 I T(n)  | /          |
|               |            |            | C3 II T(n) | D4 II T(n) |            |
| <b>YPD</b>    | A1 I T(n)  | B2 I T(n)  | C3 I T(n)  | D4 I T(n)  | E5 I T(n)  |
|               | A1 II T(n) | B2 II T(n) | C3 II T(n) | D4 II T(n) | E5 II T(n) |
| <b>M17</b>    | A1 I T(n)  | B2 I T(n)  | C3 I T(n)  | D4 I T(n)  | E5 I T(n)  |
|               | A1 II T(n) | B2 II T(n) | C3 II T(n) | D4 II T(n) | E5 II T(n) |
| <b>VRBA</b>   | A1 I T(n)  | B2 I T(n)  | C3 I T(n)  | D4 I T(n)  | E5 I T(n)  |
|               | A1 II T(n) | B2 II T(n) | C3 II T(n) | D4 II T(n) | E5 II T(n) |

Con T (n) in riferimento al giorno di analisi successivo alla caseificazione.

I terreni impiegati sono stati utilizzati per ricercare i lattobacilli, in particolare per lo *Lb. crispatus*, su MRS (De Man, Rogosa e Sharpe); il ceppo *Lb. paracasei* sia incapsulato che non su MRS LP; eventuali lieviti su YPD (Yeast extract Peptone Dextrose medium); lo *St. thermophilus*, lattococco, impiegato come starter su M17 (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) ed eventuali coliformi totali su VRBA (Violet Red Bile Agar).

Tutti i campioni sono stati incubati per 24-48 ore in termostato a temperature di 37°C per le piastre con MRS, in anaerobiosi, e VRBA; temperature di 42°C per YPD e MRS LP e di 30°C per M17.

### 3.3 Analisi reologiche

I prodotti ottenuti sono stati analizzati nel corso del tempo mediante Texture Analyzer, al fine di valutare l'influenza dei microrganismi utilizzati su durezza, adesività, consistenza e indice di viscosità degli Squacqueroni analizzati.

### 3.4 Analisi di proteolisi e determinazione del grado di proteolisi

Al fine di evidenziare i fenomeni proteolitici in relazione al tipo di starter e alla presenza o assenza di coating superficiali, campioni di Squacquerone sono stati sottoposti ad analisi elettroforetica in condizioni denaturanti su gel di acrilammide (SDS-PAGE).

L'analisi è stata condotta sia sulla frazione proteica insolubile, che sulla frazione solubile.

### **3.4.1 Separazione delle frazioni solubili e insolubili**

Campioni di 10 grammi di Squacquerone, risospesi in 20 mL di acqua distillata sterile, sono stati omogeneizzati per 3 minuti in stomacher a temperatura ambiente. Al fine di permettere la precipitazione della frazione caseinica, il pH di ciascun campione omogeneizzato, è stato corretto a 4.6 (punto isoelettrico delle caseine) utilizzando una soluzione di HCl 1N. La variazione del pH è stata monitorata in tempo reale attraverso pH-metro (BASIC 20, Crison, Modena, Italy).

Il pH dei campioni è stato misurato nuovamente dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente e qualora necessario, è stato portato al valore di 4.6 utilizzando HCl 1N.

I campioni sono stati in seguito trasferiti, in tubi da centrifuga, sottoposti a trattamento termico di 40°C per 1 ora e centrifugati a 4000 giri a 4°C per 30 minuti.

Come conseguenza del trattamento termico in ambiente acido, al termine della centrifuga, i campioni sono risultati suddivisi in 3 strati:

- 1°. strato, la parte più leggera, in superficie, è costituita dal grasso emulsionato;
- 2°. strato, la parte liquida, formata dalle proteine solubili;
- 3°. strato, la parte solida, formato dalle proteine insolubili precipitate

La frazione lipidica è stata allontanata dalla frazione solubile mediante filtrazione utilizzando membrane filtranti con cutoff di 0.45 µm (WHATMAN).

Le tre frazioni così ottenute, sono state congelate fino al loro utilizzo rispettivamente a – 80°C (frazione solubile) e -20 °C (frazione insolubile).

### **3.4.2 Elettroforesi frazione solubile**

#### *3.4.2.1 Saggio di Bradford*

Al fine di standardizzare la quantità proteica utilizzata nell'analisi elettroforetica, la concentrazione di ciascuna frazione solubile in analisi, è stata determinata mediante metodo Bradford. L'analisi è stata eseguita mediante utilizzo di un kit commerciale, detto Biorad Protein Assay ( Biorad Milano, IT).

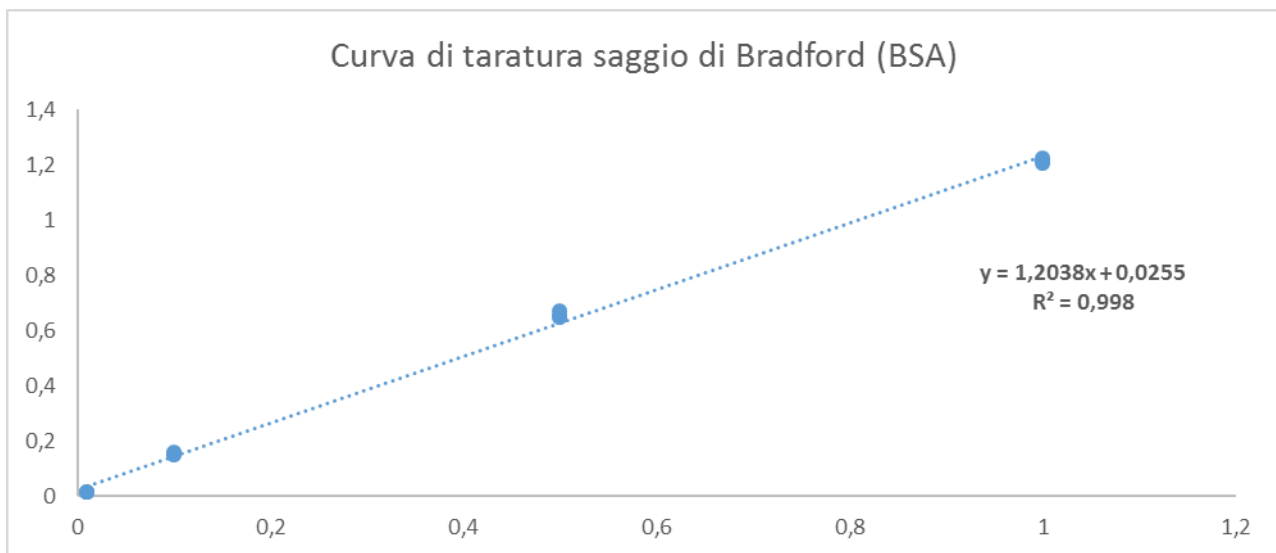
Il protocollo impiegato ha previsto di:

1. risospendere un'aliquota di 40 µL di ciascun campione in 1960 µL di reattivo di Bradford (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent) direttamente in cuvetta;
2. incubare i campioni per 10 min. a temperatura ambiente;
3. procedere alla lettura dell'assorbanza a 595 nm.

Ciascun campione è stato analizzato in doppio e i dai dati di assorbanza ottenuti, è stato possibile risalire alla concentrazione proteica utilizzando una curva di taratura (figura 3.5).

La curva di taratura è il risultante di letture in triplicato dell'assorbanza (Abs 595 nm) di campioni a concentrazione proteica nota. Nello specifico in relazione alla matrice oggetto di analisi è sono state utilizzate soluzione di albumina di siero bovino (BSA) rispettivamente a concentrazioni di 1.00, 0.5, 0.1, 0.01 mg/mL.

In fig. 3.5 : Curva di taratura dosaggio di Bradford ottenuta utilizzando soluzioni a concentrazione nota di albumina di siero bovino (BSA)



#### 3.4.2.2 Preparazione campioni

La preparazione dei campioni ha previsto la denaturazione delle proteine attraverso trattamento termico a 95°C per 5 minuti in presenza di Leammli Buffer (LB) preparato secondo le proporzioni riportate nella seguente (tabella 3.3) :

Tab. 3.3 : Formulazione Leampli Buffer per un volume finale di 40 mL

|                           |          |
|---------------------------|----------|
| Tris-HCl 0.5 M            | 10.53 mL |
| Glicerolo                 | 8.42 mL  |
| SDS 10%                   | 16.84 mL |
| $\beta$ -mercapto etanolo | 4.21 mL  |
| Blu di bromofenolo        | Tracce   |

Questo tipo di trattamento è utile a denaturare le proteine, i polipeptidi e i peptidi presenti nei campioni. Serve, inoltre, a permettere al surfattante, SDS, di rivestire la catena amminoacidica in modo da uniformare la carica superficiale, e quindi consentirne, attraverso un campo elettrico, la migrazione esclusivamente in funzione della massa molecolare.

In base alla concentrazione proteica di ciascun campione sono stati scelti il volume dello stesso e il volume di Buffer da utilizzare. A fine trattamento, i campioni sono stati sottoposti a corsa elettroforetica.

#### 3.4.2.3 Elettroforesi frazione solubile del surnatante

La corsa elettroforetica di ciascun campione di surnatante, è stata eseguita mediante gel pre-cast (BIORAD) ad un gradiente 4-20% di acrilamide. Nel gel sono stati caricati 7 $\mu$  di Precision Plus Standard All Blue (BIORAD), come marcatore e per ciascun campione in analisi 15  $\mu$ L di idrolizzati denaturati in buffer Leampli (corrispondenti a 1.5 mg di proteina). Come marcatori interni sono state utilizzate la albumina di siero bovino (BSA) e l' $\alpha$ -lattoalbumina ( $\alpha$ -la).

La corsa è stata effettuata utilizzando un sistema Mini Protean Cell System (BIORAD) ed utilizzando come running buffer una soluzione costituita da TRIS 25 mM, Glicina 250 mM, SDS 0.1%.

Al fine di permettere alle proteine di migrare, sono stati applicati differenze di potenziale in corrente continua crescenti nel tempo e pari a 90 Volt 30 min e 200 Volt 30 min.

#### 3.4.2.4 *Colorazione e decolorazione dei gel*

Al fine di permettere la visualizzazione dei bandeggi i gel sono stati sottoposti a colorazione e successiva decolorazione. La colorazione è stata effettuata utilizzando soluzioni coloranti costituite da 1.25 g di Comassie Brilliant Blu R-250, 50% di metanolo, 10% di acido acetico glaciale, 40% acqua distillata per 1 ora.

La decolorazione ha previsto l'uso di soluzioni costituite dal 20% metanolo, 10% acido acetico glaciale e 70% acqua distillata per 8 ore.

#### 3.4.3 **Elettroforesi frazione insolubile**

L'analisi della frazione proteica insolubile di ciascun campione è stata effettuata utilizzando il protocollo descritto precedentemente nel paragrafo **3.5.1** con alcune differenze. Diversamente dall'analisi della frazione solubile come marcatori interni sui gel sono state utilizzate  $\alpha$ -caseina ( $\alpha$ -CN) e  $\beta$ -caseina ( $\beta$ -CN).

#### 3.4.4 **Analisi per immagine dei gel**

A fine decolorazione, si è proceduto all'acquisizione delle immagini dei gel utilizzando lo scanner GS-800 (BIORAD).

I gel acquisiti sono stati successivamente analizzati attraverso il software di analisi per immagine quantity one (BIORAD) che ha permesso in relazione alla quantità di proteina caricata e al marcatore utilizzato di determinare sia il peso molecolare (kDa), che sulla base di parametri colorimetrici la quantità relativa (relative quantity %) di ciascuna banda presente nei gel.

### 3.5 **Analisi sensoriale: panel test**

L'analisi sensoriale di un prodotto alimentare è un'analisi eseguita attraverso i sensi della vista, olfatto, tatto, gusto e udito, che mira a valutare le caratteristiche sensoriali e qualitative del prodotto in questione. L'analisi eseguita presso un laboratorio sensoriale, ha visto il giudizio di un panel test di giudici inesperti, in numero compreso tra 15 e 20, che hanno analizzato le cinque tipologie di Squacquerone. Sono state valutate le caratteristiche di colore, cremosità, odore, intensità di sapore, presenza del gusto amaro, su una scala da 1 a 5, nei seguenti giorni: a 4, 6, 8 e 11 giorni di conservazione del prodotto a 4 °C. Sono stati inoltre indicati un giudizio complessivo per ogni tipologia e una preferenza a fine questionario.





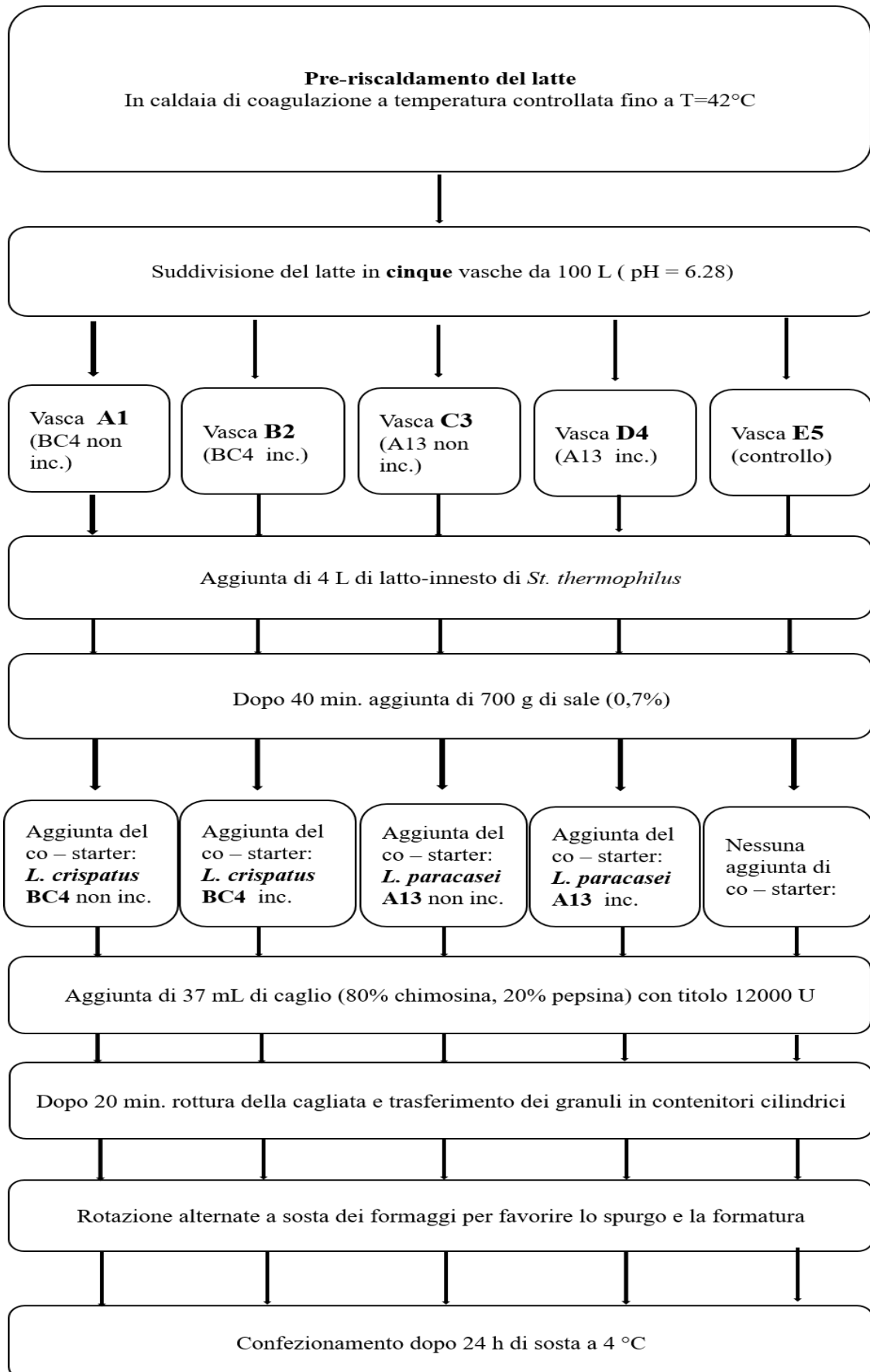
#### 4.CAPITOLO QUARTO – *Risultati e discussione*

Nella mia sperimentazione presso l'azienda Mambelli sono state prodotte cinque diverse tipologie di Squacquerone, secondo il diagramma di flusso riportato in figura 4.1. In particolare, oltre allo Squacquerone tradizionale, sono stati prodotti altri quattro diversi formaggi funzionali, contenenti *Lactobacillus crispatus* BC4 e *Lactobacillus paracasei* A13 che sono stati addizionati come co-starter dopo circa 40 minuti dall'inoculo della coltura starter aziendale di *Streptococcus thermophilus*. Inoltre, in questa sperimentazione sono state valutate anche le potenzialità della tecnologia di microincapsulazione dei co-starter finalizzata sia ad un mantenimento della vitalità dei microrganismi funzionali nel tempo, sia ad una riduzione dei fenomeni di acidificazione che questi possono esplicare nella matrice lattiero-casearia. In tabella 4.1 sono riportate le tipologie di Squacquerone prodotte e le relative sigle utilizzate nel corso della sperimentazione.

Tab. 4.1 : legenda tipologie Squacquerone prodotte presso il caseificio Mambelli Srl, S. Maria Nuova di Bertinoro (FC):

| <b>Sigla</b>                      | <b>Starter e co-starter</b>  |
|-----------------------------------|--|
| <b>A1</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus crispatus</i> BC4<br>non incapsulato |
| <b>B2</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus crispatus</i> BC4<br>incapsulato     |
| <b>C3</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus paracasei</i> A13<br>non incapsulato |
| <b>D4</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus paracasei</i> A13<br>incapsulato     |
| <b>E5 (campione di controllo)</b> | <i>Streptococcus thermophilus</i>  |

Fig. 4.1 : Diagramma di flusso dello Squacquerone di Romagna DOP prodotto presso il caseificio Mambelli Srl, S. Maria Nuova di Bertinoro (FC) :



## Resa di incapsulazione

Sono stati effettuati dei campionamenti a seguito di ogni processo di incapsulazione al fine di determinare la concentrazione (log UFC/g) di *Lb. paracasei* A13 e *Lb. crispatus* BC4 sia dopo le 24 ore di crescita a 37°C che dopo l'incapsulazione effettuata in alginato e olio di girasole mediante omogeneizzazione ad alte pressioni (700 bar). In tabella 4.2 sono riportati i dati relativi alle concentrazioni dei co-starter sia prima che subito dopo la fase di incapsulazione. Si evince chiaramente come dopo il passaggio in omogeneizzatore, sia *Lb. paracasei* A13 che *Lb. crispatus* BC4 risentano del processo di incapsulazione, diminuendo di un ciclo logaritmico la concentrazione iniziale (tenendo in considerazione il valore della concentrazione cellulare in acqua peptonata – t1). Confrontando i due ceppi si vede come *Lb. paracasei* A13 presenti una maggior concentrazione rispetto a *Lb. crispatus* BC4 dopo incapsulazione. Questo microrganismo pertanto è stato inoculato in latte in peso maggiore al fine di ottenere una concentrazione finale media di circa 7 log UFC/g. È interessante notare come la resa d'incapsulazione sia maggiore rispetto a quella riportata in letteratura, per altre tecnologie (spray drying).

Tab. 4.2 : concentrazione iniziale di *Lb. paracasei* A13 e *Lb. crispatus* BC4 nelle diverse fasi della preparazione delle capsule prima dell'inoculo in latte.

|                            | media log UFC/ml |      | media log UFC/g |
|----------------------------|------------------|------|-----------------|
|                            | t0               | t1   | t2              |
| <i>Lb. paracasei</i> (A13) | 9.2              | 10.2 | 9.1             |
| <i>Lb. crispatus</i> (BC4) | 8.6              | 10.1 | 7.9             |

**t0** = concentrazione (log UFC/g) delle cellule overnight

**t1**= concentrazione (log UFC/g) delle cellule in acqua peptonata prima della creazione dell'emulsione/8

**t2**= concentrazione (log UFC/g) delle cellule nelle capsule ottenute dopo omogeneizzazione e centrifuga

Le microcapsule sono state analizzate mediante microscopia a scansione elettronica subito dopo la produzione. In figura 4.2 è riportata l'immagine relativa alle microcapsule ottenute per *Lb. paracasei* A13. Le microcapsule ottenute hanno delle dimensioni comprese tra i 50 e i 100 µm, a indicazione delle buone potenzialità applicative nei sistemi alimentari. Infatti, per essere impiegate

le microcapsule devono rispondere a requisiti fondamentali principalmente focalizzati sulla qualità sensoriale del prodotto. I dati della letteratura indicano come ottimali dimensioni di 100  $\mu\text{m}$  per capsule in grado di veicolare i microrganismi vivi in prodotti alimentari (Iravani et al, 2015). A seguito di questa sperimentazione si può identificare come le alte pressioni di omogeneizzazione siano in grado di ottenere delle microcapsule con caratteristiche perfettamente in linea con quelle indicate in letteratura e ottenute con pressioni più elevate e con un numero maggiore di cicli omogeneizzanti (Ding e Shah, 2009).

Fig. 4.2 : microcapsule ottenute per *Lb. paracasei* A13 mediante alte pressioni di omogeneizzazione (700 bar), utilizzando alginato di sodio in emulsione con olio vegetale come carrier.



## 1.0 Risultati chimico-fisici

In tabella 4.3 sono riportati i valori di attività dell'acqua ( $a_w$ ), relativi ai primi 8 giorni di maturazione a 4°C, determinati nei diversi campioni di Squacquerone. Questi risultati in generale non evidenziano differenze sostanziali tra i diversi campioni in rapporto al co – starter utilizzato e alla modalità di immissione dello stesso (incapsulato e non incapsulato). L'unica eccezione è rappresentata dai risultati ottenuti dopo un giorno dalla produzione, in cui i valori di  $a_w$  del campione ottenuto con il solo starter aziendale (campione E5 di controllo) sono più bassi rispetto a quelli dei campioni contenenti i due microrganismi funzionali (incapsulati e non incapsulati). Questo dato va a confermare i risultati di pH. Infatti il campione E5 (il controllo), dopo un giorno di produzione presenta anche i più bassi valori di pH (5.3) (tabella 4.4).

Tab. 4.3 valori medi di attività dell'acqua ( $a_w$ ) osservati nei diversi tempi durante lo stoccaggio refrigerato dello Squacquerone

| <b>Giorni di stoccaggio refrigerato</b> | <b>A1</b>  | <b>B2</b>  | <b>C3</b>  | <b>D4</b>  | <b>E5</b>               |
|---|--|--|--|--|-------------------------|
|   | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. crispatus</i> BC4 non incapsulato | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. crispatus</i> BC4 incapsulato | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. paracasei</i> A13 non incapsulato | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. paracasei</i> A13 incapsulato | <i>St. thermophilus</i> |
| <b>1</b>                                | 0.987  | 0.985  | 0.995  | 0.987  | 0.972                   |
| <b>4</b>                                | 0.991  | 0.992  | 0.993  | 0.989  | 0.991                   |
| <b>6</b>                                | 0.999  | 0.991  | 0.990  | 0.987  | 0.998                   |
| <b>8</b>                                | 0.990  | 0.987  | 0.993  | 0.993  | 0.997                   |

I dati riportati in tabella 4.4 indicano chiaramente come la presenza dei co-starter incida notevolmente sul trend di pH nel corso della maturazione / conservazione. In particolare, si può notare come i microrganismi funzionali addizionati nella loro forma microincapsulata rallentino il processo di acidificazione rispetto ai loro corrispettivi addizionati in forma planctonica. Infatti, in entrambi i casi il decremento di pH è più spinto quando i ceppi sono stati inoculati tal quali, mentre l'azione delle microcapsule si esplica rallentando il processo di iperacidificazione, soprattutto nel caso di *Lb. paracasei* A13. Il campione che ha mostrato il più spinto processo di acidificazione è stato quello in cui *Lb. paracasei* è stato inoculato come co-starter nella sua forma non incapsulata

(C3), raggiungendo poi un valore minimo, abbastanza distante dagli altri campioni a 11 giorni dall'inoculo (pH 5). Questa differenza tra incapsulato e non incapsulato è stata rilevata anche nel caso di *Lb. crispatus* BC4, che però, nel corso dello stoccaggio ha comunque mantenuto dei livelli di pH pressoché costanti (pH 5.4 dopo 4 giorni dall'inoculo → pH 5.1 dopo 18 giorni di stoccaggio a 4°C in entrambi i test: incapsulato e non incapsulato) e un processo di acidificazione molto più rallentato.

In generale, quindi, si può notare come dopo 13 giorni (fine shelf life) ci siano notevoli differenze in termini di pH tra tutti i campioni analizzati.

Tab. 4.4 : valori medi di attività del pH osservati nei diversi tempi durante lo stoccaggio refrigerato dello Squacquerone

| <b>Giorni di stoccaggio refrigerato</b> | <b>A1</b>  | <b>B2</b>  | <b>C3</b>  | <b>D4</b>  | <b>E5</b>               |
|---|--|--|--|--|-------------------------|
|   | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. crispatus</i> BC4 non incapsulato | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. crispatus</i> BC4 incapsulato | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. paracasei</i> A13 non incapsulato | <i>St. thermophilus</i> + <i>Lb. paracasei</i> A13 incapsulato | <i>St. thermophilus</i> |
| <b>1</b>                                | 5.36   | 5.35   | 5.44   | 5.40   | 5.30                    |
| <b>4</b>                                | 5.45   | 5.41   | 5.23   | 5.37   | 5.48                    |
| <b>6</b>                                | 5.38   | 5.21   | 5.17   | 5.21   | 5.29                    |
| <b>8</b>                                | 5.35   | 5.40   | 5.20   | 5.25   | 5.36                    |
| <b>11</b>                               | 5.24   | 5.21   | 5.00   | 5.18   | 5.22                    |
| <b>13</b>                               | 5.06   | 5.21   | 5.03   | 5.19   | 5.33                    |
| <b>18</b>                               | 5.11   | 5.14   | 4.93   | 4.99   | 5.22                    |

## 2.0 Risultati microbiologici

In azienda, al momento della produzione delle cinque diverse tipologie di Squacquerone, sono stati prelevati dei campioni per le analisi microbiologiche. Questo campionamento è stato effettuato al fine di poter determinare sia il livello effettivo dei co-starter subito dopo l'inoculo, che il livello di co-starter presenti nel siero subito dopo la coagulazione. In tabella 4.5 sono riportati i livelli di carico microbico di *Lb. crispatus* e *Lb. paracasei* utilizzati come microrganismi funzionali e i livelli dello starter aziendale.

Tab. 4.5 : carico cellulare (log UFC/g) dello starter aziendale di *St. thermophilus* e di *Lb. Crispatus* e *Lb. paracasei* utilizzati come co-starter nei campioni di latte e siero dopo l'inoculo e dopo la cagliata.

|           |   | Co-starter funzionali * |       | Starter |       |
|-----------|---|-------------------------|-------|---------|-------|
|           |   | latte                   | siero | latte   | siero |
| <b>A1</b> | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4<br>non incapsulato | 6.87                    | 6.30  | 7.79    | 8.05  |
| <b>B2</b> | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4<br>incapsulato     | 7.41                    | 6.18  | 8.02    | 7.72  |
| <b>C3</b> | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13<br>non incapsulato | 7.92                    | 7.32  | 8.08    | 8.08  |
| <b>D4</b> | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13<br>incapsulato     | 8.51                    | 7.89  | 8.55    | 8.67  |
| <b>E5</b> | Starter   | nd                      | nd    | 8.11    | 8.13  |

\*la determinazione dei co-starter è stata effettuata utilizzando terreni e condizioni selettive specifici per i microrganismi oggetto di analisi, come riportato nei materiali e metodi.

Si può evidenziare come lo starter e i co-starter siano presenti ad elevate concentrazioni sia in latte che in siero (maggiori di 7 log UFC/g), andando così a confermare la presenza di entrambi nel prodotto, ma anche aprendo così la prospettiva di poter identificare il siero dello Squacquerone come un possibile inoculo per la produzione successiva andando così a ridurre l'impatto ambientale dello smaltimento del siero e inoltre a diminuire i costi di produzione del prodotto stesso.

I dati di carico microbico sono riportati in tabella 4.6. La concentrazione di *St. thermophilus* subisce un decremento, nel corso della shelf life, in particolare quando *Lb. crispatus* è presente nello Squacquerone, indipendentemente dalla sua modalità di immissione (da 8 log UFC/g a 6.5 e 5.4 log

UFC/g, rispettivamente non incapsulato e incapsulato). Questo comportamento non si verifica nel caso di *Lb. paracasei* utilizzato come co – starter, in cui i livelli di *St. thermophilus* non scendono mai al di sotto di 6 log UFC/g.

Tab. 4.6 : carico cellulare (log UFC/g) dello starter aziendale di *St. thermophilus* in funzione del tempo di stoccaggio refrigerato e tipologia di Squacquerone.

| <b><i>St. thermophilus</i> (log UFC /g)</b> |  |  |  |  |         |
|---|--|--|--|--|---------|
| <b>giorni</b>                               | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 non incapsulato | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 non incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 incapsulato | Starter |
| <b>1</b>                                    | 7.82   | 8.09   | 8.64   | 8.48   | 6.89    |
| <b>4</b>                                    | 8.34   | 8.73   | 9.97   | 8.80   | 8.12    |
| <b>6</b>                                    | 6.05   | 8.22   | 8.75   | 8.27   | 6.23    |
| <b>8</b>                                    | 5.83   | 6.43   | 7.74   | 7.69   | 6.11    |
| <b>11</b>                                   | 6.75   | 6.63   | 6.74   | 8.32   | 5.63    |
| <b>13</b>                                   | 5.89   | 4.69   | 6.06   | 4.45   | 5.56    |
| <b>18</b>                                   | 6.51   | 5.42   | 8.22   | 8.34   | 5.51    |

C'è una sostanziale differenza nella concentrazione di inoculo dei co-starter: infatti la concentrazione iniziale di *Lb. crispatus* è risultata inferiore rispetto a *Lb. paracasei* di circa un ciclo logaritmico (tabella 4.7). Tali differenze permangono nel prodotto durante le fasi di maturazione e refrigerazione. Esse si sono ugualmente presentate anche a seguito dell'incapsulazione. Infatti, nel caso di *Lb. crispatus*, la resa di incapsulazione è stata sempre più bassa rispetto a quella di *Lb. paracasei*. Questo fenomeno dipende direttamente dalle caratteristiche dei microrganismi e dalla risposta di questi al processo di microincapsulazione, che prevede l'impiego di un trattamento iperbarico. La barotolleranza dei batteri lattici è ben nota, ma esistono significative differenze nella sensibilità alle alte pressioni di omogeneizzazione in rapporto alla specie e, in alcuni casi, al ceppo nell'ambito della stessa (Patrignani et al., 2009; Tabanelli et al., 2013).



Tab. 4.7 : carico cellulare (Log UFC/g) di *Lb. crispatus* e *Lb. paracasei* utilizzati come co-starter in funzione del tempo di stoccaggio dello Squacquerone a 4°C.

| <b>Co-starter (log UFC /g)*</b> |  |  |  |  |         |
|---------------------------------|--|--|--|--|---------|
| <b>giorni</b>                   | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 non incapsulato | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 non incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 incapsulato | Starter |
| <b>1</b>                        | 7.43   | 7.15   | 8.66   | 8.20   | nd      |
| <b>4</b>                        | 7.92   | 7.81   | 9.78   | 9.38   | nd      |
| <b>6</b>                        | 7.49   | 7.29   | 8.43   | 8.17   | nd      |
| <b>8</b>                        | 7.51   | 6.93   | 8.36   | 8.27   | nd      |
| <b>11</b>                       | 7.60   | 6.91   | 8.73   | 6.48   | nd      |
| <b>13</b>                       | 7.54   | 8.26   | 8.60   | 8.07   | nd      |
| <b>18</b>                       | 7.72   | 7.54   | 8.30   | 8.37   | nd      |

\*la determinazione dei co-starter è stata effettuata utilizzando terreni e condizioni selettive specifici per i microrganismi oggetto di analisi, come riportato nei materiali e metodi.

È evidente come *Lb. crispatus* BC4 e *Lb. paracasei* A13 mantengano un'elevata vitalità nel tempo fino alla fine della shelf life indipendentemente dal processo di microincapsulazione. L'ottenimento di concentrazioni al di sopra di 7.0 log UFC/g per tutto il periodo di maturazione / conservazione sono un risultato molto interessante. Infatti, generalmente, i microrganismi probiotici, durante il processo di produzione e stoccaggio refrigerato, tendono notoriamente a diminuire significativamente la loro vitalità (Patrignani et al, 2015). *Lb. paracasei* A13 mostra delle buonissime attitudini alla conservazione refrigerata, infatti il livello cellulare rimane per tutto il periodo di maturazione e conservazione al di sopra di 8 log UFC/g, indipendentemente dal processo di incapsulazione. Anche *Lb. crispatus* BC4, come già detto, rimane vitale durante il corso dello stoccaggio, mantenendo però dei livelli di carico cellulare più bassi. In entrambi i casi, tra *Lb. paracasei* incapsulato (D4) e non incapsulato (C3), e tra *Lb. crispatus* incapsulato (B2) e non incapsulato (A1), non si presentano differenze significative in grado di identificare l'incapsulazione come metodo di protezione per le cellule dal processo produttivo, dalla interazione con l'ambiente e dalla diminuzione del pH che si può verificare nel corso della maturazione.

È importante porre l'accento su come questo fenomeno si discosti da quanto riportato in letteratura. Infatti, l'incapsulazione è stata sempre identificata come uno strumento atto al mantenimento della vitalità di microrganismi probiotici in sistemi stressanti o addirittura all'interno del tratto gastro intestinale. Queste differenze, rispetto alla letteratura, possono dipendere dalle caratteristiche intrinseche del prodotto considerato e dalle caratteristiche implicite dei ceppi funzionali testati. Si può correlare il mantenimento della vitalità anche delle cellule non incapsulate nel sistema Squacquerone direttamente al pH. Infatti, questo parametro ha un ruolo fondamentale nel mantenimento della vitalità dei microrganismi funzionali nel corso della conservazione refrigerata. In questo contesto i valori di pH non scendono mai al di sotto di 5, e questo comporta sicuramente un basso stress per le cellule utilizzate come co-starter. Infatti lo Squacquerone, rispetto ai lattici fermentati, che notoriamente sono il veicolo più utilizzato dai microrganismi probiotici, hanno una maggiore capacità tamponante, valori più elevati di pH ed una matrice solida che protegge le cellule dalle condizioni chimico – fisiche avverse dell'alimento e dall'apparato digerente umano dopo l'ingestione. Entrambi i microrganismi funzionali utilizzati in questa sperimentazione hanno così mostrato una buona attitudine a sopravvivere al pH dello Squacquerone anche durante tutto il corso della conservazione refrigerata a 4°C indipendentemente dalla incapsulazione che ha per contro influito sugli scambi con l'ambiente esterno.

Nei cinque campioni di Squacquerone prodotti è stata determinata anche la concentrazione di lieviti, identificati come microrganismi non desiderati da parte dell'azienda produttrice, in quanto principali agenti degradativi per questa tipologia di prodotto. Nei campioni ottenuti con l'aggiunta di *Lb. paracasei* A13 (incapsulato e non incapsulato) a fine maturazione / conservazione i lieviti erano sempre al di sotto del limite di determinazione (1 log UFC/g), mentre nel caso dei campioni ottenuti con *Lb. crispatus* BC4 questo valore era al di sotto di 1.5, in entrambi i casi (tabella 4.8). I lieviti possono contribuire significativamente all'alterazione del prodotto solo quando il loro carico risulta superiore a 5 log UFC/g. Un altro risultato degno di interesse è la qualità microbiologica dei campioni, come testimoniato dalla concentrazione dei coliformi quasi sempre al di sotto del limite di determinazione (tabella 4.9) indipendentemente dal tipo di microrganismo funzionale utilizzato e dalla sua modalità di immissione nel prodotto.

Tab. 4.8 : carico cellulare (Log UFC/g) dei lieviti in funzione del tempo di stoccaggio dello Squacquerone a 4°C.

| <b>Lieviti (log UFC /g)</b> |  |  |  |  |         |
|-----------------------------|--|--|--|--|---------|
| <b>giorni</b>               | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 non incapsulato | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 non incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 incapsulato | Starter |
| <b>1</b>                    | 2.11   | 2.20   | < 1  | <1   | <1      |
| <b>4</b>                    | 1.92   | 1.73   | 1.73   | 2.42   | 1.67    |
| <b>6</b>                    | <1   | 1.65   | 1.06   | 1.97   | 1.85    |
| <b>8</b>                    | <1   | 1.81   | <1   | 2.10   | 1.24    |
| <b>11</b>                   | 1.81   | <1   | 1.15   | 1.65   | <1      |
| <b>13</b>                   | 1.41   | 1.26   | <1   | <1   | <1      |
| <b>18</b>                   | 2.46   | 3.28   | 3.28   | 1.93   | 1.20    |

Tab. 4.9 : carico cellulare (Log UFC/g) dei coliformi totali in funzione del tempo di stoccaggio dello Squacquerone a 4°C.

| <b>Coliformi(log UFC /g)</b> |  |  |  |  |         |
|------------------------------|--|--|--|--|---------|
| <b>giorni</b>                | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 non incapsulato | Starter + <i>Lb. crispatus</i> BC4 incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 non incapsulato | Starter + <i>Lb. paracasei</i> A13 incapsulato | Starter |
| <b>1</b>                     | <1   | <1   | <1   | <1   | <1      |
| <b>4</b>                     | <1   | <1   | <1   | <1   | <1      |
| <b>6</b>                     | <1   | 1.2  | <1   | 1.3  | <1      |
| <b>8</b>                     | <1   | <1   | <1   | <1   | <1      |
| <b>11</b>                    | <1   | <1   | <1   | <1   | <1      |
| <b>13</b>                    | <1   | 1.0  | <1   | 1.0  | <1      |
| <b>18</b>                    | 1.0  | 1.5  | <1   | <1   | <1      |

### 3.0 Risultati reologici

I prodotti ottenuti sono stati analizzati nel corso del tempo mediante Texture Analyzer, al fine di valutare l'influenza dei microrganismi utilizzati su durezza, consistenza, adesività e indice di viscosità degli Squacqueroni prodotti (figure 4.3 , 4.4 , 4.5 , 4.6). I dati ottenuti indicano chiaramente che tutte le colture funzionali aggiunte come co-starter sono in grado di modificare significativamente i parametri reologici, perlomeno nella prima fase della maturazione / conservazione. Infatti, le differenze registrate per i parametri di durezza e consistenza (figura 4.3 e 4.4 rispettivamente) in rapporto al ceppo tendono ad attenuarsi nel corso della maturazione / conservazione anche se comunque i campioni tendono a rimanere ben distinti anche dopo 13 giorni di stoccaggio refrigerato. In particolare, il campione di controllo ha presentato valori di durezza maggiori rispetto ai campioni in cui è stato co-inoculato un microrganismo funzionale, sia esso *Lb. paracasei* che *Lb. crispatus*. I campioni in cui erano presenti i co-starter comunque hanno mostrato differenze tra loro, evidenziando come i campioni contenenti *Lb. crispatus* abbiano presentato livelli di durezza sempre molto più bassi rispetto ai campioni di controllo e quelli addizionati di *Lb. paracasei* indipendentemente dal processo di incapsulazione. Come atteso il livello di durezza dei campioni diminuisce nel corso della maturazione refrigerata e della conservazione. Tuttavia le cinetiche di diminuzione di questo importantissimo parametro qualitativo dello Squacquerone dipendono in maniera significativa dal microrganismo utilizzato come co-starter e dalla sua modalità di immissione nel prodotto (incapsulato o allo stato planctonico). Infatti, mentre in tutti gli altri campioni la linea di tendenza era abbastanza ripida, nel caso di quelli contenenti *Lb. crispatus* non incapsulato (A1), la diminuzione della durezza è stata minima nel corso della maturazione (figura 4.3). L'incapsulazione dei microrganismi funzionali ha influito negativamente sulla diminuzione della durezza nel corso della maturazione / conservazione. Anche la consistenza diminuisce significativamente nel corso della maturazione refrigerata indipendentemente dal tipo di microrganismo funzionale addizionato come co-starter (figura 4.4). Per contro la adesività segue un andamento opposto aumentando in maniera significativa nei campioni di controllo e nei campioni addizionati di *Lb. paracasei* soprattutto quando incapsulato (D4). Modificazioni meno significative nel corso dello stoccaggio a 4°C sono state riscontrate nei campioni addizionati di *Lb. crispatus* incapsulato e non (figura 4.5).

In generale i campioni inoculati con *Lb. paracasei* A13 utilizzato come co-starter, sono molto più simili per tutti i parametri considerati al campione di controllo (E5), soprattutto quando addizionati nella forma incapsulata (D4). Per contro le differenze con gli Squacqueroni contenenti *Lb. crispatus* BC4 si attenuano quando questo viene supplementato nella sua forma planctonica.

Di seguito riportata Tab. 4.1 : legenda tipologie Squacquerone prodotte presso il caseificio Mambelli Srl, S. Maria Nuova di Bertinoro (FC):

| <b>Sigla</b>                      | <b>Starter e co-starter</b>  |
|-----------------------------------|--|
| <b>A1</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus crispatus</i> BC4<br>non incapsulato |
| <b>B2</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus crispatus</i> BC4<br>incapsulato     |
| <b>C3</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus paracasei</i> A13<br>non incapsulato |
| <b>D4</b>                         | <i>Streptococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus paracasei</i> A13<br>incapsulato     |
| <b>E5 (campione di controllo)</b> | <i>Streptococcus thermophilus</i>  |

Fig. 4.3 : **durezza (g)** delle diverse tipologie di Squacquerone in funzione del tempo di stoccaggio a 4°C.

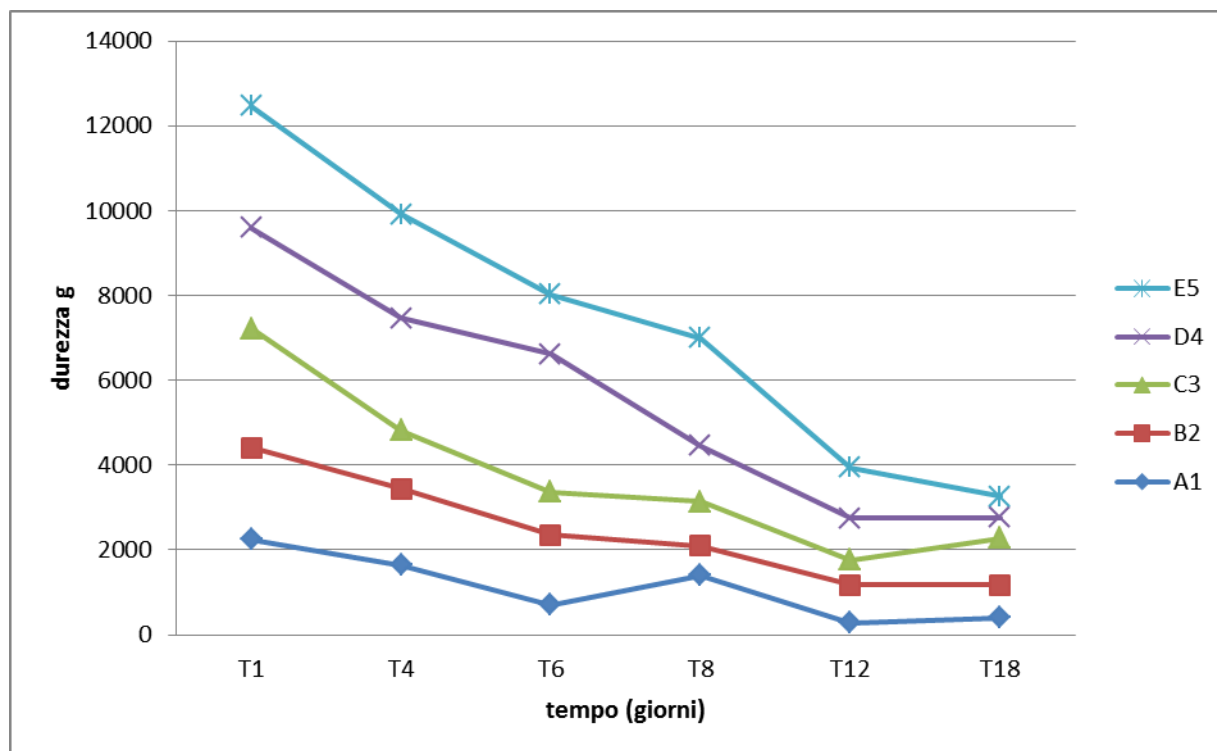


Fig. 4.4 : **consistenza (g.s)** delle diverse tipologie di Squacquerone in funzione del tempo di stoccaggio a 4°C.

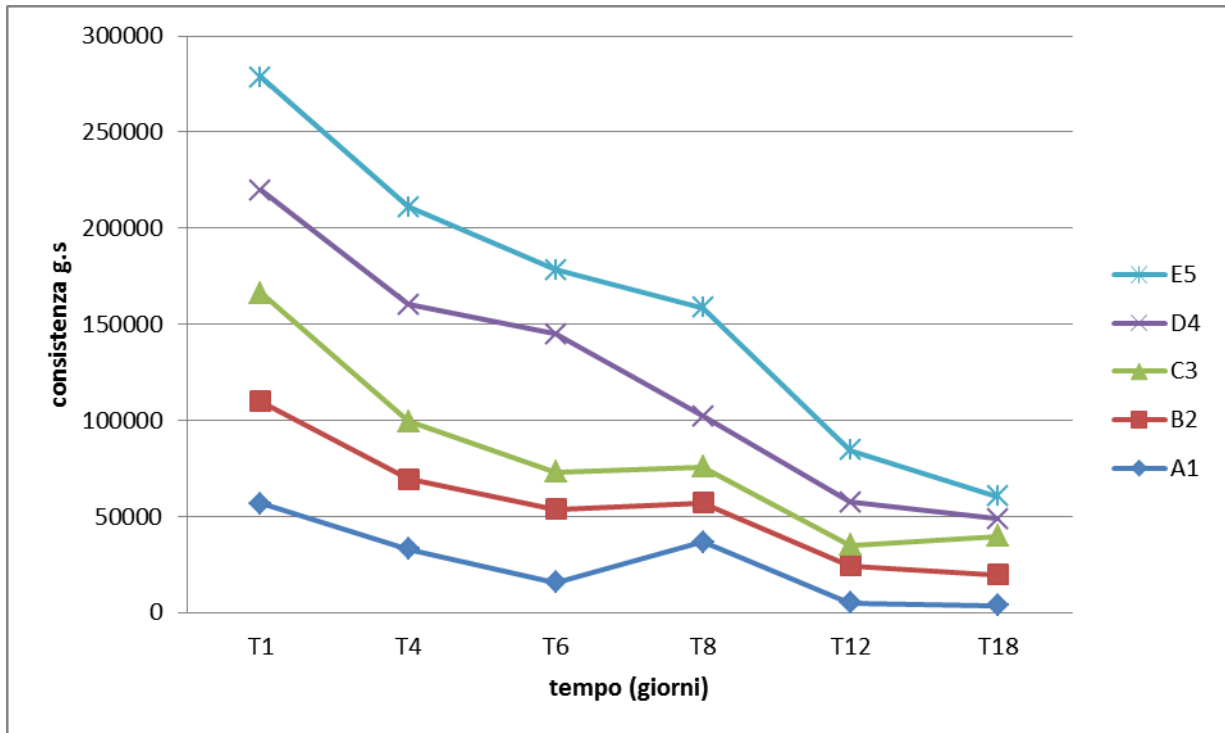


Fig. 4.5 : **adesività (g)** delle diverse tipologie di Squacquerone in funzione del tempo di stoccaggio a 4°C.

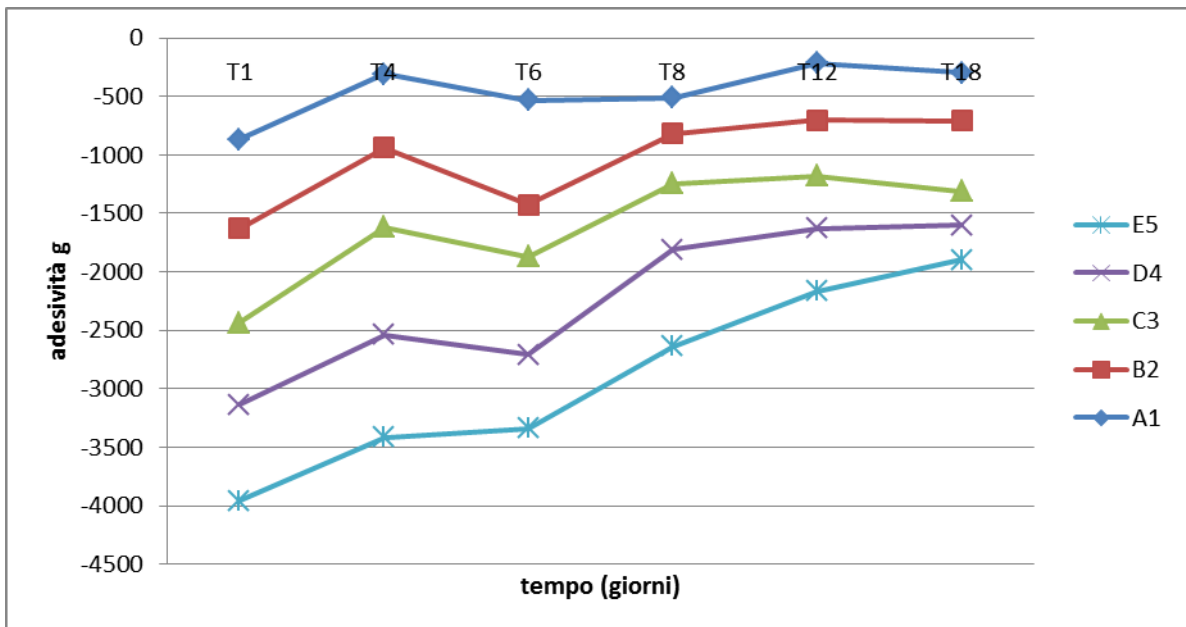
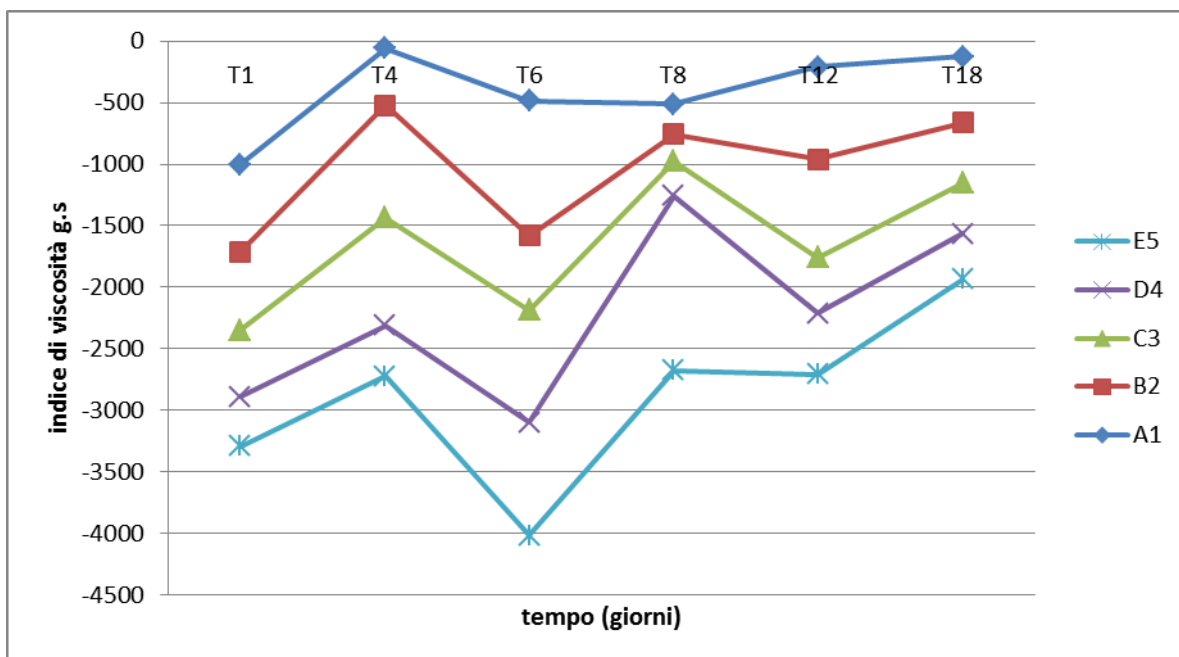


Fig. 4.6 : **indice di viscosità (g.s)** delle diverse tipologie di Squacquerone in funzione del tempo di stoccaggio a 4°C.



## 4.0 Risultati proteolisi

Al fine di valutare la proteolisi dei formaggi Squacquerone in rapporto al microrganismo funzionale addizionato e al tempo di conservazione / maturazione, sono state effettuate analisi elettroforetiche mediante tecnica SDS-page. I gel, relativi alle proteine insolubili ed solubili sono riportati nelle figure 4.7, 4.8 , 4.10 e 4.11.

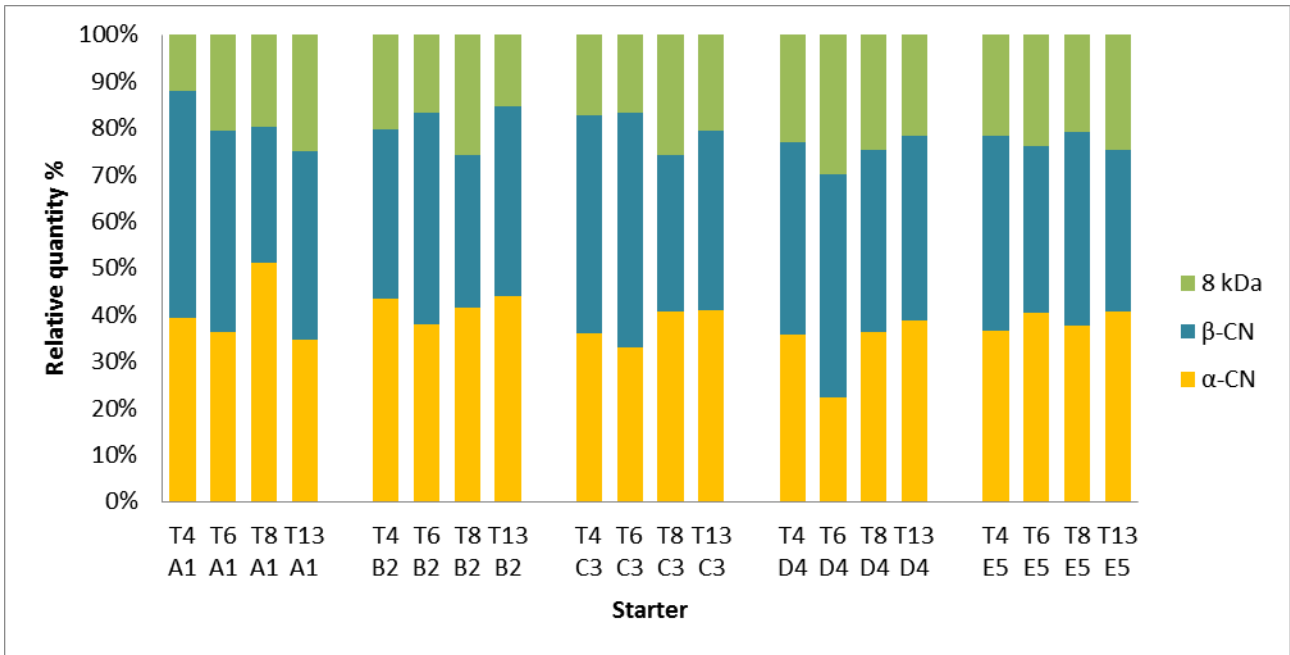
In generale, per quanto riguarda le proteine insolubili, si può sottolineare come la diversa combinazione tra starter e co-starter non implichi modificazioni nel profilo riscontrato tramite SDS-PAGE. Questo comportamento è confermato anche dall'analisi dell'immagine dei gel sviluppata tramite il software Quantity One (Bio-RAD) che ha permesso di mettere in relazione la quantità di proteina caricata con la quantità del marcatore utilizzato e di determinare, in questo modo, sia il peso molecolare (kDa), che la quantità relativa (relative quantity %) di ciascuna banda e, quindi, delle proteine presenti nei gel sulla base di parametri colorimetrici (figura 4.9).

In figura 4.9 sono riportati i risultati di quantificazione relativa delle proteine presenti nella frazione insolubile. L'analisi del profilo proteolitico della frazione insolubile ha evidenziato come, non vi sia un sostanziale effetto legato alla natura del co-starter utilizzato alla presenza o assenza di coatings superficiali a carico della frazione  $\alpha$  e  $\beta$  caseinica nel tempo. L'analisi ha inoltre identificato la presenza di un polipeptide di circa 8 kDa la cui abbondanza relativa resta comunque costante indipendentemente dal tempo e dalla natura dello starter. D'altra parte i dati relativi alle proteine insolubili sono in accordo con i dati della letteratura che non attribuiscono ai batteri lattici in generale capacità litiche nei confronti di questa frazione azotata del latte e dei formaggi.





Figura 4.9 : quantità relativa (relative quantity %) dei prodotti di proteolisi della frazione insolubile in funzione dello starter e del co-starter utilizzato



Diverso è il comportamento nei confronti della frazione solubile che presenta differenze nei pattern di proteolisi in funzione sia della combinazione di starter e co-starter, sia in funzione della tipologia di immissione del co-starter nel prodotto (incapsulato o non incapsulato). In figura 4.10, e in figura 4.11 sono riportate le immagini dei gel ottenuti a seguito dell'analisi della frazione solubile.



Inizialmente, un'approfondita ricerca bibliografica, ha permesso di identificare, sulla base del peso molecolare alcune bande presenti nei gel ottenuti. In particolare l'analisi dei prodotti di proteolisi ha permesso di identificare le bande relative a:  $\alpha$ ,  $\beta$  e k caseina ( **$\alpha$ -CN**,  **$\beta$ -CN**, **k-CN**), albumina del siero bovina (**BSA**),  $\alpha$ -lattoalbumina ( **$\alpha$ -la**),  $\beta$ -lattoglobulina ( **$\beta$ -gl**) e lattotransferrina (**LTF**) (Felfoul et al., 2017). Bande relative a peptidi di peso molecolari di 51 kDa, 21 kDa, 15 kDa e 8 kDa restano tuttavia non identificate (tabella 4.11 (a) e 4.11 (b) ).

Tab. 4.11(a) : frazione proteica insolubile e  
corrispondente peso molecolare (kDa)

| <b>Frazione proteica insolubile</b> | <b>kDa</b> |
|-------------------------------------|------------|
| <b><math>\alpha</math>-CN</b>       | 25.22 kDa  |
| <b><math>\beta</math>-CN</b>        | 23.92 kDa  |
| <b>Non identificata</b>             | 8.00 kDa   |

Tab. 4.11 (b) : frazione proteica solubile e corrispondente peso molecolare (kDa)

| <b>Frazione proteica solubile</b> | <b>kDa</b> |
|-----------------------------------|------------|
| <b>LTF</b>                        | 78.39 kDa  |
| <b>BSA</b>                        |            |
| <b>Non identificata</b>           | 51.56 kDa  |
| <b><math>\alpha</math>-CN</b>     | 25.22 kDa  |
| <b><math>\beta</math>-CN</b>      | 23.92 kDa  |
| <b>Non identificata</b>           | 21.07 kDa  |
| <b>k-CN</b>                       | 19.57 kDa  |
| <b><math>\beta</math>-lg</b>      | 17.81 kDa  |
| <b>Non identificata</b>           | 15,14 kDa  |
| <b><math>\alpha</math>-la</b>     | 14.18 kDa  |

Grazie all'analisi dell'immagine e alla possibilità di effettuare una quantificazione relativa e quindi di esplicitare il profilo di proteolisi della frazione solubile, è stato possibile sottolineare come le maggiori differenze tra i campioni in cui era presente il co-starter, sia esso *Lb. crispatus* BC4 o *Lb. paracasei* A13, si sono evidenziate dopo 6 giorni di conservazione. Più specificatamente in presenza di *Lb. crispatus* BC4, utilizzato come co-starter, a partire dal sesto giorno di conservazione sono ben evidenti differenze in confronto al prodotto ottenuto con lo starter aziendale (campione E5) (figura 4.12). Infatti soprattutto nei campioni addizionati di *Lb. crispatus* allo stato planctonico sono rilevabili peptidi a più basso peso molecolare derivanti soprattutto dall'idrolisi della k-caseina rispetto ai campioni di controllo, a testimonianza di un'incrementata attività proteolitica in presenza del microrganismo funzionale considerato. L'incapsulazione sembra deprimere le attività litiche di *Lb. crispatus* BC4 (figura 4.10). Tuttavia nei campioni addizionati di *Lb. crispatus* incapsulato (B2) la proteolisi è accelerata rispetto ai campioni di controllo (figura 4.13). Analogo comportamento in rapporto all'incapsulazione viene evidenziato da *Lb. paracasei* A13 che tuttavia evidenzia pattern litici più rallentati rispetto a *Lb. crispatus* BC4. Tuttavia i profili proteolitici rilevati nel corso della maturazione / conservazione sono specifici in rapporto al ceppo, alla modalità di immissione dei microrganismi funzionali nei prodotti, e al tempo di conservazione a 4°C.

Questi dati sono in accordo con la letteratura. Infatti è noto che la proteolisi è il fenomeno più importante nella maturazione dei formaggi anche di quelli a breve maturazione determinandone in maniera significativa la struttura, la reologia e il profilo in composti d'aroma, e quindi non è sorprendente che vi sia una diminuzione o la scomparsa delle bande a basso peso molecolare nel corso della conservazione. È noto infatti che i prodotti della proteolisi rappresentano i precursori dei composti più caratterizzanti l'aroma dei formaggi. I pattern di proteolisi e di trasformazione dei prodotti della proteolisi in altri composti dipendono notoriamente dal microbiota del prodotto stesso e dai corredi enzimatici dei suoi componenti.

Nei prodotti considerati il microbiota è dominato da *St. thermophilus* e dai microrganismi utilizzati come co-starter che sono caratterizzati da specifici corredi enzimatici che danno pertanto origine a specifici profili proteolitici. Ad esempio dopo 8 giorni di conservazione sono ancora presenti nel campione inoculato con *Lb. crispatus* BC4 non inoculato (A1) e inoculato (B2) bande relative alla lattotransferrina (LTF), bovina serum albumine (BSA) e ad una proteina di 51.5 kDa, che invece scompaiono nel campione di controllo (figura 4.12 e 4.13 rispettivamente). Anche a fine shelf life (13 giorni) ci sono delle differenze significative: nel campione A1 (*Lb. crispatus* BC4 non incapsulato) compare una banda a 21 kDa mentre scompaiono la LTF e la banda a 51.5 kDa. Differenze simili si possono riscontrare anche tra il campione B2 (*Lb. crispatus* BC4 incapsulato) e

il campione E5 (il controllo) dove però si può evidenziare anche un effetto dell'incapsulazione nel meccanismo di proteolisi spiegato da *Lb. crispatus* (figura 4.13). Infatti, confrontando i campioni inoculati con *Lb. crispatus* non incapsulato (A1) e incapsulato (B2) dopo 13 giorni di maturazione / conservazione si può notare come nel campione non incapsulato (A1) permanga la banda relativa alla BSA, mentre nel campione incapsulato (B2) questa scompare, a testimonianza della inibizione delle attività litiche nei microrganismi incapsulati. Tuttavia nel caso di *Lb. paracasei* incapsulato (D4) a fine fermentazione scompare la LTF mentre questa permane nel campione di *Lb. paracasei* non incapsulato (C3) e nel campione di controllo (E5) (figura 4.14 e 4.15).

Bisogna considerare inoltre che l'incapsulazione se da una parte in alcuni sistemi particolarmente proibitivi può rappresentare una protezione per le cellule dall'altra riduce gli scambi con l'ambiente esterno sia in termini di nutrienti in entrata che di prodotti del metabolismo ed enzimi in uscita. Le proteasi e le peptidasi dei batteri lattici sono generalmente collocate sulla superficie della cellula o nel citoplasma quindi la loro attività è subordinata al contatto con il substrato (proteine intere o peptidi) disperso nel prodotto. La presenza di una barriera tra le cellule e il substrato incide negativamente sulla cinetica di proteolisi, analogamente a quanto già osservato per i fenomeni di iperacidificazione.

Di seguito riportata Tab. 4.1 : legenda tipologie Squacquerone prodotte presso il caseificio Mambelli Srl, S. Maria Nuova di Bertinoro (FC):

| <b>Sigla</b>                      | <b>Starter e co-starter</b>   |
|-----------------------------------|---|
| <b>A1</b>                         | <i>Staphilococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus crispatus</i> BC4 non<br>incapsulato |
| <b>B2</b>                         | <i>Staphilococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus crispatus</i> BC4<br>incapsulato     |
| <b>C3</b>                         | <i>Staphilococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus paracasei</i> A13<br>non incapsulato |
| <b>D4</b>                         | <i>Staphilococcus thermophilus</i> +<br><i>Lactobacillus paracasei</i> A13<br>incapsulato     |
| <b>E5 (campione di controllo)</b> | <i>Staphilococcus thermophilus</i>  |

Fig. 4.12 : confronto tra l'effetto proteolitico, espresso in quantità relativa, di *Lb. crispatus* BC4 non incapsulato (A1) e *St. thermophilus* (E5) nel tempo.

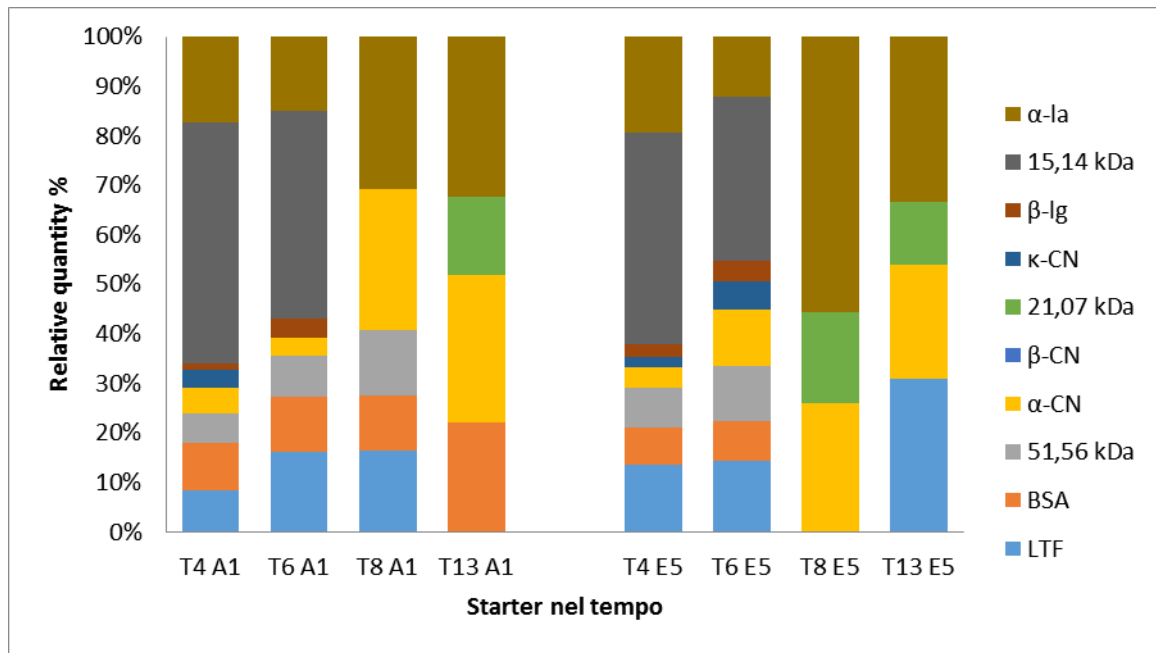


Fig. 4.13 : confronto tra l'effetto proteolitico, espresso in quantità relativa, di *Lb. crispatus* BC4 incapsulato (B2) e *St. thermophilus* (E5) nel tempo.

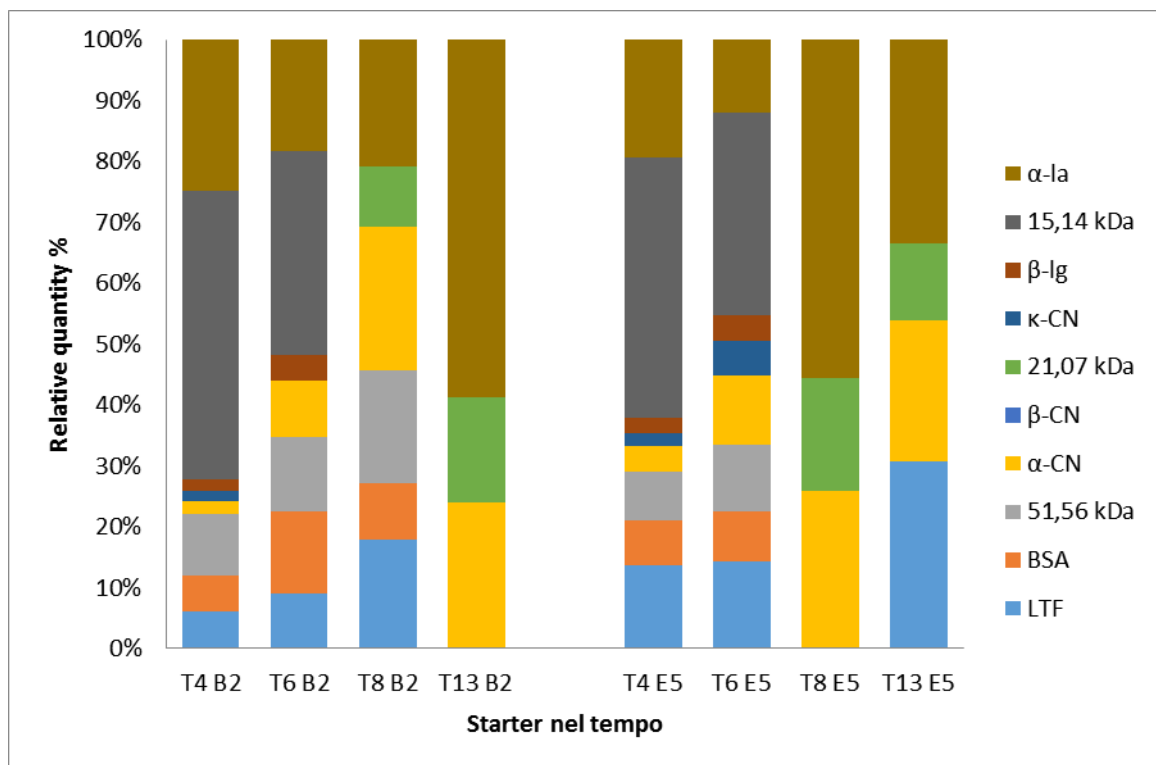


Fig. 4.14 : confronto tra l'effetto proteolitico, espresso in quantità relativa, di *Lb. paracasei* A13 non incapsulato (C3) e *St. thermophilus* (E5) nel tempo.

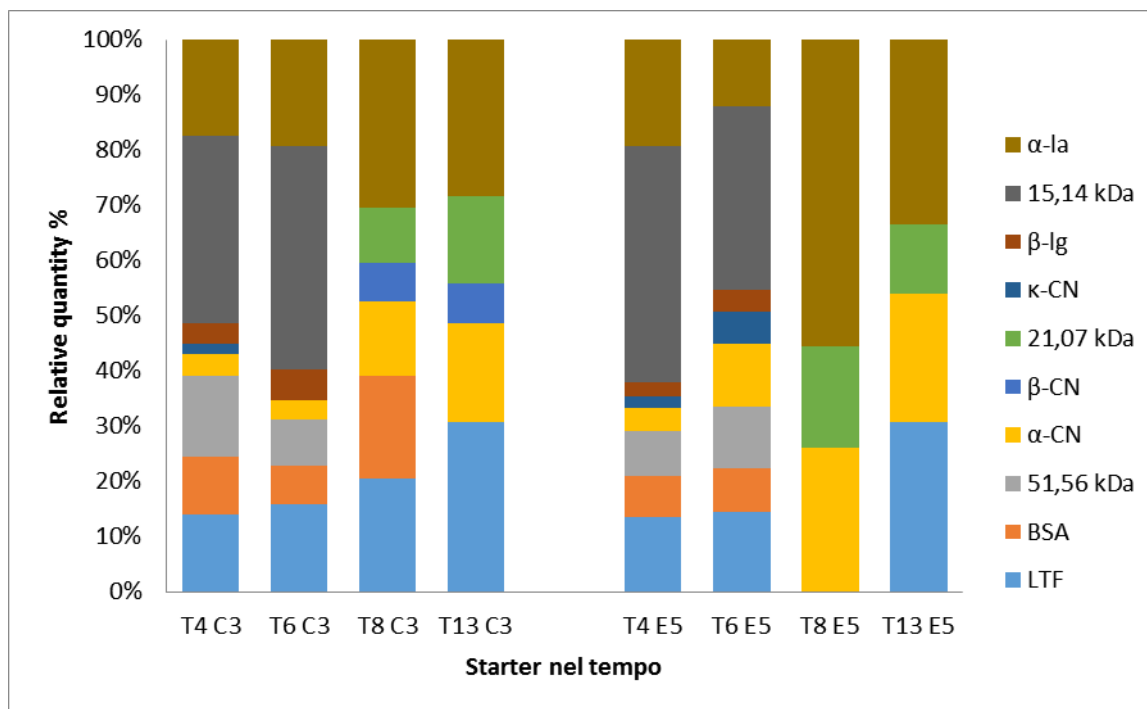
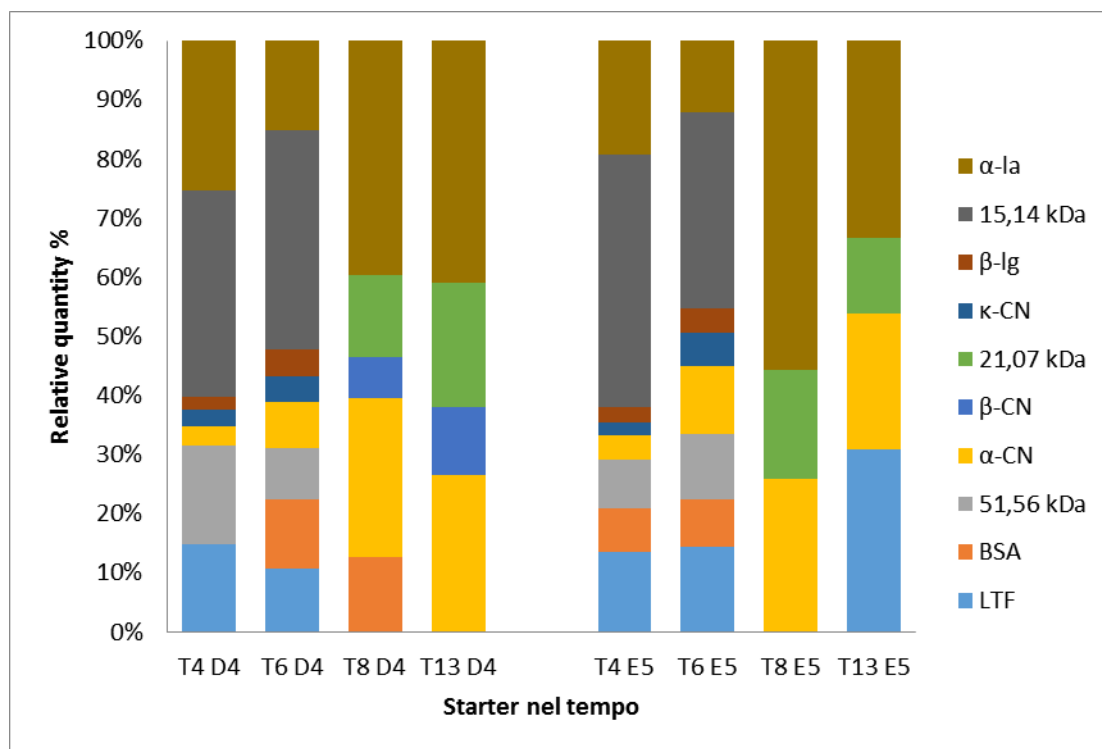


Figura 4.15 : confronto tra l'effetto proteolitico, espresso in quantità relativa, di *Lb. crispatus* A13 incapsulato (D4) e *St. thermophilus* (E5) nel tempo.





## 5.0 Risultati sensoriali

L'analisi sensoriale è stata effettuata dopo 4 e 11 giorni di maturazione al fine di comprendere le preferenze nel momento in cui il prodotto viene messo in commercio e in un punto vicino alla fine della shelf life.

Dopo 4 giorni dalla produzione i campioni A1 (contenti il *Lb. crispatus* BC4 non incapsulato) e il campione C3 (*Lb. paracasei* A13 non incapsulato) sono quelli risultati come i più apprezzati in tutti i parametri considerati (figura 4.16). In particolare il campione C3 (*Lb. paracasei* A 13 non incapsulato) è stato quello più apprezzato in termini di cremosità, sapore e giudizio complessivo. Il campione D4 (ottenuti con *Lb. paracasei* nella sua forma incapsulata) e il campione A1 (ottenuti con *Lb. crispatus* non incapsulato) sono stati comunque ritenuti gradevoli. Il campione E5 (ottenuto con lo starter aziendale), sempre dopo 4 giorni dalla produzione è stato apprezzato soprattutto per il colore e per l'odore, mentre ha avuto un giudizio complessivo basso e non è mai stato identificato come campione preferito (figura 4.18).

Dopo 11 giorni di conservazione refrigerata le differenze nelle preferenze degli assaggiatori si attenuano significativamente (figura 4.17). Tutti i campioni contenenti i microrganismi funzionali hanno fatto registrare lo stesso indice di preferenza ad eccezione del campione B2 (addizionato di *Lb. crispatus* incapsulato) che ha presentato un indice di preferenza più basso di tutti gli altri campioni, attribuibile alla presenza di un più marcato retrogusto amaro. Anche il campione tradizionale ha ricevuto un indice di preferenza più basso rispetto agli Squacqueroni contenuti *Lb. paracasei*, sia incapsulato che non, D4 e C3 rispettivamente, che *Lb. crispatus* non incapsulato A1 (figura 4.18).

Questi dati indicano chiaramente che il materiale costituente la microcapsula è in grado di condizionare in maniera significativa oltre che lo scambio con l'ambiente circostante sia in entrata che in uscita anche il metabolismo microbico ed il rilascio nel substrato di enzimi e molecole volatili e non con conseguenze significative anche sulle caratteristiche organolettiche dei prodotti. Pertanto anche la microincapsulazione contribuisce in maniera significativa alla generazione di specifici fingerprinting proteolitici e organolettici che possono contribuire alla caratterizzazione e alla innovazione di prodotto. Pertanto anche la microincapsulazione, oltre che la selezione di microrganismi funzionali appropriati, può essere considerato uno strumento funzionale all'innovazione e alla differenziazione in un settore quale quello dei prodotti lattiero-caseari funzionali caratterizzati da un'estrema omogeneità dell'offerta e da prodotti aventi caratteristiche organolettiche più scadenti rispetto a quelli tradizionali.

Fig. 4.16 : valutazione delle caratteristiche di colore, cremosità, odore, sapore, intensità di amaro e giudizio complessivo delle diverse tipologie di Squacquerone (A1, B2, C3, D4 ed E5) al tempo T4 dalla caseificazione.

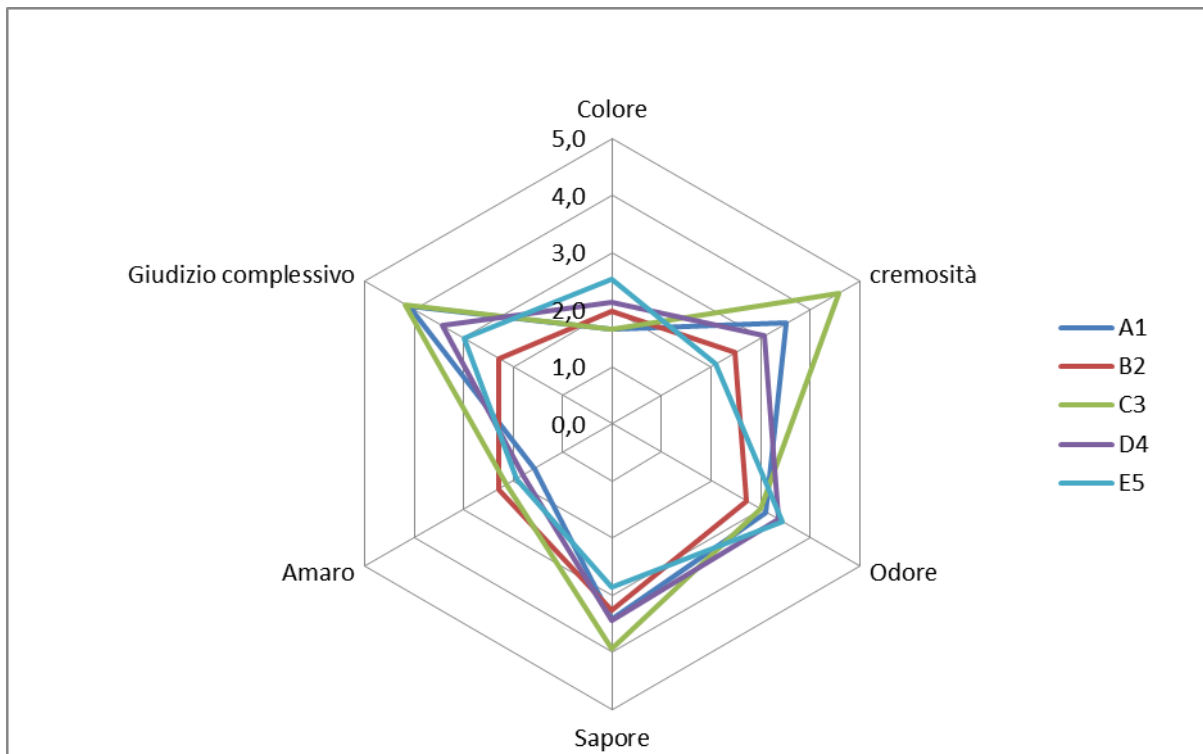


Fig. 4.17 : valutazione delle caratteristiche di colore, cremosità, odore, sapore, intensità di amaro e giudizio complessivo delle diverse tipologie di Squacquerone (A1, B2, C3, D4 ed E5) al tempo T11 dalla caseificazione.

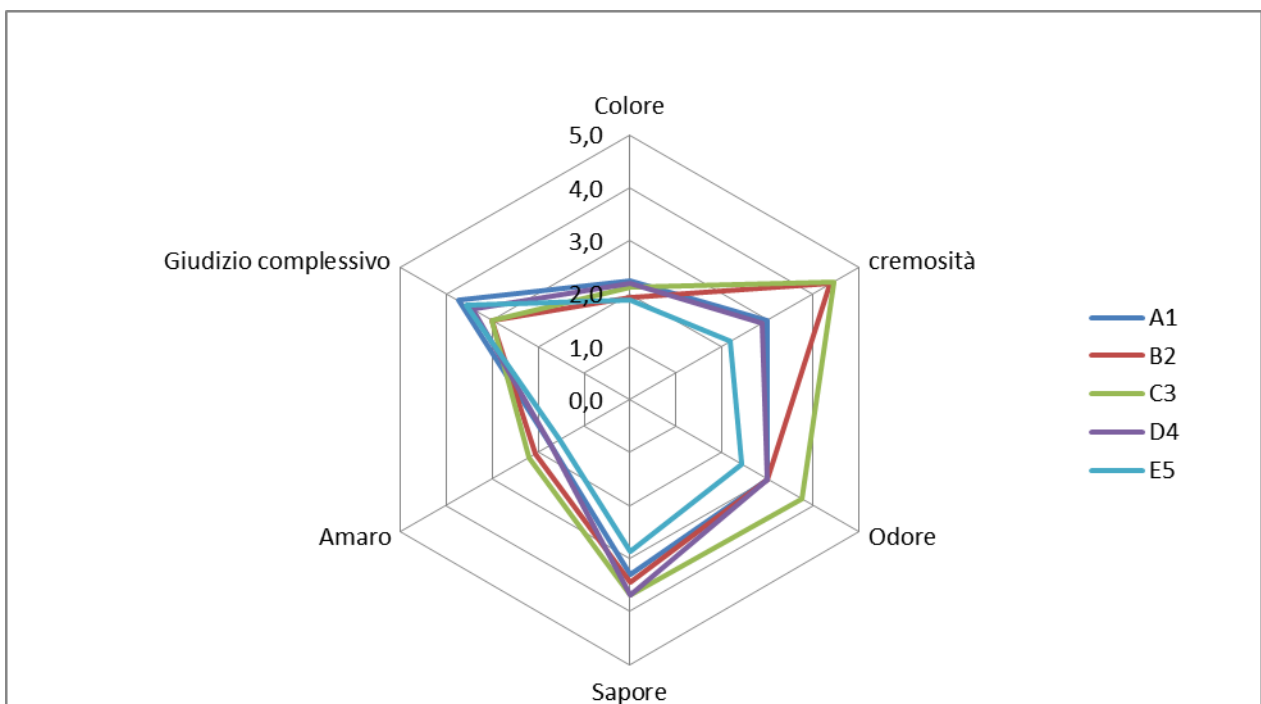
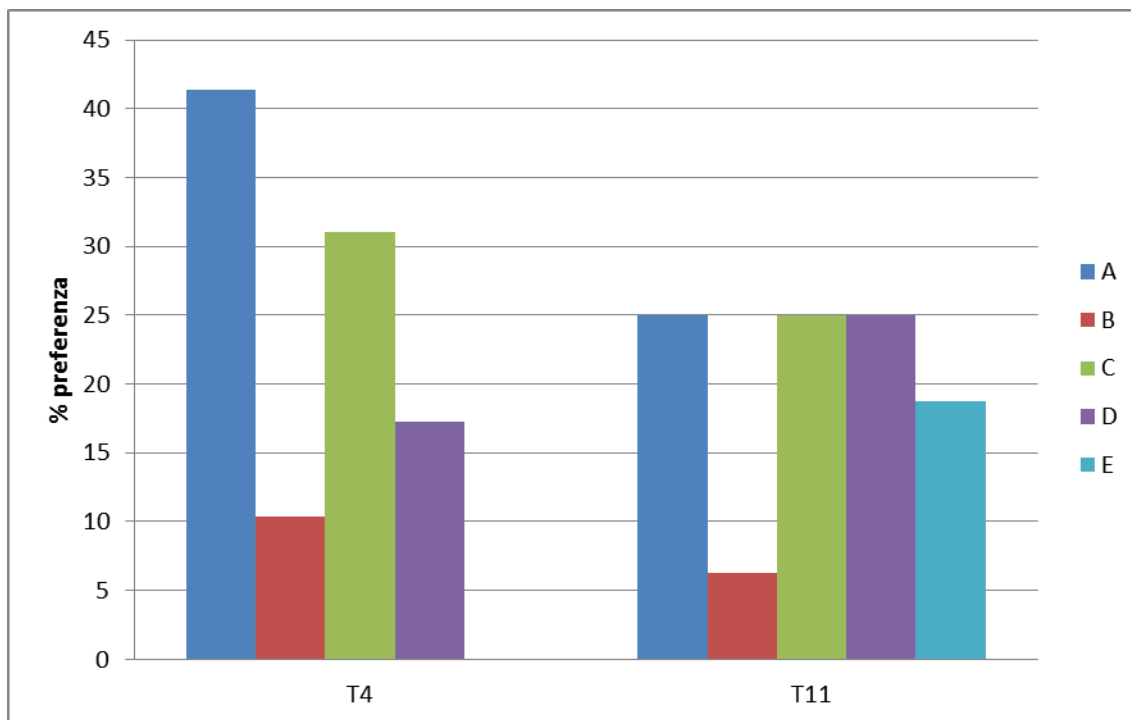


Fig. 4.18 : variazione della preferenza percentuale dei diversi campioni nei due tempi T4 e T11 dalla caseificazione.





## 5.CAPITOLO QUINTO – Conclusioni

I prodotti lattiero caseari addizionati con microrganismi probiotici o funzionali sono stati riconosciuti come alimenti funzionali in grado di conferire un effetto benefico e di prevenire alcune patologie. Questo presupposto fa sì che la ricerca riguardante questa tipologia di prodotti sia sempre in ascesa e propositiva in termini di nuove tecnologie. In questa sperimentazione è stato dimostrato come l'utilizzo di due diversi ceppi di batteri lattici, con diverse caratteristiche funzionali, possa essere un notevole passo avanti per l'innovazione di prodotto nel settore degli alimenti funzionali e salutistici. In particolare l'uso di *Lb. crispatus* BC4, isolato da ambiente vaginale e identificato come microrganismo con spiccata attività battericida nei confronti di patogeni alimentari e anti *Candida*, può sicuramente consentire la formulazione di un alimento in grado di prevenire alcune patologie tipiche del genere femminile. Contemporaneamente *Lb. paracasei* A13 probiotico si è dimostrato sicuramente un ceppo promettente per la creazione di prodotti lattiero caseari probiotici anche quando questi richiedono una conservazione refrigerata. Infatti la refrigerazione induce molto spesso la perdita di vitalità dei microrganismi funzionali e conseguentemente della loro funzionalità. Infatti per esplicare le loro funzioni benefiche nell'organismo umano essi devono essere ingeriti in alto numero (8 – 10 log UFC/die), ed è quindi fondamentale che essi si mantengano vivi nell'alimento durante la conservazione e che resistano alle barriere dell'apparato digerente umano. Sebbene l'incapsulazione venga indicata dalla letteratura come uno strumento per incrementare la sopravvivenza dei microrganismi probiotici nei lattici fermentati e durante la digestione gastro-duodenale simulata, i dati della mia tesi hanno dimostrato che l'incapsulazione non ha inciso sulla sopravvivenza dei 2 ceppi funzionali considerati. Infatti in tutti gli Squacqueroni analizzati la carica cellulare di questi è sempre stata alta e costante andando così a confermare come le caratteristiche intrinseche dello Squacquerone conferiscano di per sé protezione ai microrganismi probiotici durante lo stoccaggio.

Tuttavia, il fatto di aver creato una protezione per i microrganismi funzionali (microcapsule) ha permesso di evitare fenomeni indesiderati di iperacidificazione, con conseguenti risvolti negativi sui fenomeni di proteolisi e sulle caratteristiche reologiche e sensoriali dei prodotti. Bisogna considerare infatti come l'incapsulazione possa rappresentare da un lato una protezione per le cellule e dall'altro possa ridurre gli scambi con l'ambiente esterno sia in termini di nutrienti in entrata che di prodotti del metabolismo ed enzimi in uscita. In questo caso i profili proteolitici rilevati nel corso della maturazione / conservazione sono correlati al ceppo, ma anche alla modalità di immissione dei microrganismi funzionali nei prodotti, e al tempo di conservazione a 4°C. In particolare, in presenza dei co-starter non incapsulati i processi litici sembrano accelerati rispetto al

campione di controllo ottenuto con l'aggiunta del solo starter aziendale. È stato interessante notare come la cinetica di proteolisi fosse influenzata negativamente dalla presenza delle microcapsule. Queste infatti creano una barriera tra le proteasi e le peptidasi collocate sulla superficie della cellula o all'interno della stessa e il substrato che deve essere trasformato dalle stesse. In questo senso la microincapsulazione può essere vista come uno strumento, che deve essere tuttavia ottimizzato, per modulare le cinetiche di maturazione, a loro volta dipendenti dalla proteolisi, dello Squacquerone e conseguentemente il momento di immissione di questo sul mercato. Il prodotto tradizionale di riferimento in questo studio viene immesso sul mercato dopo 4 giorni di maturazione a 4°C. La possibilità di modulare le cinetiche di maturazione può consentire di estendere la shelf-life dei prodotti e conseguentemente di allargare anche i mercati.

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione evidenziano, inoltre, come la presenza di microrganismi funzionali microincapsulati influenzi in maniera significativa oltre che lo scambio con l'ambiente circostante anche il metabolismo microbico ed il rilascio nel substrato di enzimi e molecole volatili e non, con conseguenze significative sulle caratteristiche organolettiche dei prodotti. In questo contesto è stato possibile identificare specifici fingerprinting proteolitici e organolettici in grado di contribuire alla caratterizzazione e alla innovazione dello Squacquerone.

In conclusione sia l'aggiunta dei co-starter in forma planctonica, che l'aggiunta degli stessi in forma microincapsulata insieme a *St. thermophilus* hanno permesso di produrre quattro diverse tipologie di Squacquerone identificabili come alimenti funzionali caratterizzati da specifici patterns proteolitici e organolettici. Si possono così indicare la microincapsulazione e la selezione di microrganismi funzionali appropriati, come strumenti fondamentali per l'innovazione e la differenziazione dei prodotti lattiero-caseari, solitamente caratterizzati da un'estrema omogeneità dell'offerta.

## **6. Bibliografia**

AFSSA. Effets des probiotiques et prébiotiques sur la flore et l'immunité de l'homme adulte. 2005.

Anal A. K., Singh H.; Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends Food Science Technology*. 18:240–251. 2007.

Anil K. P., Sanjeev K., Puniya M., Malik R.; *Fermented Milk and Dairy Products. An Overview*. 3-24. Taylor & Francis Group, LLC, 2016.

Aureli P., Capurso L., Castellazzi A. M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccotti G. V.; *Probiotici e Salute. Stato dell'arte basato sulle evidenze*. Pacini Editore, Pisa. 2011.

Aureli P., Capurso L., Castellazzi A. M., Clerici M., Giovannini M., Morelli L., Poli A., Pregliasco F., Salvini F., Zuccotti G. V.; *Nutrition Foundation of Italy*. Milano, 2010.

Bettache G., Fatma A., Miloud H., and Mebrouk K.; Isolation and identification of lactic acid bacteria from dhan, a traditional butter and their major technological traits. *World Applied Sciences Journal*. 17: 480–488, 2012.

Burgain J., Gaiani C., Linder M. and Scher J.; Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. 104: 467–483. 2011.

Burns P., Patrignani F., Serrazanetti D., Vinderola G. C., Reinheimer J. A., Lanciotti R., Guerzoni M. E.; Probiotic Crescenza Cheese Containing *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* Manufactured with High-Pressure Homogenized Milk. *American Dairy Science Association*. 91: 500-512. 2008.

Capela P., T. K. C. Hay, Shah N.P.; Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze dried yoghurt. *Food Res. Int.* 39(2): 203–211. 2006.

Champagne C.P., Fustier P; Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 18(2): 184–190. 2007.

Chavez B.E., Ledebor A. M.; Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*. 25: 1193–1201. 2007.

Dave R. I. and Shah N.P.; Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurts made from commercial starter culture. *International Dairy Journal*. 731-41. 1997.



Desai K. G. H., Park H.J.; Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*. 23(7): 1361–1394. 2005.

De Voss P., Faas M. M., Spasojevic M., Sikkema J.; Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20: 292–302. 2010.

Ding W.K., Shah N. P.; Effect of various encapsulation materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*. Vol. 74 (2). 2009.

Doyon M. e Labrecque J. A.; Functional Foods: a conceptual definition. *British Food Journal*. 110(11): 1133-1149. 2008.

Drusch S.; Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. *Food Hydrocolloids*. 21: 1223–1228. 2007.

Felfoul I., Jardin J., Gaucheron F., Attia H., Ayadi M. A.; Proteomic profiling of camel and cow milk proteins under heat treatment. *Food Chemistry*. 216 : 161-169. 2017.

Frey R. C., H. S. Hall; Single-core encapsulation. Filmcoating. Microencapsulation of Food Ingredients. Leatherhead International. Limited, P. Vilstrup [ed.]. UK. 83–100. 2004.

Gharasalloui A., Roudaut G., Chambin O., Voilley A., Saurel R.; Application of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food International*. 40: 1107–1121. 2007.

Gibbs B. F., Kermasha S., Alli I., Mulligan C. N; Encapsulation in the food industry: A review. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 50: 213–224. 1999.

Gomes A. C., Buriti A. C. F., Batista H. C. S., Faria F. A. J., Saad I. M. S.; Trends in Food Science & Technology. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. (20) 344-354. 2009.

Gouin S.; Micro-encapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*. (15) 330–347. 2004.

Green B.K., Scheicher L; Pressure Sensitive Record Materials. U. Patent. (2)217-507. Ncr C. 1955.

Griffiths J. C., Abernethy D. R., Schuber S., Williams S. L.; Functional food ingredient quality: Opportunities to improve public health by compendial standardization. *Journal of Functional Foods*. (1)128–130. 2009.

Guerzoni M.E., Vannini L., Chaves-López C., Lanciotti R., Suzzi G., Gianotti A.; Effect of high pressure homogenization on microbial and chemico-physical characteristics of goat cheeses. *Journal of Dairy Science*. (82)851-862. 1999.

Iravani S., Korbekandi H., Mirmohammadi S. V.; *Journal of Food Science Technology*. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. Vol. 52 (8) : 4679-4696. 2015.

Iucci L. Patrignani F., Vallicelli M., Lanciotti R., Maiana Mathara J., Holzapfel W. H., Guerzoni M. E.; Improvement of sensory characteristics of probiotic fermented milks using milk high pressure homogenization treatment. In *Food safety and Food Biotechnology: diversity and global impact*. Bologna. 2006.

Jiang Y., Li Z., Ren Z., Liu S., Zhao L., Sun E., Zhang M., Guo H., Jiang L., Hou C.; Complete genome sequence of *Lactobacillus paracasei* L9, a new probiotic strain with high lactic acid-producing capacity. *Journal of Biotechnology*. 216: 127-128. 2015.

Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H.; The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. (14)737–743. 2004.

Lahteenmaki L., Lampila P., Grunert K.G., Boztug Y., Ueland O., Astrom A., Martinsdottir E.; The impact of health-related claims on the perception of other product attributes. *Food Policy*. (35)230–239. 2010.

Lanciotti R., Chaves-Lopez C., Patrignani F., Papparella A., Guerzoni M. E., Serio A., Suzzi G.; Effects of milk treatment with dynamic high pressure on microbial populations, and lipolytic and proteolytic profiles of Crescenza cheese. *International Journal of Dairy Technology*. (57)19-25. 2004.

Manojlović V. N., Nedović V. A., K. Kailasapathy and N.J. Zuidam; Encapsulation of Probiotics for use in Food Products *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer: Dordrecht, The Netherlands, N.J. Zuidam and V.A. Nedović [eds.]. 269–302. 2009.

Middelberg A. P. J.; Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Adv.* 13(3)491–551. 1995.

Mortazavian A.M., Ehsani M. R., Mousavi S. M., Sohrabvandi S., Reinheimer J. A.; Combined effects of temperature-related variables on the viability of probiotic microorganism in yoghurt. *Australian Journal of Dairy Technology*. (61)248-252. 2006.

Mortazavian A. M., Ehsani M. R., Mousavi S. M., Reinheimer J., Emamdjomeh Z., Sohrabvandi S.; Preliminary investigation on the combined effect of heat treatment

and incubation temperature on the viability of the probiotic microorganism in freshly made yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*. (59)8-11. 2005.

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

Nazzato F., Fratianni F., Nicolaus B., Poli A., Orlando P.; The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. 18 (3)280-5. 2012.

Neviani E. e Mucchetti G.; *Microbiologia e tecnologia lattiero-casearia. Qualità e sicurezza*. 2006.

Neviani E., Giraffa G.; *Formaggi freschi e molli e loro differenziazione: le microflоре lattiche. Atti del Seminario 'La qualità in produzione' (Lodi, 13 marzo 1992)*. *Latte* 18 (7)776-780. 1993.

Ottogalli G.; *Atlante dei formaggi: 3-9; 192-213*. Ulrico Hoepli, Milano, 2001.

Parolin C., Marangoni A., Laghi L., Foschi C., Rogers A., Ñahui Palomino., Calonghi N., Cevenini R., Vitali B.; *Isolation of Vaginal *Lactobacilli* and Characterization of Anti-Candida Activity*. 2015.

Patrignani F., Serrazanetti D. I., Mathara J. M., Siroli L., Gardini F., Holzapfel W. H., Lanciotti R.; Use of homogenisation pressure to improve quality and functionality of probiotic fermented milks containing *Lactobacillus rhamnosus* BFE 5264. *International Journal of Dairy Technology*. (68)1-10. 2015.

Patrignani F., Burns P., Serrazanetti D., Vinderola G., Reinheimer J., Lanciotti R., & Guerzoni M. E.; Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Research*, 7. 2009.

Patrignani F., Iucci L., Lanciotti R., Vallicelli M., Mathara J. M., Holzapfel W. H.; Effect of high-pressure homogenisation, non-fat milk solids, and milk fat on the technological performance of a functional strain for the production of probiotic fermented milks. *Journal of Dairy Science*. (90)4513-4523. 2007.

Paquin P., Lacasse J., Subirade M., Turgeon S.; Continuous process of dynamic high-pressure homogenization for the denaturation of proteins. *US Patent*. (6)511-695. 2003.

Popper L. , Knorr D.; Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technol*. (44)84-89. 1990.

Raduano A.;Caseificio Pascoli 'Formaggi di Famiglia'. Il Vicolo, Cesena, 2014.

Randheera R. D. C. S., Baines S. K. , Adams M. C.; Importance of food in probiotic efficacy. *Food International*. (43)1–7. 2010.

Sirò I., Kápolna E., Kápolna B., & Lugasi A.; Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – A review. *Appetite*. (51)456–467. 2008.

Siroli L., Pratrignani F., Serrazanetti D. I., Parolin C., Polomino R. A. N., Vitali B., Lanciotti R.; Selection of vaginal *Lactobacilli* for their application in dairy products. Research Paper, submitted.

Smokvina T., Wels M., Polka J., Chervaux C., Brisse S., Boekhorst J., Vlieg J. E. T. V., Siezen R. J.; *Lactobacillus paracasei* comparative genomics: towards species pan-genome definition and exploitation of diversity. *PloS One* (8). 2013.

Stefan D., Bahrim G. E., Iordachesci G.; *Microencapsulation of Probiotics*. Taylor & Francis Group, LLC, Romania, 2014.

Szakály Z., Szenté V., Kövér G.; The influence of lifestyle on health behavior and preference for functional foods. *Appetite* 58: 406-413. 2012.

Tabanelli G., Patrignani F., Vinderola G., Reinheimer J. A., Gardini F., Lanciotti R.; Effect of sub-lethal high pressure homogenization treatments on the in vitro functional and biological properties of lactic acid bacteria. *Food Science and Technology*. Vol. 53: 580-586. 2013.

Thiebaud M., Dumay E., Picart L., Guiraud J.P. & Cheftel J.C.; High pressure homogenisation of raw bovine milk. Effects on fat globule size distribution and microbial inactivation. *International Dairy Journal* ,13, 427-439. 2003.

Tripathi M. K., Giri S. K.; Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. (9)225–241. 2014.

Verbeke W.; Functional foods: Consumer willingness to compromise on taste for health? *Food Quality and Preference*. (17)126–131. 2006.

Vernocchi P., Ndagijimana M., Serrazanetti D., Gianotti A., Vallicelli M., Guerzoni E.; Influence of starch addition and dough microstructure on fermentation aroma production by yeasts and lactobacilli. *Food chemistry*. (108)1217-1225. 2008.

Vinderola C. G., Costa G. A., Regenhardt S., Reinheimer J. A.; Influences of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. *International Dairy Journal*. (12)579-589. 2002.

Quek S. Y., Chen Q., Shi J.; *Functional Food Ingredients and Nutraceuticals. Microencapsulation of Food Ingredients for Functional Foods*. Taylor & Francis Group, LLC. 267-318.2016.



*Decreti legislativi utilizzati:*

Codex Alimentarius

Capo I, art.2. D. L. 10.4.54 n. 125

D.L. 15.10.1925 n. 2033

Reg. CE n. 509/2006

Reg. CE 1234/2007

R.D. Del 1929; art. 40 /74