

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÁ DI BOLOGNA**
SEDE DI CESENA

FACOLTÁ DI AGRARIA
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE
ALIMENTARI

Valutazione delle potenzialità dell'alta pressione
di omogeneizzazione per la produzione di formaggi
probiotici

Relazione finale in:

Progettazione igienica e sanificazione

Relatore:

Proff.ssa Rosalba Lanciotti

Presentata da:

Stefano Cavicchi

Correlatrici:

Dott.ssa Giulia Tabanelli

Dott.ssa Francesca Patrignani

SESSIONE II

ANNO ACCADEMICO 2011/2012

Indice

Capitolo 1 - I probiotici	6
1.1 Probiotici: dal passato alle nuove sfide future	7
1.1.1 Cenni storici	7
1.1.2 Definizioni e aspetti regolatori	8
1.1.3 I prodotti probiotici	9
1.1.4 Dinamiche di mercato	12
1.2 La microflora intestinale	12
1.2.1 Le alterazioni dell'ecosistema intestinale	16
1.3 Gli effetti dei probiotici	18
1.4 I probiotici nell'industria	22
Capitolo 2 - Le alte pressioni di omogeneizzazione	24
2.1 Principi di funzionamento del trattamento ad alta pressione di omogeneizzazione	25
2.2 Meccanismi di inattivazione microbica	27
2.2.1 Parametri di processo	27
2.2.2 Parametri fisiologici microbici	29

2.2.3 Caratteristiche del fluido	31
2.3 Effetto delle alte pressioni di omogeneizzazione (HPH) per la produzione di prodotti probiotici	33
Capitolo 3 - Obiettivi	42
Capitolo 4 - Materiali e metodi	46
4.1 Microrganismo oggetto di studio	47
4.2 Caseificazione	47
4.3 Trattamento di omogeneizzazione ad alta pressione	48
4.4 Analisi microbiologica delle caciotte	49
4.5 Valutazione del profilo aromatico	49
4.5.1 Elaborazione dei metabolici volatili	50
4.6 Digestione gastrointestinale simulata	51
4.7 Panel test	52
4.8 Analisi degli acidi grassi	52
4.8.1 Estrazione	53
4.8.2 Frazionamento	53
4.8.3 Esterificazione e derivatizzazione	53

4.8.4 Analisi gas-cromatografica	54
4.9 Valutazione della proteolisi	54
4.9.1 Estrazione	54
4.9.2 Dosaggio delle proteine	55
4.9.3 Separazione SDS-PAGE	55
4.10 Analisi del contenuto di amine biogene	55
4.10.1 Estrazione delle amine	56
4.10.2 Derivatizzazione	56
4.10.3 HPLC e condizioni cromatografiche	56
4.10.4 Preparazione degli eluenti per HPLC	59
4.11 Texture profile analysis (TPA)	59
4.12 Misurazione del pH e aw	59
Capitolo 5 - Risultati	60
5.1 Valutazione della vitalità di <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> e <i>L. paracasei</i> A13 e della qualità microbiologica nelle tre tipologie di prodotto in rapporto al tempo di maturazione	60
5.2 Parametri chimico-fisici delle tre tipologie di prodotto in rapporto al tempo di maturazione	62
5.3 Resistenza alla digestione gastrointestinale simulata	64

5.4 Analisi degli acidi grassi	65
5.5 Valutazione della proteolisi	71
5.6 Analisi molecole volatili e panel test	72
5.7 Analisi del contenuto di amine biogene	80
Capitolo 6 – conclusioni	82
Bibliografia	

Capitolo 1

I probiotici

1.1 Probiotici dal passato alle nuove sfide future

1.1.1 Cenni storici

Le origini dei prodotti lattiero-caseari risalgono agli albori della civilizzazione e sono stati menzionati già nella Bibbia e nei libri sacri dell'Induismo (Hosono, 1992).

Questi prodotti, molti dei quali vengono tuttora consumati largamente, sono stati usati spesso in modo terapeutico prima che fosse scoperta l'esistenza e il ruolo dei batteri.

Solo agli inizi del ventesimo secolo, specifici batteri sono stati riconosciuti come benefici. Infatti, all'inizio del ventesimo secolo, Elie Metchnikoff (1907), il vincitore del premio Nobel per la scoperta della fagocitosi e direttore dell'Istituto Pasteur, ha proposto una spiegazione scientifica per gli effetti benefici dei batteri nello yogurt. In "The Prolongation of Life", pubblicato nel 1907, egli ipotizzò che i batteri coinvolti nella fermentazione dello yogurt, *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sopprimessero le fermentazioni di tipo putrefattivo della flora intestinale e che l'assunzione dello yogurt giocasse un ruolo importante nel mantenimento della salute. Infatti egli attribuì la longevità dei Bulgari al loro consumo di yogurt contenenti specie di *Lactobacillus*.

Cohendy (1906) somministrò latte acidificato da *L. delbrueckii ssp bulgaricus* (bacillo bulgaro come venne appunto chiamato allora) a soggetti che presentavano una fermentazione intestinale di tipo putrefattivo durante una dieta mista e trovò che i prodotti della putrefazione diminuirono. In aggiunta, egli scoprì che si era formata una flora in predominanza Gram-positiva e che il bacillo persisteva nelle feci anche 8-12 giorni dopo l'inizio del trattamento.

Rettger e Cheplin (1922) documentarono che il latte addizionato di *Lactobacillus acidophilus* aveva effetti terapeutici, in particolare, un effetto di assestamento nella digestione. La loro ipotesi si basava sull'idea che la colonizzazione e lo sviluppo nell'intestino da parte dei batteri somministrati fosse

essenziale per la loro efficacia, e quindi sostenevano la necessità dell'utilizzo di isolati intestinali. Il loro lavoro stimolò l'interesse commerciale in America, che portò alla produzione sia di latte semplicemente addizionato di *L. acidophilus*, che di latte fermentato dallo stesso batterio.

In Giappone, agli inizi del 1930, Shirota focalizzò la sua ricerca su ceppi selettivi di batteri intestinali che potevano sopravvivere al passaggio attraverso l'intestino e sull'uso di questi ceppi per la produzione di latti fermentati da distribuire nella sua clinica.

Gordon et al. (1957) riportarono nel "Lancet" che una terapia di successo basata sull'uso di lattobacilli dipendeva da certi criteri: era essenziale usare un organismo che fosse un normale abitante dell'intestino come *L. acidophilus*, che fosse non patogeno, capace di colonizzare l'intestino e che l'assunzione costante di un elevato numero di cellule vitali (10^7 - 10^9 UFC/g) era necessaria per l'attività di una flora benefica.

Negli anni '50, gli yogurt venivano spesso usati per ristabilire l'equilibrio della flora intestinale disturbata da antibiotici e per alleviare o prevenire condizioni patologiche, come diarrea, stitichezza, dispepsia, cistiti, coliti delle mucose, coliti croniche ulcerative, dermatiti (Hawley e Shepherd, 1959)

1.1.2 Definizioni e aspetti regolatori

Per batteri "probiotici", si intendono quei batteri capaci di svolgere, una volta arrivati nell'intestino, azioni di regolazione dei vari processi che si svolgono in questo organo (digestione, difesa immunitaria, difesa batteriologica ecc.) e, più in generale, un'azione di tutela del benessere. Infatti la parola probiotico deriva dal greco "pro bios" e significa "per la vita"; questo termine è stato coniato più di 50 anni fa e tale definizione si è notevolmente evoluta nel tempo.

Lilly e Stillwell (1965) per primi usarono la parola probiotico per descrivere sostanze secrete da un protozoo per stimolare la crescita di un altro. Parker (1974) usò questa parola per descrivere un supplemento per mangimi animali che

includesse organismi e sostanze che avevano effetti benefici sull'animale stesso contribuendo all'equilibrio della sua flora intestinale. La definizione di Parker includeva anche antibiotici usati per promuovere la crescita di animali domestici.

Fuller (1989) definì un probiotico come un alimento contenente microrganismi vivi, del quale beneficia l'animale ospite migliorando l'equilibrio microbico intestinale.

Huis in't Veld e Havenaar (1991) definirono i probiotici come una coltura di microrganismi vivi, i quali, se somministrati all'uomo o agli animali, influiscono in modo benefico sull'ospite migliorando le proprietà della microflora originaria.

Sperti (1992) usò la parola probiotico per descrivere estratti di tessuto che stimolavano la crescita microbica.

Recentemente un gruppo di scienziati europei (1998) ha suggerito che i probiotici usati nell'alimentazione umana possono essere definiti come cellule microbiche vitali presenti in prodotti alimentari che hanno effetti benefici sulla salute.

La FAO, invece, in un documento pubblicato nel 2001 (Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria, <http://www.fao.org>) definisce probiotici i microorganismi vivi che, quando consumati in quantità adeguata come parte di un alimento, conferiscono benessere all'ospite.

1.1.3 I prodotti probiotici

Negli ultimi decenni l'affermazione del concetto di prevenzione e la diffusione della conoscenza scientifica, hanno modificato l'atteggiamento dei pazienti verso la propria salute, rendendoli più consapevoli e partecipi delle scelte che la riguardano. In particolare è ormai noto a tutti come l'ambiente che ci circonda, l'alimentazione, lo stile di vita insieme ai progressi della moderna medicina condizionino in modo determinante la salute generale e che fattori

ambientali e sociali, come l'aumento dell'età media della popolazione, sono strettamente associati alla diffusione di una serie di disturbi e malattie causate dalla carenza o dallo scompenso della microflora endogena. Rientrano in questo gruppo le infezioni del tratto gastrointestinale, la stitichezza, disturbi intestinali di vario tipo (colon irritabile, colite ulcerosa), le allergie alimentari, la diarrea associata al consumo di antibiotici, le malattie cardiovascolari e alcuni tipi di tumore. A tutto ciò bisogna aggiungere l'aumento della resistenza di numerosi ceppi batterici, conseguente all'uso indiscriminato e non sempre necessario degli antibiotici. Per risolvere questi problemi la comunità scientifica internazionale, che ha cominciato da alcuni anni a valutare strategie alternative di controllo della salute, prendendo in considerazione le proprietà curative e preventive dei batteri probiotici.

In realtà le proprietà benefiche dei microrganismi contenuti negli alimenti fermentati, soprattutto derivati del latte, appartengono alla conoscenza popolare da secoli, ma la prima osservazione scientifica in proposito risale al premio Nobel Elie Mechnikoff, che nel 1907 intuì che l'assunzione di batteri non patogeni con lo yogurt aveva un effetto positivo sulla flora batterica endogena e sulla funzionalità dell'apparato gastrointestinale. Tuttavia solo molto più recentemente, grazie a ricerche microbiologiche, epidemiologiche e cliniche è stato stabilito che non tutti i microrganismi presenti negli alimenti fermentati sono realmente efficaci ed è stata fatta luce sulla sostanziale differenza tra i ceppi biologicamente attivi e quelli inefficaci perché distrutti nello stomaco, indipendentemente dal genere e dalla specie.

Grazie alla percezione delle loro proprietà funzionali, i batteri probiotici sono stati sempre più inclusi in formulazioni alimentari, in special modo in yogurt e latti fermentati nel corso degli ultimi due decenni. I microrganismi probiotici usati più comunemente sono batteri lattici appartenenti al genere dei lattobacilli o dei bifidobatteri ma possono essere anche utilizzati altri microrganismi, come ad esempio il lievito *Saccharomyces boulardii* (Johannsson et al., 1993).

Perché si possano evidenziare effetti benefici sugli utilizzatori di questi microrganismi è necessario il consumo continuato di prodotti probiotici con una concentrazione microbica di almeno 10^8 UFC/g. Al giorno d'oggi è possibile

produrre prodotti fermentati con un gusto eccellente e con un'elevata concentrazione di batteri probiotici, la quale è garantita nel corso del periodo di shelf-life.

Nel corso degli anni la composizione e l'etichettatura di prodotti probiotici è stata spesso criticata (Reid, 1999). Per creare e mantenere una certa sicurezza nel consumatore è importante che le etichette dei prodotti contengano informazioni chiare, come i tipi di ceppi probiotici contenuti e la garanzia sul numero degli organismi vitali presenti nel prodotto. Il numero di microrganismi vitali presente nel prodotto è, infatti, molto importante perché al di sotto di certi livelli gli effetti benefici non possono essere raggiunti. Per questo l'Italia ha fissato una concentrazione minima di 10^6 UFC/g che deve mantenersi nel corso della shelf-life del prodotto. In altri paesi la concentrazione minima è fissata a valori più alti, come per esempio il Portogallo che prevede almeno 10^8 UFC/g al momento dell'assunzione del prodotto (International Dairy Federation, 1988).

La vitalità e la stabilità dei batteri probiotici rappresenta una prerogativa sia tecnologica che di marketing per i produttori di alimenti probiotici. Infatti questi alimenti devono contenere specifici ceppi batterici a livelli vitali prestabiliti che devono poi essere mantenuti durante tutta la shelf-life. Prima che un ceppo probiotico giunga al consumatore, deve poter essere processato in condizioni industriali, mantenere la sua vitalità e la sua funzionalità durante il processo, lo stoccaggio refrigerato e la sua permanenza all'interno della matrice alimentare che funge da carrier. Inoltre esso deve poter essere incorporato nell'alimento in questione senza produrre off-flavours o cambiamenti di texture. In definitiva il ceppo deve mantenere la sua vitalità ma non crescere e svilupparsi nel prodotto.

Per quanto riguarda il futuro del mercato degli alimenti contenenti batteri probiotici, le nuove aree di ricerca e sviluppo riguardano la ricerca di nuove categorie di prodotti e, di conseguenza, l'impiego di nuove materie prime al di fuori del settore lattiero caseario. Inoltre, poiché la richiesta di alimenti funzionali contenenti batteri probiotici sta crescendo, si dovranno metter a punto nuovi processi tecnologici e nuove formulazioni finalizzati a nuovi ceppi selezionati per le loro proprietà funzionali. In definitiva le sfide future della ricerca nel campo dei

probiotici consisterà nell'innovazione e nella ricerca di soluzioni per la stabilità, la vitalità e il mantenimento della funzionalità dei ceppi in nuove matrici alimentari, sempre mantenendo un basso costo di produzione. (Mattila-Sandholm et al., 2001).

1.1.4 Dinamiche di mercato

La commercializzazione di prodotti contenenti microrganismi probiotici ha giocato un ruolo importante nell'aumento della consapevolezza del consumatore riguardo al ruolo che la flora intestinale ha sulla salute e nell'informare sui benefici potenziali di una terapia di probiotici.

Il mercato europeo di yogurt e lattici funzionali ha subito una crescita significativa negli ultimi anni, ma è ancora molto al di sotto di quello giapponese (Anon, 1999).

In generale, la conoscenza dei consumatori riguardo i benefici potenziali di prodotti contenenti batteri probiotici vitali è minima, particolarmente in paesi che hanno una ridotta tradizione di prodotti lattiero-caseari acidificati. Ci sono molte barriere nella comunicazione di messaggi riguardanti probiotici ed il ruolo che gioca la dieta nella modulazione della flora intestinale. Comunque, in paesi dove sono stati pianificati programmi educativi tra i consumatori e i professionisti della salute, il grado di consapevolezza e/o conoscenza è aumentato (Shortt, 2000).

1.2 La microflora intestinale

La colonizzazione microbica dell'intestino inizia subito dopo la nascita (Groenlund et al., 2000). La microflora del neonato deriva direttamente dalla microflora intestinale materna e, nel caso in cui il neonato venga allattato dalla madre, la sua microflora sarà composta prevalentemente da specifici ceppi di *Bifidobacterium*. Se, invece, al neonato viene somministrato latte in polvere, la sua microflora sarà più complessa ed assomiglierà di più a quella adulta. I batteri anaerobi che predominano nella flora intestinale dalla nascita fino in tarda età

appartengono al genere *Bifidobacterium*. Comunque, il numero dei bifidi diminuisce nel corso degli anni (Ouweland et al., 2001).

L'instaurarsi di una normale microflora fornisce all'ospite il contatto più importante con l'ambiente ed una barriera verso componenti nocivi della dieta, ma anche verso batteri patogeni.

La complessità di questa microflora e il complesso delle sue relazioni con l'ospite sono alla base di una buona funzionalità intestinale. Solo alla fine del secolo scorso è divenuto chiaro che la microflora intestinale ha diverse funzioni che includono funzioni metaboliche, trofiche e protettive (Guarner et al., 2003).

La funzione metabolica più rilevante è costituita dalla digestione (fermentazione) dei carboidrati non digeribili dall'uomo (cellulosa, emicellulosa, pectine, gomme, amido non digeribile) ad opera degli enzimi batterici con la conseguente produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA) e gas (H_2 , CO_2 , metano, idrogeno solforato). Gli SCFA sono fonte di energia per i batteri, per i colonociti e, una volta assorbiti, per le cellule somatiche; intervengono poi nel metabolismo degli zuccheri migliorando la sensibilità all'insulina, acidificano l'ambiente intestinale impedendo la proliferazione di germi patogeni, aumentano il flusso ematico e la motilità intestinale e favoriscono il riassorbimento di acqua e di ioni. La digestione di peptidi e proteine (putrefazione), costituiti da elastina, collagene alimentare, enzimi pancreatici, mucina, cellule epiteliali sfaldate e batteri lisati porta anch'essa alla produzione di SCFA ma anche di sostanze potenzialmente tossiche, quali ammoniaca, amine, fenoli, tioli, indoli e gas. La fermentazione avviene essenzialmente nel cieco e nel colon ascendente dove l'ambiente è più acido in quanto prevale la flora saccarolitica a rapida crescita. La putrefazione invece è prevalente nel colon distale dove la flora è più statica e il pH è più vicino alla neutralità. Un'altra attività metabolica dei batteri intestinali è la produzione di vitamine (acido pantotenico, biotina, piridossina, riboflavina) di cui però non è noto il reale utilizzo da parte del nostro organismo.

La funzione trofica della microflora intestinale si esplica attraverso il controllo della proliferazione e della differenziazione delle cellule epiteliali (ad opera dei SCFA) ed attraverso la maturazione e la stimolazione del sistema

immunitario intestinale (gut associated lymphoid tissue, GALT – circa il 25% della mucosa intestinale). Molti studi hanno evidenziato la complessa interazione tra la flora batterica ed il GALT che è di fondamentale importanza, già nelle fasi precoci della vita, per lo sviluppo dei nostri sistemi immunoregolatori. Infine le funzioni protettive riguardano l'effetto fisico di “barriera” della popolazione intestinale che impedisce l'adesione e la colonizzazione da parte di specie patogene. I meccanismi di protezione possono comprendere il legame competitivo con recettori delle cellule epiteliali intestinali e la competizione nell'utilizzo di substrati (space and food), la produzione di sostanze antimicrobiche (batteriocine, ammonio, H₂O₂), l'abbassamento del pH luminale attraverso la produzione di SCFA.

La funzione protettiva si esplica anche attraverso l'immunomodulazione con aumento della risposta anticorpale specifica e la regolazione della produzione di citochine pro- e anti-infiammatorie. L'immuno-sorveglianza controlla le infezioni e l'immuno-tolleranza impedisce lo sviluppo di allergie (MacDonald et al., 2005).

I batteri sono distribuiti in tutto l'intestino, ma la maggiore concentrazione di microbi e attività metaboliche si possono trovare nell'intestino crasso. E' stato dimostrato che la bocca ospita una microflora complessa formata da anaerobi stretti e facoltativi, come gli streptococchi, bacteroides, lattobacilli e lieviti e questa microflora è influenzata molto da fattori nutrizionali ed ambientali (Benno e Mitsuoka, 1986). Lo stomaco, il duodeno ed il digiuno hanno una microflora composta da 10⁵ UFC/g. Dall'ileo in poi la concentrazione batterica aumenta fino ad arrivare a 10¹¹ UFC/g nel colon. E' stato stimato che nella flora intestinale umana esistono 500 specie microbiche differenti. I batteri che vengono trovati comunemente nelle feci appartengono ai generi *Bacteroides*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Peptococcus*, *Enterobacter* e *Veillonella*.

Genere microbico	Log UFC/g
<i>Bacteroides</i>	9.2-13.5
<i>Eubacteria</i>	5.0-13.3
<i>Bifidobacteria</i>	4.9-13.4
<i>Clostridia</i>	3.3-13.1
<i>Lactobacilli</i>	3.6-12.5
<i>Ruminococci</i>	4.6-12.8
<i>Peptostreptococci</i>	3.8-12.6
<i>Peptococci</i>	5.1-12.9
<i>Streptococci (anaerobi)</i>	7.0-12.3
<i>Methanobrevibacter</i>	7.0-10.3
<i>Desulfovibrios</i>	5.2-10.9

Tabella 1.1: I microrganismi anaerobi maggiormente presenti nel colon.

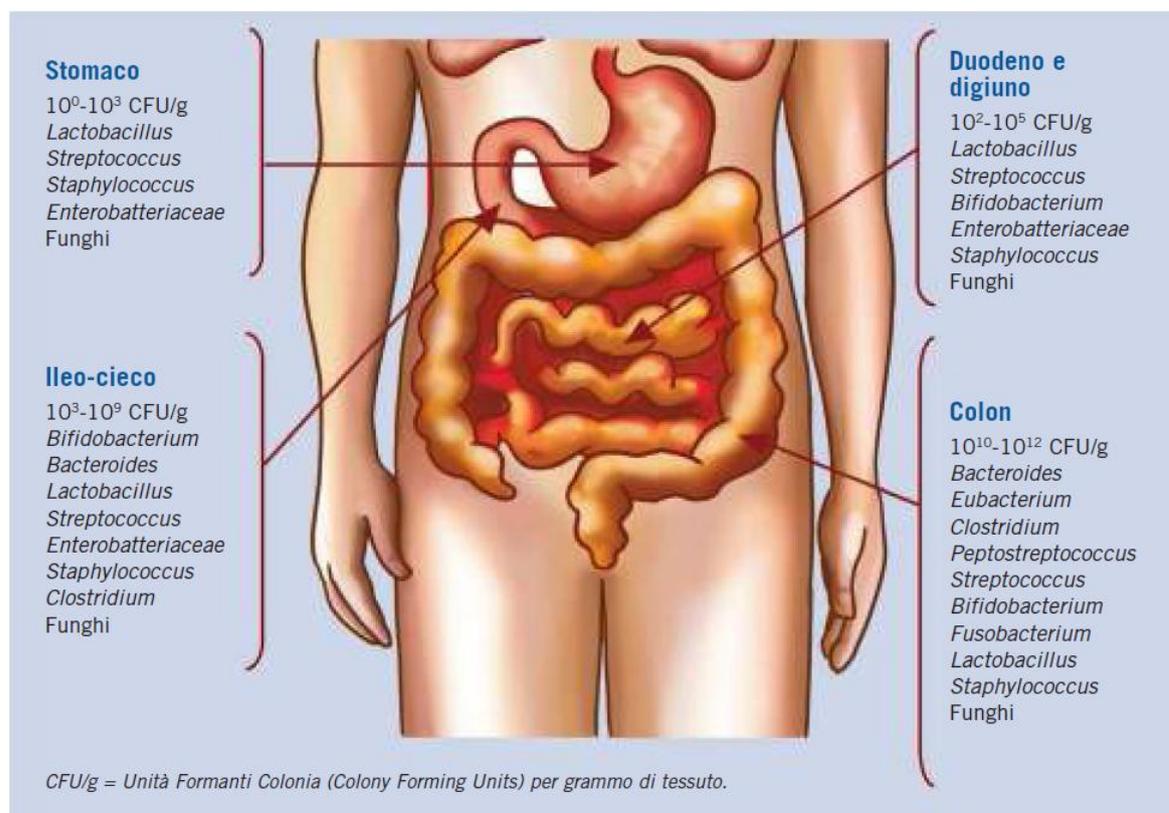


Figura 1.1: I batteri del tratto gastro-enterico.

1.2.1 Le alterazioni dell'ecosistema intestinale

Il mantenimento dell'ecosistema intestinale è basato sulla integrità e sulla collaborazione stabile tra la microflora, il sistema immunitario e la barriera costituita dalla mucosa intestinale. Qualsiasi evento che intervenga ad alterare ognuna di queste componenti crea uno squilibrio con il conseguente instaurarsi di patologie locali e/o sistemiche.

Di fondamentale importanza è l'equilibrio tra le diverse specie della flora batterica in cui sono presenti batteri ad azione nociva (*Pseudomonas aeruginosa*, i batteri appartenenti ai generi *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Veillonella*), batteri ad azione protettiva che diventano nocivi in particolari condizioni (*Escherichia coli*, *enterococchi*, *streptococchi*, *batteroidi*) e batteri ad azione protettiva (appartenenti ai generi *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*) (Gibson et al., 1995). Un'alterazione della microecologia intestinale, dovuta a molte malattie infiammatorie riguardanti l'intestino, è un fenomeno molto comune. Quando viene disturbata l'interazione ospite-microrganismo, possono intervenire i batteri residenti ed indurre loro una risposta immunologica (Salminen et al., 1995). Duchmann et al. (1995) hanno dimostrato che individui sani tollerano la loro microflora, e che questa tolleranza diminuisce, invece, in pazienti che hanno l'intestino infiammato.

La microflora originaria può essere classificata come potenzialmente pericolosa o come promotrice della salute. I ceppi con proprietà benefiche includono i bifidobatteri ed i lattobacilli, i quali sono predominanti nella microflora di bambini sani (He et al., 2001).

I ceppi patogeni sono caratterizzati dalla capacità di produrre tossine, possono essere invasivi e produrre sostanze ad azione cancerogena; in condizioni di salute la loro crescita e le loro attività metaboliche vengono inibite dalla flora protettiva.

In letteratura sono riportate sempre più evidenze che indicano l'esistenza di una relazione tra alimentazione e incidenza di alcune tipologie di cancro, in particolare al colon. Alcuni studi condotti su animali modello hanno osservato

come i batteri appartenenti ai generi *Bacteroides* e *Clostridium* possono contribuire ad aumentare l'incidenza e la crescita dei tumori del colon, mentre lattobacilli e bifidobatteri, al contrario, sembrano prevenire la tumorigenesi (Capurso et al., 2006).

La normalizzazione della microflora originaria da parte di ceppi specifici della microflora intestinale sana è alla base di una terapia probiotica. L'introduzione orale di probiotici può influire sulla diminuzione di una elevata permeabilità intestinale anormale e su un'alterazione della microecologia intestinale, aumentando le barriere immunologiche dell'intestino e alleviando le infiammazioni intestinali.

1.3 Gli effetti dei probiotici

I microrganismi probiotici vengono visti come un'importante integrazione al trattamento di molte malattie (infiammazioni dell'intestino, allergie alimentari, terapie di reidratazione orale, cancro alla vescica, infezioni urogenitali, ecc.) e i risultati sono promettenti (Shortt, 1999). Esiste un'ampia evidenza scientifica, derivante da diversi studi, sul fatto che l'ingestione di microrganismi probiotici (e in particolare di batteri lattici e bifidobatteri) possa alleviare o prevenire molti disturbi come l'intolleranza al lattosio, diarrea e disturbi intestinali (Ouweland et al., 2002a). I probiotici, infatti, interagiscono con il sistema gastrointestinale, che con i suoi 200 m² di superficie totale (150 volte la superficie della pelle, paragonabile alla grandezza di un campo da tennis) rappresenta un'enorme area di interattività tra l'interno e l'esterno dell'organismo umano.

L'intestino, inoltre, è sede di funzionalità fondamentali per la salute umana grazie al bilanciamento dell'interazione tra gli antigeni alimentari, antigeni batterici e l'intero organismo: tra queste la regolazione della tolleranza (il sistema immunitario non reagisce a tutto ciò che non è riconosciuto come "self", sicuro) e l'azione di contrasto nei confronti della traslocazione (meccanismo per cui batteri endoluminali invadono e colonizzano linfonodi intestinali e raggiungono quindi

per via sistemica altri organi come la vescica, il fegato, il cuore, ecc.). È noto come disfunzioni a questo livello possano determinare una serie di patologie gastrointestinali come alterazioni del transito, stipsi o diarrea, meteorismo e flogosi mucosa, e/o sistemiche come le alterazioni dell'immunità sia in senso autoimmune, sia come una diminuita difesa verso le infezioni causate da agenti esogeni. I sintomi di queste disfunzioni possono determinare una rilevante e prolungata diminuzione della qualità della vita.

Con il progredire delle ricerche e delle metodologie di indagine, risulta sempre più evidente come i singoli ceppi probiotici abbiano proprietà differenti e interagiscano quindi con l'organismo umano in modo diverso. Sicuramente ogni ceppo è in grado di interagire con il microbiota e con le cellule intestinali, innescando molteplici effetti sui numerosi processi che avvengono nell'intestino (digestione, assorbimento dei nutrienti, protezione, attivazione del sistema immunitario).

E' quindi fondamentale sottolineare come le proprietà probiotiche siano caratteristiche del singolo ceppo studiato e non possano essere estese ad altri individui batterici, anche se appartenenti alla stessa specie.

I probiotici possono esercitare diversi benefici che possono contribuire a mantenere efficiente l'ecosistema intestinale. In questo modo i probiotici rappresentano uno strumento utile per ostacolare la formazione di disordini e/o vere e proprie patologie legate a questo organo.

Tra gli effetti provati con un'adeguata documentazione scientifica possiamo elencare:

- Inibizione della crescita di batteri patogeni: grazie alla riduzione del pH luminale, alla possibile produzione di batteriocine, alla resistenza alla colonizzazione per l'esclusione competitiva e il blocco dell'adesione epiteliale;

- Incremento dell'effetto barriera: grazie alla produzione di acidi grassi a catena corta (SCFA), all'aumento della produzione di muco, allo stimolo della produzione di zoludina (componente delle tight junctions), alla regolazione della permeabilità mucosa alla competizione con i siti di adesione dei patogeni e con i recettori delle tossine;

- Riduzione dei sintomi da intolleranza al lattosio (β -galattosidasi);
- Riduzione dell'eczema atopico nei primi mesi di vita (GG, Bb12);
- Prevenzione della diarrea da rotavirus (L. acid. Lb1, Bb12, GG);
- Prevenzione e cura della diarrea da antibiotici;
- Diminuzione della ricomparsa di tumori superficiali della vescica (Ohashi et al. (2000) hanno condotto uno studio per esaminare gli effetti dell'assunzione orale di Lactobacillus casei riguardo l'incidenza di cancro alla vescica e i risultati hanno evidenziato che l'assunzione abituale di L. casei riduce l'incidenza di questo tipo di tumore).

- Riduzione dell'attività degli enzimi microbici intestinali dannosi dovuta alla massa fecale

- Diminuzione della mutagenicità
- Miglioramento del sistema immunitario: grazie all'incremento di IL-10 e TGF- β , della secrezione di IgA e decremento del TNF.

Tra le presunte attività probiotiche che ancora necessitano di ulteriori studi ed approfondimenti possiamo invece elencare:

- l'attivazione di macrofagi;
- l'aumento delle citochinine non infiammatorie;
- prevenzione di tumori al colon
- cura delle infezioni di Helicobacter pilori (ad esempio uno studio sulla popolazione europea ha evidenziato che un'alta assunzione di latte fermentato è associata ad una diminuzione del rischio di contrarre un'ulcera (Elmstahl, 1999)).

- riduzione della colesterolemia
- Prevenzione delle affezioni delle prime vie respiratorie (riduzione della colonizzazione nasale da parte di St.aureus e Str. pneumonite)

Inoltre, i probiotici possono conferire benefici nella profilassi di infezioni in neonati prematuri o in individui HIV positivi o comunque immunodeficienti. Questi gruppi, però, possono essere più vulnerabili verso effetti secondari od indesiderati imputabili alla presenza di batteri probiotici. La sicurezza dei probiotici, in relazione a questi consumatori, costituisce quindi un rischio

potenziale ed è importante approfondire tutti gli aspetti metabolici dei ceppi impiegati che possono avere ricadute su individui esposti.

Riguardo questo problema, la manipolazione genetica di ceppi probiotici può rappresentare una soluzione. Per esempio, mentre alcuni lattobacilli probiotici non producono D-lattato, *L. johnsonii* La1 fermenta lattosio a D- ed L-lattato in un rapporto di 60:40. Il D-lattato, che non è metabolizzato dall'uomo, può contribuire ad un'acidosi e ad un' encefalopatia in pazienti che soffrono della sindrome dell'intestino corto o di disfunzioni intestinali. Una variante del La1 che non produce D-lattato può essere perciò benefico verso specifiche classi di consumatori (Mollet, 1999).

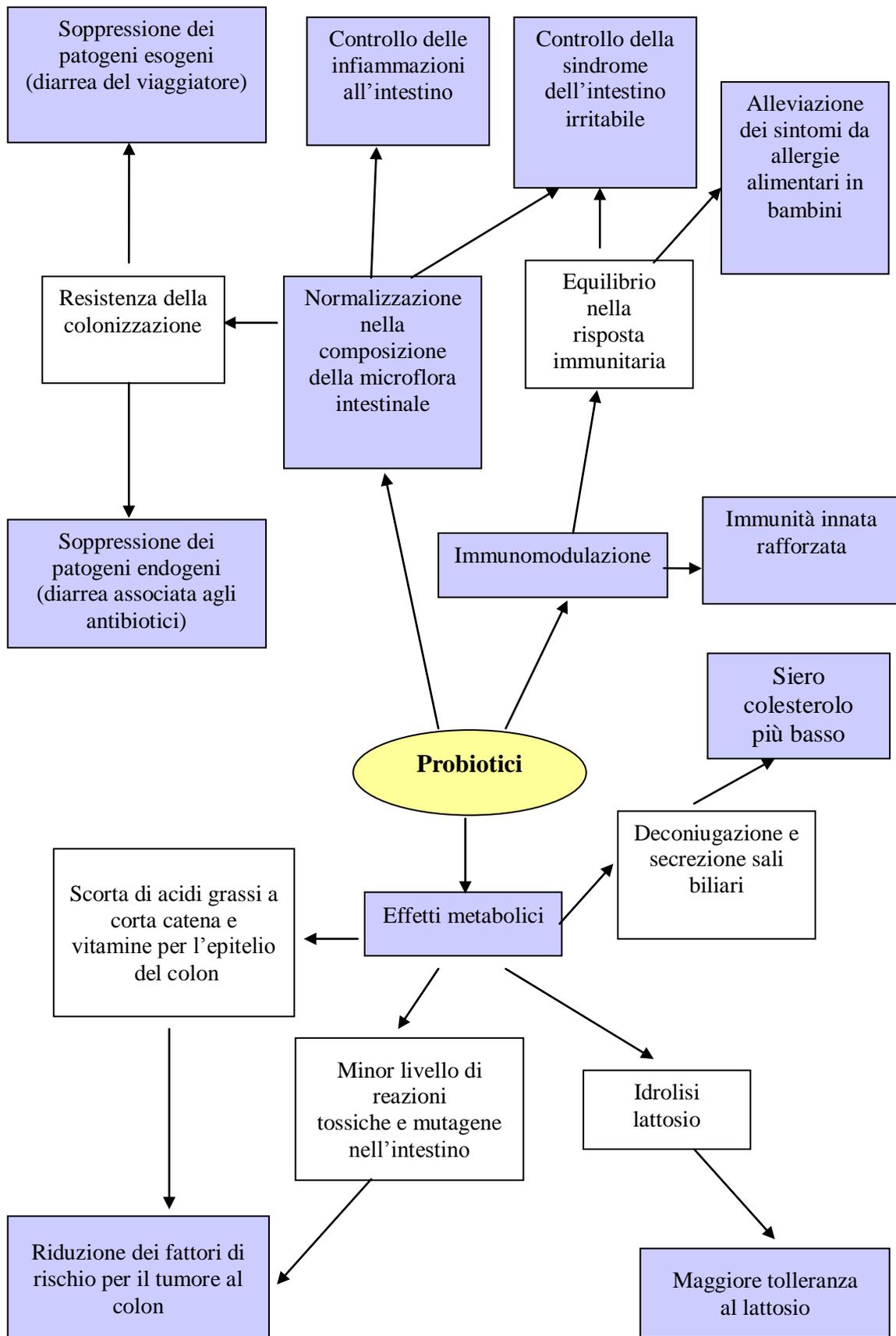


Figura 1.2: Benefici ottenibili con l'assunzione di probiotici.

1.4 I probiotici nell'industria

I microorganismi probiotici possono essere usati anche a livello industriale, in particolare nell'industria lattiero-casearia, come starter o costarter di fermentazione, ad esempio per la produzione di latti fermentati e formaggi a breve stagionatura. Infatti alcuni ceppi selezionati possono migliorare la texture e le caratteristiche organolettiche del prodotto; inoltre in un prodotto fermentato esclusivamente dal probiotico la vitalità dei ceppi sarà maggiore rispetto ai prodotti in cui i ceppi probiotici vengono aggiunti post fermentazione a livelli di 10^6 - 10^8 UFC/g.

Inoltre molti prodotti fermentati tradizionali, come ad esempio formaggi o latti fermentati, sono prodotti utilizzando una moltitudine di ceppi, tra cui alcuni mostrano ottime proprietà probiotiche, grazie a questa moltitudine di ceppi si riesce a conferire al prodotto un sapore equilibrato, cosa molto importante in quanto la maggior parte dei ceppi probiotici utilizzati nell'industria conferiscono delle caratteristiche organolettiche non molto gradite al consumatore in quanto, per la loro elevata produzione di acidi organici, acidificano molto il prodotto.

Perciò sarebbe molto interessante studiare l'applicazione di queste colture starter tradizionali, in modo da conferire al prodotto probiotico migliori caratteristiche organolettiche, e una maggior vitalità dei ceppi probiotici, quindi una maggior shelf-life. Altra cosa interessante è il fatto che molto spesso le colture starter tradizionali, composte da una moltitudine di ceppi, velocizzano la fermentazione e la maturazione del prodotto, questo grazie alla cooperazione dei ceppi durante i processi fermentativi.

Capitolo 2

Le alte pressioni di omogeneizzazione

2.1 Principi di funzionamento del trattamento ad alta pressione di omogeneizzazione.

Il trattamento ad alte pressioni di omogeneizzazione è una tecnologia continua o semi-continua basata sull'applicazione, ad alimenti fluidi o comunque fluidificabili, di pressioni comprese tra 60 e 400 MPa. Il tempo di applicazione della pressione è di pochi millisecondi (Paquin et al., 2003). L'omogeneizzatore è composto prevalentemente da una pompa e da una valvola omogeneizzante. La pompa ha lo scopo di forzare il fluido verso la valvola dove ha luogo l'omogeneizzazione (Middelberg, 1995). In tale valvola il fluido viene spinto sotto pressione attraverso uno stretto orifizio che si viene a creare tra la valvola e la sua sede (per regolare la pressione è sufficiente variare la distanza tra questi due elementi) (Figura 2.1).

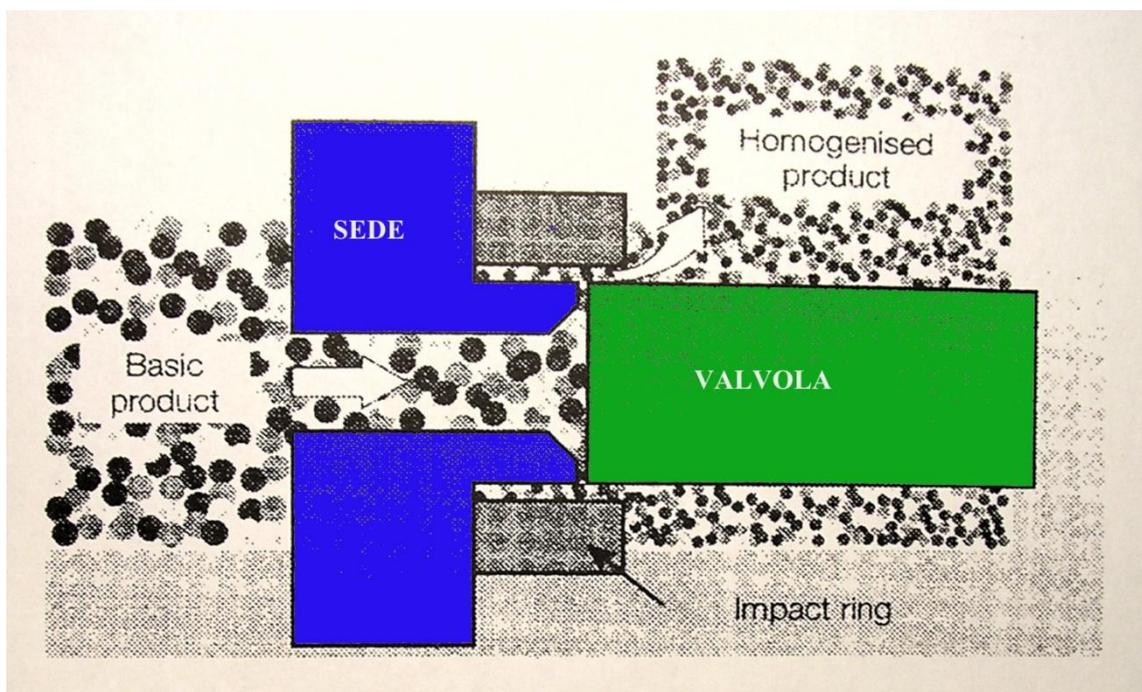


Figura 2.1: Percorso del fluido attraverso una semplice valvola omogeneizzante (Diels e Michielis, 2006).

Il fluido dopo aver attraversato l'orifizio sbatte ad alta velocità contro l'anello di impatto (Middelberg, 1995) e tale urto porta alla micronizzazione delle particelle (Figura 2.2). Infine, il fluido esce dall'omogeneizzatore a bassa velocità e a pressione atmosferica e normalmente viene raffreddato per minimizzare il danno termico subito causato dalla frizione e dovuto all'alta velocità che porta ad un innalzamento della temperatura di 2-2.5 °C ogni 10 MPa di aumento della pressione (Engler, 1990; Popper e Knorr, 1990). Tuttavia, questo innalzamento della temperatura nel corso del processo è un parametro chiave per la modificazione dell'attività enzimatica e l'inattivazione microbica (Hayes et al., 2005). Durante tale trattamento si verificano fenomeni di cavitazione associati alla formazione di bolle di gas nella massa del fluido; tali bolle, collassando, trasmettono severe forze localizzate alle particelle in sospensione incluse le cellule microbiche.



Figura 2.2: Prodotto prima e dopo l'omogeneizzazione.

Questa applicazione permette di ottenere una serie di effetti sul prodotto trattato, che variano a seconda della matrice considerata, ma che possono essere riassunti in:

- inattivazione di microrganismi, in quanto tale tecnologia induce cambiamenti a livello morfologico, di membrana e di parete nei microrganismi presenti (Diels e Michiels, 2006; Patrignani et al., 2009; Patrignani et al., 2010);
- cambiamenti strutturali e conformazionali a livello di macromolecole caratterizzanti il sistema (proteine-lipidi-polisaccaridi);
- modificazione dell'attività di enzimi presenti nel substrato trattato, attraverso attivazione o il cambiamento della conformazione del substrato

enzimatico o del sito attivo dell'enzima, anche operando a temperature di 40-50 °C (Thiembaud et al., 2003, Iucci et al., 2007);

- aumento della stabilità nel tempo del prodotto omogeneizzato;
- variazione della viscosità, correlato ad un aumento di stabilità (Lanciotti et al., 2004; Patrignani et al., 2007);
- esaltazione delle caratteristiche organolettiche del prodotto trattato, in seguito ad una maggiore micronizzazione delle particelle (Guerzoni et al., 1999).

2.2 Meccanismi di inattivazione microbica

L'inattivazione microbica attraverso l'impiego di alte pressioni di omogeneizzazione è stata studiata sia in sistemi modello che in alimenti reali come il latte, il gelato e i succhi di frutta (Feijoo et al., 1997; Guerzoni et al., 1999; Jean et al., 2001; Kheadr et al., 2002; Vachon et al., 2002; Thiebaud et al., 2003; Donsì 2009; Diels et al., 2005; Patrignani et al., 2009, 2010). In ogni caso, grandi differenze sulla disattivazione sono state trovate dai diversi autori. Una spiegazione plausibile può essere data tenendo conto dei diversi mezzi colturali utilizzati, delle differenti condizioni operative e anche dei diversi modelli di omogeneizzatore.

In generale, i parametri che influenzano l'inattivazione microbica possono essere divisi in tre gruppi differenti: *parametri di processo*, *parametri fisiologici microbici* e *parametri collegati alle caratteristiche del fluido*.

2.2.1 Parametri di processo

- ***Pressione***: in generale l'aumento della pressione di processo porta ad un incremento nell'inattivazione microbica, anche se a questo riguardo sono stati riportati dati differenti (Kelemen e Sharpe, 1979; Harrison et al., 1991; Baldwin e Robinson, 1994; Lanciotti et al., 1994; Moroni et al., 2002; Vachon et al., 2002; Wuytack et al., 2002).

- **Temperatura:** l'inattivazione microbica dovuta alle alte pressioni aumenta in seguito all'innalzamento della temperatura che si verifica durante il processo. Vachon et al. (2002) hanno affermato che la temperatura determina un cambiamento nelle proprietà fisiche della membrana cellulare, in particolare della sua fluidità. In normali condizioni fisiologiche i lipidi nelle membrane biologiche sono solitamente in uno stato fluido, liquido-cristallino e conferiscono ad essa permeabilità e flessibilità ottimale (Suutari & Laasko, 1994). Sempre secondo Vachon et al. (2002) la maggiore resistenza alla pressione a 25 °C piuttosto che a 45 o 55 °C potrebbe essere attribuita proprio alla maggiore flessibilità della membrana a quella temperatura. Tuttavia non si ritiene che la membrana cellulare sia il primo sito che subisce un danno in seguito all'applicazione di alte pressioni. La resistenza batterica alle alte pressioni di omogeneizzazione è probabilmente dovuta alla struttura della parete cellulare, in particolare alla quantità di peptidoglicano. Dall'altro lato, la temperatura del fluido è inversamente correlata alla sua viscosità e quest'ultima, come è ben noto, influisce sull'inattivazione batterica. Così Diels et al. (2004) hanno dimostrato che l'effetto della temperatura sull'inattivazione microbica può essere spiegato come un effetto indiretto della viscosità del fluido.

- **Numero di cicli di omogeneizzazione:** l'applicazione di ripetuti cicli di omogeneizzazione ad alta pressione può essere una tecnica promettente per incrementare l'efficienza di inattivazione microbica di tale processo in quanto all'aumentare del numero di cicli aumenta anche il livello di inattivazione (Baldwin e Robinson, 1994). In particolare tale livello incrementa di circa 4 unità logaritmiche dopo quattro cicli di trattamento.

- **Geometria della valvola omogeneizzante:** cambiamenti nella geometria della valvola omogeneizzante possono causare un significativo incremento nella resa alla stessa pressione. Questo enfatizza l'importanza del design della valvola (Pandolf, 1998). Negli ultimi anni numerose configurazioni di valvole e materiali

sono stati valutati per determinare la loro efficacia nel danneggiare le cellule (Figura 2.3). Nella maggior parte dei casi, valvole aventi un percorso semplice per il flusso sembrano essere quelle più efficaci.

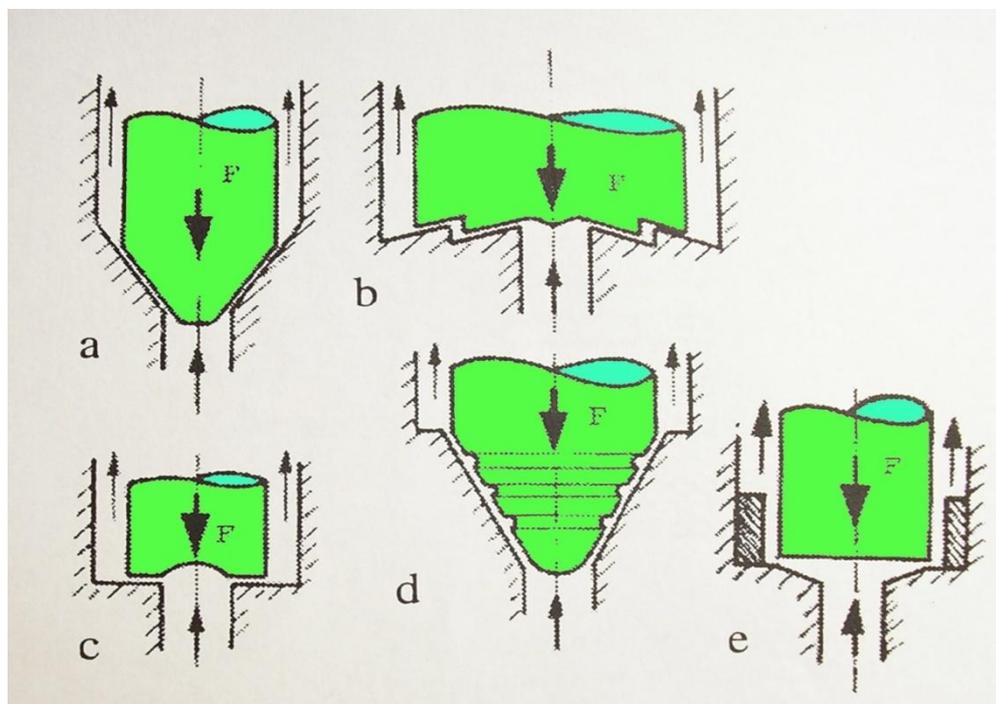


Figura 2.3: Varie forme di valvole di omogeneizzazione.

2.2.2 Parametri fisiologici microbici

Le alte pressioni di omogeneizzazione sono considerate come un trattamento di sanitizzazione a freddo, in grado di disattivare sia microrganismi patogeni che degradativi presenti in un determinato sistema, contribuendo a ridurre o contenere lo sviluppo microbico nei prodotti alimentari (Ross, 2003). L'effetto letale di tale tecnologia, quando applicata a livelli compresi tra 600 e 2000 bar, è stato valutato nei confronti di diversi patogeni quali *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, numerosi sierotipi di *Salmonella*, tossigeni, *Staphilococcus aureus* e microrganismi degradativi come *Bacillus subtilis* e lieviti (Guerzoni et al., 1996, 1997; Lanciotti et al., 1996, 1998; Patrignani et al. 2009,2010) deliberatamente inoculati in latte, uova, creme a base di latte. A seconda delle condizioni adottate, sono state ottenute riduzioni del carico cellulare di tali

patogeni o degradativi compresi tra 3 e 5 log UFC/g o mL. Le principali cause di morte dei microrganismi vanno ricercate nella generazione di danni irreversibili alle membrane esterne dei batteri Gram negativi e alle pareti e membrane citoplasmatiche dei batteri Gram positivi e dei lieviti. A ciò, si aggiunge anche l'inattivazione o denaturazione di proteine ed enzimi di membrana che presiedono al trasporto di nutrienti e all'attività metabolica. L' omogeneizzazione provoca una minore disattivazione di enterococchi, lieviti e batteri lattici omo ed eterofermentanti, che sembrano essere favoriti invece dal trattamento (Lanciotti et al., 2007). La sensibilità dei microrganismi alle pressioni di omogeneizzazione dipende da diversi fattori, legati soprattutto alle condizioni del substrato in cui essi si trovano, come temperatura, pH e attività dell'acqua. In linea generale si può affermare che il tipo di microrganismo e la fase di crescita sono i principali parametri fisiologici da prendere in considerazione.

- *Influenza del tipo di microrganismo*: il componente che maggiormente determina la resistenza cellulare è la parete. Quella batterica è un'unica struttura procariote che circonda la membrana cellulare. Essa svolge due importanti funzioni: una è quella strutturale, in quanto è necessaria per il mantenimento della caratteristica forma batterica. La seconda è quella di proteggere la cellula dallo scoppio quando le differenze tra la pressione osmotica all'interno e all'esterno della cellula superano la forza tensile della membrana cellulare. La forza della cellula dipende dallo spessore del peptidoglicano e dal numero di legami crociati presenti tra catene di polisaccaridi adiacenti (Middelberg et al., 1992; Middelberg e O'Neill, 1993) e in ciò la parete dei Gram negativi differisce notevolmente da quella dei Gram positivi. Questi ultimi hanno la parete più spessa (circa 40 strati) e ciò determina una maggiore resistenza strutturale alla rottura meccanica. Per questi motivi i batteri Gram negativi risultano più sensibili alle alte pressioni di omogeneizzazione (Kelemen e Sharpe, 1979).

- *Influenza della fase di crescita*: il tasso di crescita di cellule in fase esponenziale è maggiore rispetto a quello di cellule in fase stazionaria perché la

crescita in quest' ultima fase è limitata a causa dell'esaurimento di nutrienti essenziali nel mezzo di coltura e dell' accumulo di sostanze tossiche prodotte dalle cellule stesse. Proprio a causa della rapida crescita che si verifica in questa fase, secondo Harrison et al. (1991), le cellule risultano più sensibili alla rottura meccanica. Infatti l'espansione della parete durante la crescita porta alla sua parziale rottura ad opera delle autolisine e questo determina la formazione di aree più deboli. Inoltre nel passaggio da fase esponenziale a fase stazionaria avvengono numerosi cambiamenti (Pisabarron et al., 1985). In particolare aumenta il numero di legami crociati (Middelberg et al., 1992) e questo determina una maggiore robustezza della parete.

2.2.3 Caratteristiche del fluido

- **Viscosità:** la viscosità del fluido ha effetto su alcuni dei meccanismi che, mediante l' impiego di alte pressioni di omogeneizzazione, determinano rottura cellulare come turbolenza (Doulah et al., 1975), cavitazione (Save et al., 1994), impatto con superfici solide (Engler & Robinson, 1981; Keshavarz-Moore et al., 1990) e stress di estensione (Shamlou et al., 1995). Per quel che riguarda la turbolenza, fenomeno che si verifica quando il moto delle particelle di fluido avviene in maniera caotica, questa è maggiore a basse viscosità piuttosto che ad alte e, nell' ipotesi che la turbolenza contribuisca alla rottura cellulare, permette di predire che la viscosità è inversamente correlata all'inattivazione microbica che è esattamente quanto osservato da Diels et al. (2004, 2005). Un altro meccanismo proposto per la rottura cellulare è l' impatto con superfici solide detto anche urto (Engler e Robinson, 1981; Keshavarz-Moore et al., 1990; Kleinig e Middelberg, 1996). In particolare la rottura cellulare attraverso l' impatto con una superficie solida dipende dalla pressione nel punto di impatto. Infine anche la cavitazione, cioè la formazione di zone di vapore all' interno di un liquido che poi implodono, può rappresentare un ulteriore meccanismo di rottura cellulare; incrementando la viscosità del fluido si riduce la cavitazione causando un passaggio da flusso

turbolento a laminare e riducendo le differenze altamente localizzate tra la velocità del fluido e la pressione (Deshimaru, 1994; Svedberg et al., 1999; Totten et al., 1999). Un possibile ultimo meccanismo di distruzione cellulare dovuto all'impiego di alte pressioni di omogeneizzazione è basato sullo stress estensionale che le cellule subiscono in alcune zone ad alto stress vicine alla superficie dell'anello di impatto (Shamlou et al., 1995) quando lo stress estensionale supera la resistenza meccanica della parete cellulare. Un incremento di viscosità determina un maggior stress estensionale e di conseguenza una maggiore rottura cellulare. Infine poiché la viscosità dei fluidi generalmente diminuisce all'aumentare della temperatura, Diels et al. (2004) hanno studiato se l'effetto della temperatura sull'inattivazione microbica può essere spiegato come effetto indiretto della viscosità del fluido (Diels et al., 2005). Alcuni esperimenti hanno dimostrato che tra 5 e 35-45 °C l'effetto della temperatura sull'inattivazione di *E. coli* MG1655 attraverso le alte pressioni di omogeneizzazione può essere spiegato da un cambiamento temperatura-dipendente della viscosità del fluido. Questo significa che, in questo intervallo di temperatura, la viscosità è la variabile primaria che determina inattivazione e la temperatura influisce su tale fenomeno indirettamente attraverso la sua influenza sulla viscosità del fluido. A temperature superiori ai 45 °C l'inattivazione è dovuta prevalentemente all'effetto termico oltre che al danno meccanico subito durante l'omogeneizzazione. Mentre la viscosità del fluido può influenzare l'inattivazione microbica, il trattamento di omogeneizzazione stesso può cambiare la viscosità del fluido.

- **Additivi:** poiché la parete cellulare è il principale target vitale, gli enzimi litici o altri trattamenti in grado di indebolire la parete, possono incrementare la sensibilità microbica alle alte pressioni di omogeneizzazione (Baldwin e Robinson, 1990; Harrison et al., 1991; Volgels e Kula, 1992; Middelberg, 2000; Wuytack et al., 2002). Diels et al. (2005) hanno dimostrato che l'applicazione di pressioni di omogeneizzazione maggiori a 150 MPa inducono sensibilità al lisozima (100 µg/mL) e alla nisina (100 IU/mL) e ciò potrebbe essere attribuito alla permeabilizzazione della membrana esterna. Tuttavia questa

permeabilizzazione/sensibilità è transitoria, essendo completamente reversibile subito dopo il trattamento di omogeneizzazione. La sensibilizzazione alla lattoperossidasi richiede un danno metabolico delle cellule che persista anche dopo il trattamento, cosa che non si realizza impiegando pressioni fino a 300 MPa. Per determinare un danno a livello metabolico sarebbero necessarie pressioni più elevate o tempi di esposizione più lunghi. Un altro fattore importante da considerare è se il trattamento di omogeneizzazione ha effetto sull'attività degli enzimi antimicrobici o sui peptidi usati. Vannini et al. (2004) e Iucci et al. (2007) hanno riportato che l'aggiunta di lisozima e di lattoperossidasi prima del trattamento favoriscono l'efficacia istantanea della pressione su tutti i batteri testati. L'effetto sinergico delle alte pressioni di omogeneizzazione e degli enzimi antimicrobici può essere attribuito a tre fattori:

- un effetto diretto della pressione sull'integrità della parete e della membrana esterna dei microrganismi;
- una successiva maggior penetrazione degli enzimi attraverso la parete e la membrana danneggiata;
- un effetto stimolante indiretto del processo sugli enzimi causato da piccoli cambiamenti strutturali che coinvolgono i loro siti attivi.

2.3 Effetto delle alte pressioni di omogeneizzazione (HPH) per la produzione di prodotti probiotici

Per migliorare la struttura dei prodotti probiotici, sono state proposte diverse strategie. In particolare, l'uso di ceppi capaci di produrre esopolisaccaridi è stato suggerito come alternativo all'utilizzo di additivi come gomma di xantano, gelatina, pectina, e carragenina (Lucey, 2004), che possono influenzare negativamente il gusto del prodotto, il sapore, l'aroma, e la sensazione in bocca (De Ancos et al., 2000). Inoltre il co-inoculo di ceppi probiotici con *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* e *S. thermophilus* è stato segnalato per migliorare le proprietà sensoriali dei lattici fermentati (Gomes e Malcata, 1999). Anche il

miglioramento delle caratteristiche reologiche e delle proprietà sensoriali di lattici fermentati è stato ottenuto modulando alcune variabili chimico-fisiche e tecnologiche comunemente utilizzate a livello industriale.

Tra le variabili tecnologiche potenzialmente utili per la produzione di prodotti lattiero-caseari probiotici vi è, l'alta pressione di omogeneizzazione.

Questa tecnologia, quando applicata al latte ha dimostrato la capacità di:

1 - aumentare o modulare le caratteristiche sensoriali di lattici fermentati probiotici o yogurt senza effetti negativi sulla shelf-life e sulla sicurezza:

infatti, l'uso di HPH testato tra 20 e 100 MPa per il latte ha mostrato capacità di migliorare le caratteristiche sensoriali dei lattici fermentati utilizzando un ceppo probiotico, il *Lactobacillus paracasei* BFE 5264 (Mathara et al., 2004a), utilizzato come coltura starter in combinazione con variabili compositive quali il contenuto di grassi e il contenuto di solidi nel latte come riportato da Patrignani et al. (2007). Questi autori evidenziano che i parametri reologici, quali durezza, indice di viscosità e consistenza, di lattici fermentati probiotici non grassi e con solidi inferiori al 3% aumentano a seconda del livello di pressione raggiunto. Quando i solidi del latte sono superiori al 3%, i comportamenti reologici osservati sono diversi. Il miglioramento delle proprietà tessiturali di lattici fermentati può essere spiegato con il progressivo aumento nella forza delle associazioni tra proteine idrofobiche che il trattamento HPH può promuovere. Anche il contenuto di molecole caratteristiche come diacetile e acetaldeide, in grado di influenzare il sapore e il gusto di lattici fermentati, aumentata con l'uso dell'alta pressione di omogeneizzazione. L'HPH ha mostrato buone potenzialità anche quando viene utilizzato per la produzione di latte fermentato contenente gli starter tradizionali dello yogurt (ad esempio *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) e ceppi probiotici di *Lactobacillus acidophilus* 08 e *Lactobacillus paracasei* A13. In particolare, Patrignani et al. (2008) hanno studiato quattro tipi di lattici fermentati, ottenuti da latte trattato con HPH e sottoposto a trattamento termico (HT) con e senza probiotico aggiunto. I risultati ottenuti hanno mostrato che il trattamento HPH ha favorito la vitalità delle colture starter, in

particolare *S. thermophilus*, anche alla fine del periodo di conservazione senza effetti negativi sulla vitalità dei batteri probiotici. Un livello più elevato di LAB vitali alla fine del periodo di conservazione è, in ogni caso, una caratteristica interessante per questo tipo di prodotto. Lanciotti et al. (2004b) hanno evidenziato che il trattamento HPH del latte migliora la vitalità degli starter dello yogurt durante la conservazione refrigerata e favorisce la crescita di *S. thermophilus* rispetto a *Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus*, riducendo i rischi di post acidificazione. Inoltre, i ceppi probiotici di *L. acidophilus* e *L. paracasei*, impiegati da Patrignani et al (2008) hanno raggiunto valori di circa 5 e 7 ordini di grandezza, rispettivamente, al termine della shelf-life dei lattici fermentati con latte trattato HPH. Inoltre, la coagulazione del latte trattato ad HPH era significativamente più compatta ($p < 0,05$) (superiore fermezza) di quello ottenuto con latte trattato termicamente, e i valori di coerenza, coesione e viscosità erano più alti rispetto ai lattici fermentati ottenuti senza trattamento HPH. Tutti i campioni ottenuti da latte HPH hanno ricevuto alti punteggi all'analisi sensoriale per ogni descrittore considerato. Anche significative maggiori quantità di acetaldeide e 2-propanone sono state rilevate nel latte fermentato ottenuto da latte trattato ad HPH rispetto al latte trattato con HT (trattamento termico). Anche Iucci et al. (2006b) hanno mostrato modificazioni significative e positive, dopo trattamento HPH del latte (60 MPa), sulle proprietà tessiturali, sui profili delle molecole volatili e sul contenuto di esopolisaccaridi nello yogurt ottenuto dalla fermentazione con starter tradizionale e *Lactobacillus paracasei* BFE 5264. In particolare, come mostrato dalla Tabella 2.1, il coagulo del latte trattato ad HPH mostra una migliorata coesione, compattezza, consistenza e indice di viscosità.

Latte fermentato	Compattezza (g)	Consistenza (g.s)	Coesione (g)	Indice di viscosità (g.s)	Esopolisaccaridi (mg/100g)
FM-HPH ¹	433.0±25.2 ^A	7020±197.0 ^B	426.7±52.0 ^A	596.7±30.5 ^A	15±0.9
FM-HT ²	296.0±15.3 ^B	5043±55.1 ^C	291.0±20.8 ^B	419.3±32.0 ^B	8.8±1.2

Tabella 2.1: Parametri di texture (valore medio \pm DS) e contenuto di esopolisaccaridi in latti fermentati (FM) ottenuti dalla fermentazione di colture tradizionali, dello yogurt (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus*) e il ceppo probiotico *Lactobacillus paracasei* BFE 5264. Adattato da Iucci et al. (2006b)

Per ogni colonna i valori con in apice la stessa lettera non sono statisticamente differenti ($P > 0.05$).

1 latte fermentato probiotico trattato ad alta pressione di omogeneizzazione (HPH)

2 Latte fermentato probiotico trattato con trattamento termico (HT)

2 - migliorare le prestazioni tecnologiche dei ceppi probiotici utilizzati da soli o in combinazione con colture starter di yogurt: è stato dimostrato che il trattamento HPH influenza significativamente alcune prestazioni tecnologiche del ceppo probiotico utilizzato, come la velocità di fermentazione e la sua perdita vitalità durante la conservazione del latte fermentato a temperatura di refrigerazione. Infatti, Patrignani et al. (2007) hanno rilevato che in *Lactobacillus paracasei* BFE 5264 il tempo di coagulazione è significativamente influenzato, oltre che dal contenuto di grasso nel latte, dall'aumento di pressione. Tuttavia, le prestazioni tecnologiche del ceppo probiotico risentono dell'aggiunta del grasso di latte (prima o dopo il trattamento a pressione). Quando l'aggiunta del grasso di latte viene eseguita prima del trattamento HPH del latte, la velocità di fermentazione si riduce così come la sua vitalità durante la conservazione refrigerata. L'aggiunta di panna UHT prima del trattamento HPH, genera una maggiore compartimentazione della fase acquosa all'interno della matrice lipido-proteica, e riduce la diffusione di nutrienti, la crescita microbica, e il tasso di acidificazione. Verrips (1989) ha riportato che in alcuni latticini, la crescita

microbica può essere limitata alle micro zone acquose, incluse nella matrice, fisicamente stabile, lipido-proteica.

3 - per la produzione di formaggi probiotici con migliori caratteristiche sensoriali e tecnologiche: secondo la letteratura disponibile, la tecnologia HPH ha mostrato un buon potenziale per la produzione di formaggi probiotici. Infatti, i formaggi si prestano ad essere veicoli di microrganismi probiotici vitali, migliori, rispetto allo yogurt e ai lattici fermentati, perché in genere hanno un maggior pH e una maggior capacità tampone, una consistenza più solida e un contenuto di grassi relativamente più elevato (Boylston et al, 2004.; Ong et al., 2007). D'altra parte, al fine di fornire protezione ai batteri probiotici durante lo stoccaggio e il passaggio attraverso il tratto gastrointestinale, alcune varietà di formaggi come Gouda (Gomes et al., 1995), formaggio Fresco argentino (Vinderola et al., 2006b), formaggio bianco (Kasimoglu et al., 2004), Arzua-Ulloa (Menendez et al., 2000), formaggio fresco Minas (Buriti et al., 2005), Cheddar (Ong et al., 2007), la ricotta (Blanchette et al., 1996), formaggi caprini (Kalavrouzioti et al., 2005), formaggio Pikantne estone (Songisepp et al., 2004), Canestrato Pugliese (Corbo et al., 2001) e Crescenza (Gobbetti et al., 1998) sono stati studiati come veicoli di microrganismi probiotici. Inoltre, Burns et al. (2008) hanno studiato il potenziale del trattamento HPH sul latte per la produzione di crescenza veicolante batteri probiotici. In particolare, tali autori hanno studiato l'utilizzo di colture probiotiche commerciali di *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*, aggiunti come colture ausiliari durante la produzione, e le implicazioni delle caratteristiche fisico-chimiche e sensoriali del prodotto ottenuto. In effetti, in un precedente lavoro eseguito da Gobbetti et al. (1998) ha mostrato che la crescenza è adatta a fungere da vettore per i batteri probiotici perché non sono necessari prolungati periodi di maturazione e stoccaggio a temperatura di refrigerazione (Heller et al., 2003). Tuttavia, l'inclusione dei batteri probiotici ha influenzato negativamente le proprietà organolettiche di questo formaggio tradizionale italiano. Per valutare il potenziale del trattamento HPH sul latte per la produzione di crescenza probiotica con proprietà sensoriali simili a quelle del tradizionale, Burns et al. (2008) hanno

confrontato quattro tipi di formaggi a base di latte pastorizzato e latte trattato HPH con e senza probiotici, rispettivamente (Figura 2.4). Un ceppo di *Streptococcus thermophilus* è stato utilizzato come coltura starter per tutti i tipi di formaggio. I risultati delle analisi della composizione effettuate durante la conservazione in frigorifero (4 ° C) non hanno mostrato differenze significative per la composizione al lordo (proteine, grassi, umidità) e pH. Diversamente, il trattamento del latte HPH ha aumentato la resa in formaggio di circa l'1% e ha influenzato positivamente la vitalità durante la conservazione refrigerata dei batteri probiotici. Infatti, dopo 12 giorni di stoccaggio, il carico cellulare di *Lactobacillus paracasei* A13 era di 8 log UFC/g, mentre i ceppi di *Lactobacillus acidophilus* 05, nella crescita prodotta con latte pastorizzato, presentano una diminuzione del carico cellulare di circa 1 log UFC/g rispetto formaggio ottenuto dal latte HPH. Inoltre, il trattamento iperbarico ha avuto un effetto molto positivo sul rilascio di acidi grassi liberi, proteolisi, e le proprietà organolettiche dei formaggi testati da un'analisi sensoriale.

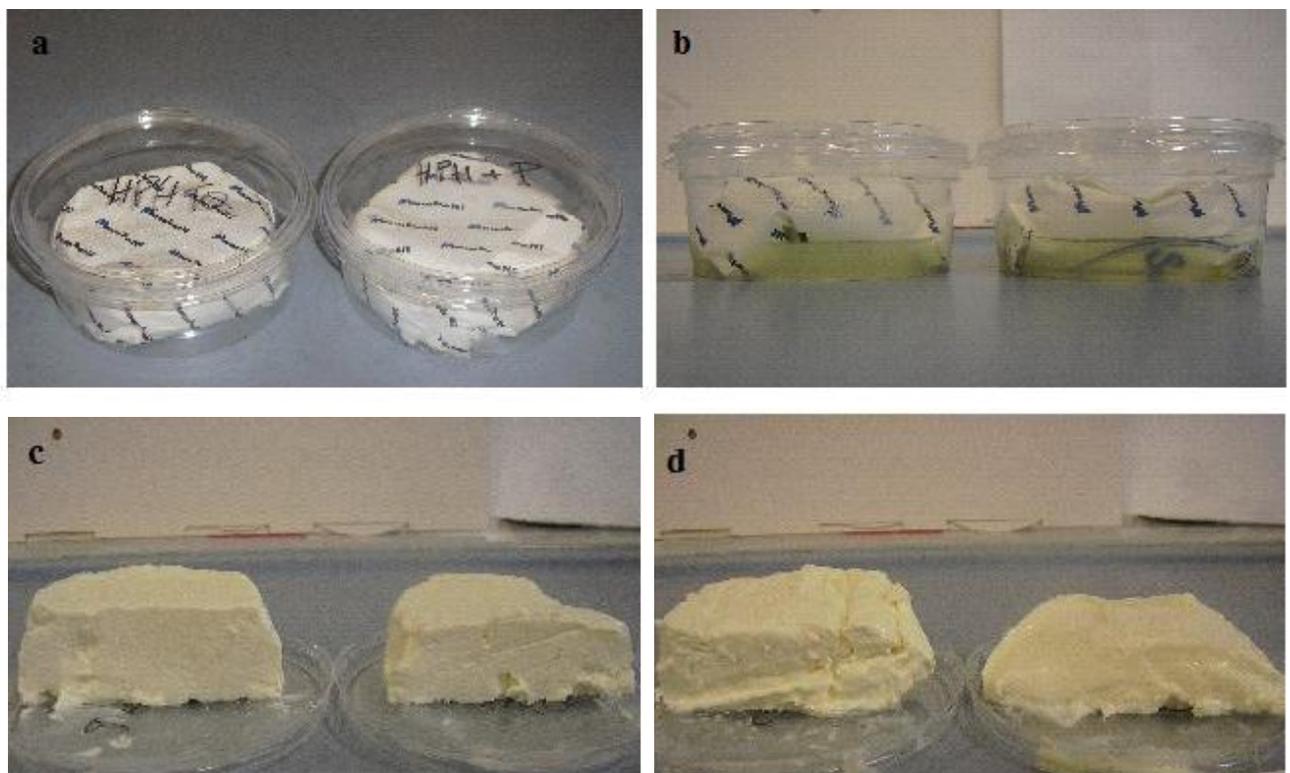


Figure 2.4: Crescenza probiotica ottenuta da latte trattato ad HPH (a, c) e trattato termicamente (b, d) . Tratto da Patrignani et al., 2010.

La modifica delle proprietà reologiche e sensoriali di lattici fermentati e formaggi indotte dal trattamento HPH si spiega in particolare con la modifica indotta da trattamenti HPH sulle interazioni caseina-caseina e caseina-grassi (Lanciotti et al, 2004b;.. Kheadr et al, 2002). La capacità del trattamento HPH di aumentare l'esposizione delle regioni idrofobiche delle proteine, l'estensione e la forza delle associazioni tra proteine idrofobiche è ben documentato (Guerzoni et al, 1999;.. Subirade et al, 1998;.. Haque et al, 2001). Inoltre, il trattamento HPH del latte migliora le caratteristiche di coagulazione del latte grazie alla modifica dell'equilibrio tra le forme solubili e insolubili di calcio, fosforo e azoto (Kheadr et al, 2002;.. Lopez-Fandino et al, 1998; Lanciotti et al., 2006). Infatti, l'omogeneizzazione del latte è considerata uno strumento comune per migliorare la consistenza dello yogurt e per la produzione di gel più fermi (Lanciotti et al, 2004a;.. Lanciotti et al, 2004b;.. Lucey e Singh, 1997). Perché, la pressurizzazione può modificare le dimensioni dei globuli di grasso e delle micelle di caseina in subunità più piccole con migliorate proprietà aggreganti.

Anche la modifica del profilo sensoriale in termini di molecole volatili e la conservazione di diversi composti aromatici può dipendere dalle differenti reti di gel proteico. Il rilascio di composti aromatici e la loro percezione durante il consumo, (un parametro di qualità alimentare fondamentale), è senza dubbio influenzata anche dalla matrice alimentare e dalla microstruttura (Lanciotti et al., 2004b). Inoltre i diversi profili in molecole volatili di lattici fermentati e formaggi ottenuti da latte trattato con HPH potrebbe essere dovuto alla combinazione di eventi associati all'omogeneizzazione. Infatti, il trattamento HPH è indicato per aumentare la frazione di azoto solubile a pH 4,6 (Kheadr et al., 2002), la suscettibilità alla proteolisi delle proteine del siero e delle caseine e di conseguenza, la disponibilità di aminoacidi liberi considerati precursori di diversi aromi tra cui acetaldeide (Garcia-Risco et al., 2002). Inoltre, Hayes & Kelly (2003) hanno riportato che il trattamento HPH del latte scremato induce una discesa del pH più o meno accentuata in relazione alla gravità del trattamento. Questa caduta pH potrebbe influenzare positivamente la produzione di diacetile come osservato da Patrignani et al. (Patrignani et al., 2007). È ben noto che la produzione di

molecole neutre come diacetile è stimolata in condizioni di pH sfavorevoli nei batteri lattici (Hugenholtz, 1993). Dall'altro l'attivazione di una via metabolica, in risposta alle condizioni ambientali, è ben documentata in caso di lattobacilli omofermentanti ed eterofermentanti (Axelsson, 1998).

Inoltre, le modifiche conformazionali e chimico-fisiche delle proteine del latte che hanno prodotto modifiche microstrutturali, sono segnalate per avere effetti indiretti sulla crescita microbica e sul metabolismo. In particolare, Lanciotti et al. (2004b) hanno dimostrato che il trattamento HPH del latte migliora la redditività di *S. thermophilus* e *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* durante la conservazione in frigorifero di yogurt e favorisce la crescita dello *S. thermophilus* confrontata con quella di *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus*, quindi, riduce i rischi di post acidificazione.

L'aumento della vitalità osservata da Patrignani et al. (2008) e Burns et al. (2008) per gli starter dello yogurt e per le colture probiotiche, rispettivamente, può essere attribuito ad una maggiore e più precoce disponibilità, nei prodotti ottenuti da latte trattato ad HPH, di peptidi a basso peso molecolare e/o di acidi grassi come l'acido oleico, essenziali per la crescita di molti LAB (Guerzoni et al., 2001). Inoltre, Patrignani et al. (2007) hanno riportato i livelli compresi tra 60-80 MPa come ottimali sia per la vitalità del probiotico che per le caratteristiche sensoriali dei latti fermentati ottenuti con il solo uso di ceppi probiotici.

Capitolo 3

Obiettivi

I microrganismi probiotici sono stati definiti come “microrganismi vivi che quando assunti in numero adeguato esercitano effetti positivi sulla salute dell’ospite” (FAO/WHO, 2002). Negli ultimi anni crescente attenzione è stata focalizzata sugli effetti della matrice alimentare (Ranadheera et al., 2010), dei trattamenti e delle condizioni tecnologiche (Grzeskowiak et al., 2011) sulla funzionalità delle colture probiotiche. Per esempio, è stato riportato che la resistenza a condizioni di acidità simili a quelle riscontrate durante la digestione è fortemente condizionata dalla matrice alimentare, (Saarela et al., 2006; Vinderola et al., 2011), dal pH del sistema nel quale è avvenuta la crescita delle cellule microbiche (Saarela et al., 2009), dal momento in cui viene effettuata la separazione della biomassa (Saarela et al., 2005), dal protettivo utilizzato (Desmond et al., 2002a, 2002b; Saarela et al., 2005; Vinderola et al., 2011) e dal periodo di conservazione (Matto et al., 2006; Vinderola et al., 2012). Tra i trattamenti tecnologici la liofilizzazione ha dimostrato di essere in grado di incrementare la resistenza alla digestione gastrica simulata di lattobacilli probiotici (Páez et al., 2012). Al fine di incrementare la sopravvivenza dei ceppi probiotici o

di modificarne positivamente la funzionalità sono state tuttavia saggiate le potenzialità di tecnologie quali i campi elettrici pulsati (PEF), le alte pressioni idrostatiche (HHP) e le alte pressioni di omogeneizzazione (HPH). La maggior parte di queste tecnologie è stata in primo luogo studiata come alternativa al trattamento termico per la disattivazione di microrganismi patogeni e degradativi (Knorr, 1999; Knorr et al., 2004; Lado and Yousef, 2002; Shah, 2007; Wan et al., 2009). Comunque, diverse evidenze sperimentali e dati di letteratura provano le potenzialità applicative di queste tecnologie anche nel settore degli alimenti funzionali. Cueva (2009) ha riportato che specifici trattamenti PEF permettevano la modulazione positiva di alcune caratteristiche funzionali di *Lactobacillus acidophilus* LA-K. Per quanto concerne il trattamento HPH, l'applicazione di 100 MPa al latte ha mostrato buone potenzialità per la formulazione di alimenti funzionali, principalmente probiotici. Infatti nel settore degli alimenti funzionali lattiero-caseari, le alte pressioni di omogeneizzazione sono state proposte per la produzione di latti fermentati e formaggi probiotici con migliorate caratteristiche sensoriali e funzionali. Più specificatamente a seguito del trattamento ad alta pressione di omogeneizzazione del latte sono state migliorate le performance dei ceppi probiotici in termini di cinetiche di fermentazione e vitalità durante la conservazione refrigerata dei prodotti (Burns et al., 2008; Patrignani et al., 2009). Il mantenimento di un'adeguata vitalità durante la conservazione refrigerata è considerato un parametro fondamentale dei microrganismi probiotici in quanto questi ultimi possono esercitare effetti benefici sulla salute del consumatore soprattutto se ingeriti a livelli di almeno 10^7 cellule/g di prodotto (Burns et al 2008). Anche Lanciotti et al., (2007) hanno dimostrato che trattamenti ad alta pressione di omogeneizzazione di 80-100 MPa sono capaci di modificare, in rapporto al ceppo e all'entità del trattamento applicato, sia le cinetiche di fermentazione che le attività enzimatiche di batteri lattici starter e non starter (NSLAB) senza effetti significativi sulla vitalità cellulare. Quando bassi livelli di pressione sono stati applicati direttamente a cellule di batteri probiotici, sono stati osservati degli effetti ceppo-dipendenti per quanto concerne la capacità di incrementarne specifiche proprietà funzionali. Tabanelli et al. (2012a) hanno

recentemente dimostrato che 50 MPa applicati su cellule di *L. paracasei* A13 sono in grado di incrementarne l'idrofobicità cellulare e la resistenza alla digestione gastrica simulata. Notoriamente l'idrofobicità cellulare è correlata con la capacità di un ceppo di aderire alle mucose intestinali (Basson et al., 2007). Essa è inoltre considerata un importante fattore per l'interazione tra le cellule probiotiche e l'apparato digerente e le cellule del sistema immunitario ad esso associate (Burns et al., 2011). Tabanelli et al. (2012b) hanno inoltre studiato gli effetti di un trattamento a 50 MPa sulla capacità di lattobacilli probiotici di interagire con il sistema digerente di topi e di stimolarne la produzione di IgA. L'immunoglobulina A (IgA) è la più abbondante immunoglobulina della mucosa intestinale la cui funzione è quella di esercitare una esclusione immune dei microrganismi patogeni provenienti dall'esterno o di proteine estranee (Macpherson et al., 2001). Numerosi dati della letteratura (Vinderola et al. 2007; Kabeerdoss et al., 2011; Holscher et al., 2012) indicano che la proliferazione delle IgA nell'intestino indotta da microrganismi probiotici è un indice assolutamente positivo di funzionalità. I risultati ottenuti da Tabanelli et al. (2012b) hanno indicato che il trattamento HPH applicato è stato in grado di modificare l'interazione dei lattobacilli probiotici considerati con intestino tenue. Inoltre le cellule trattate ad alta pressione inducevano una maggiore produzione di IgA comparate con quelle non trattate, in maniera tuttavia dipendente dal ceppo considerato e dal periodo di somministrazione. Tra i ceppi considerati il ceppo *L. paracasei* A13 è risultato il più promettente sia sulla base delle prove in vitro che delle prove in vivo sui topi. Pertanto tale ceppo è stato scelto per saggiarne le potenzialità dopo trattamento HPH per la produzione di caciotta probiotica con migliorate proprietà organolettiche e funzionali.

Più specificatamente sono state prodotte tre diverse tipologie di caciotta: una caciotta tradizionale, una caciotta prodotta secondo il diagramma di flusso tradizionale ed addizionata di *L. paracasei* A13, e una caciotta addizionata del ceppo A13 sottoposto precedentemente ad un trattamento HPH di 50 MPa. Le tre tipologie di caciotta sono state analizzate immediatamente dopo la produzione e dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione in caseificio a 6°C al fine di valutare

l'effetto del probiotico considerato, trattato o non trattato ad alta pressione, sulla qualità microbiologica, funzionale e sensoriale del prodotto.

Più specificatamente sono stati valutati gli effetti sulla vitalità dei microrganismi starter e del probiotico considerato durante la maturazione, sul profilo in acidi grassi, sul profilo in molecole volatili determinate mediante tecnica SPME-GC-MS, sull'attività proteolitica, sulle proprietà reologiche quali la forza di taglio ed infine sul profilo sensoriale determinato da un panel di assaggiatori non addestrati.

Capitolo 4

Materiali e Metodi

4.1 Microrganismo oggetto di studio

Il microrganismo oggetto di studio appartiene al genere ed alla specie *Lactobacillus paracasei*, in particolare abbiamo studiato il ceppo *L. paracasei* A13.

4.2 Caseificazione

La caseificazione è stata svolta a partire da 200 L di latte per caldaia, il cui pH iniziale era di 6.40. Sono stati prodotti tre tipi diversi di caciotte a partire dall'impiego di diversi starter e/o dall'aggiunta del ceppo probiotico oggetto di studio:

- Caciotta 1: *Lactobacillus. delbrueckii subsp. bulgaricus* (5%) e *Streptococcus thermophilus* (95%),
- Caciotta 2: *Lactobacillus. delbrueckii subsp. bulgaricus* (5%), *Streptococcus thermophilus* (95%) e il probiotico *Lactobacillus paracasei* A13 ($5 \cdot 10^7$ UFC/g),
- Caciotta 3: *Lactobacillus. delbrueckii subsp. bulgaricus* (5%), *Streptococcus thermophilus* (95%) e il probiotico *Lactobacillus paracasei* A13 ($5 \cdot 10^7$ UFC/g), trattato a 50 MPa con un trattamento ad alta pressione di omogeneizzazione.

I ceppi sopra riportati sono stati inoculati nel latte e lasciati agire per 65 minuti a $40 \pm 1^\circ\text{C}$. Al 55° minuto è stato aggiunto sale di Cervia e alla fine dell'incubazione è stata aggiunta rennina per iniziare il processo di coagulazione. Dopo 20 minuti è stata rotta la cagliata e i granuli ottenuti (della dimensione di un chicco di mais), sono stati “mescolati” per 15 minuti per permettere uno spurgo adeguato. Successivamente il coagulo viene posto in fascere per ottenere le forme e dimensioni volute delle caciotte e dopo lo spurgo, quando il pH scende a 5.18-5.20 il formaggio viene posto in cella a 6°C .

Ventiquattro ore dopo la caseificazione e a tempi prestabiliti sono stati effettuati dei campionamenti in cella per monitorare diversi parametri.

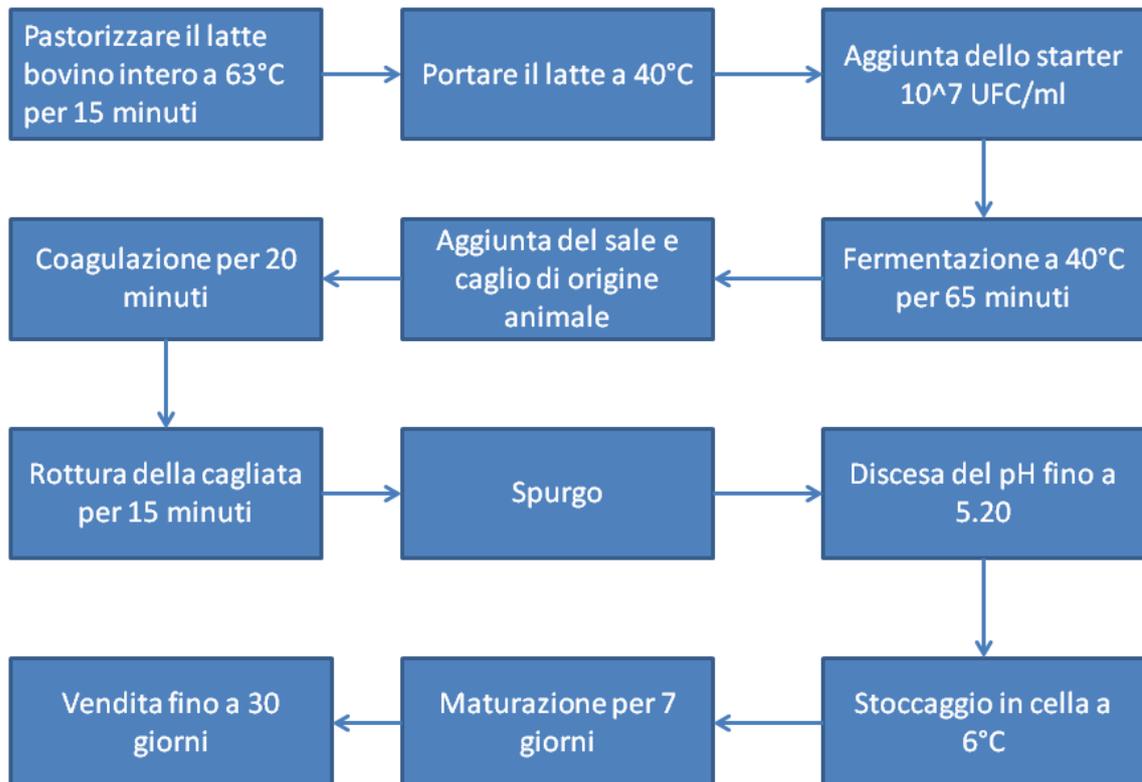


Figura 4.1: diagramma di flusso della produzione di caciotte.

4.3 Trattamento di omogeneizzazione ad alta pressione

Le colture cellulari di *L. paracasei* A13 sono state coltivate in brodo MRS (Oxoid, Cambridge, UK) per 18 ore a 37° C. Una parte della sospensione cellulare ottenuta è stata centrifugata (8000 rpm, 10 min, 4 ° C) e il pellet raccolto è stato lavato due volte con fisiologica sterile (NaCl 9 g/L) e risospeso in latte sterile (skim milk, Oxoid, Cambridge, UK) alla concentrazione voluta (*L.p.* A13 non trattato, N.T.). Parte della sospensione, invece, è stata passata all'omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) ad un livello di trattamento sub-

letale a 50 MPa con un omogeneizzatore ad alta pressione PANDA (Niro Soavi, Parma, Italia). La macchina è dotata di una valvola omogeneizzante tipo di PS, il gruppo valvola include una testa a sfera in ceramica di tipo impact, un anello d'impatto interno in acciaio inox e testa di passaggio in carburo di tungsteno, la temperatura di entrata è di 20°C, e l'aumento di temperatura è di 3°C/10 MPa.

Le cellule così trattate sono state raccolte per centrifugazione come sopra e sospese allo stesso livello di inoculo di quelle non trattate in latte sterile.

Il latte così inoculato è stato aggiunto in caldaia insieme agli starter di fermentazione (*S.thermophilus* e *Lactobacillus. delbrueckii subsp. bulgaricus*).

4.4 Analisi microbiologica delle caciotte

È stato valutato il carico microbico a 24 ore dalla caseificazione e dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C, utilizzando terreni selettivi per le tre tipologie starter impiegati:

- È stato utilizzato MRS (Oxoid, Cambridge, UK) acidificato a pH 5.4 per *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*;
- M17 (Oxoid, Cambridge, UK) per *Streptococcus thermophilus*;
- MRS aggiunto di litio propionato (Oxoid, Cambridge, UK) per *L. paracasei* A13,
- PCA (Oxoid, Cambridge, UK) addizionato di latte per la microflora lattica totale.

4.5 Valutazione del profilo aromatico

Il profilo aromatico delle caciotte è stato analizzato attraverso l'impiego della tecnica SPME-GC-MS dopo 24 ore dalla caseificazione, dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C.

5 g di campione sono stati posti in vials, del volume di 10 mL, sigillati con setti di politetrafluoroetilene/silicone, parafilm e chiusi con ghiere metalliche. Prima dell'analisi sono stati riscaldati a 45°C per 10 minuti al fine di accelerare il raggiungimento dell'equilibrio liquido-vapore. In seguito è stata inserita nello spazio di testa una fibra di silice fusa ricoperta da una fase fissa mista di Carboxen-polidimetilsilossano (CAR/PDMS, 75 µm, SUPELCO, Bellafonte, PA, Stati Uniti d'America) idonea per la preconcentrazione sia delle molecole polari che di quelle apolari. La fibra è stata lasciata inserita per 40 minuti alla temperatura di 45°C. Successivamente i composti sono stati desorbiti nel blocco di iniezione a 250°C per 10 minuti in condizioni di splitless.

Per la separazione dei composti volatili è stato usato un gascromatografo Agilent Technology 6890N, Network GC System abbinato ad uno spettrometro di massa Network Mass Selective detector HP 5973. Per la separazione dei picchi è stata utilizzata una colonna capillare Chrompack CP-Wax 52 CB con lunghezza di 50 m, diametro interno di 0.32 mm mentre la fase interna era di 1.2 µm.

Il programma di temperatura è stato il seguente: 50°C per 2 minuti seguito da un aumento a 65°C con una velocità di incremento della temperatura di 1.5°C/minuto; da 65-220°C con un incremento di 5°C/minuto ed infine una permanenza di 22 minuti a 220°C. Il gas di trasporto usato è stato l'elio con un flusso di 1.0 ml/min. La frammentazione a livello dello spettrometro di massa è avvenuta tramite impatto elettronico a 70 eV. I composti sono stati identificati confrontandone gli spettri di massa con quelli di composti puri contenuti nelle librerie NIST (NIST/EPA / NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 1998 e WILEY (sesta edizione, Stati Uniti d'America) del 1995.

4.5.1 Elaborazione dei metabolici volatili

I dati relativi ai metaboliti volatili sono stati elaborati mediante l'analisi della componente principale (PCA) mediante il programma Statistica (Stat 5.0 for Windows).

4.6 Digestione gastrointestinale simulata

La resistenza alla digestione gastrica simulata è stata svolta sulle caciotte dopo 24 ore dalla caseificazione, dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C.

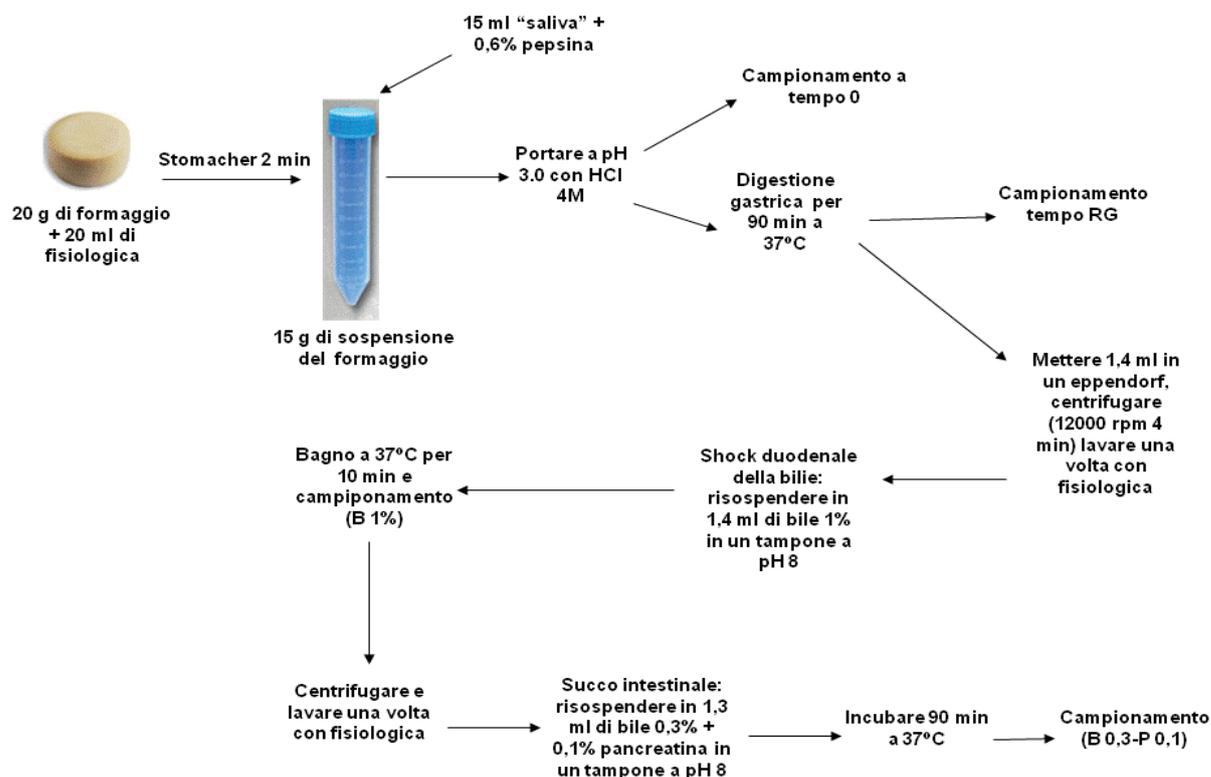


Figura 4.2: diagramma di flusso dell'analisi di resistenza alla digestione gastro-intestinale simulata.

Si prendono 20 g di formaggio, si aggiungono 20 mL di fisiologica sterile e si miscela nello stomacher per 2 minuti, si prelevano 15 g di sospensione, si aggiungono 15 mL di una soluzione simulante la saliva (preparata con 0,22 g/L di CaCl_2 , 16,2 g/L di NaCl , 2,2 g/L di KCl e 1,2 g/L di NaHCO_3) più lo 0,6% di pepsina, si porta a pH 3,0 con HCl 4 M, si svolge il campionamento al tempo 0 e si avvia la digestione gastrica simulata per 90 minuti a 37°C, si svolge il campionamento RG (resistenza gastrica) e si prelevano 1,4 mL, si mettono in un eppendorf, si centrifuga a 12000 RPM per 4 minuti e si lava con fisiologica sterile, poi si risospende il pallet in 1,4 mL di bile all'1% in un tampone a pH 8,0, si lascia a bagno a 37°C per 10 minuti, in modo da simulare la digestione duodenale e si

svolge il campionamento B 1% (bile 1%), si ricentrifuga a 12000 rpm per 4 minuti e si lava con fisiologica sterile, in fine si rioso spende in 1.3 mL di bile allo 0.3% più 0.1% di pancreatina in un tampone a pH 8.0 e dopo 90 minuti a 37°C si svolge l'ultimo campionamento B 0.3-P 0.1 (bile 0.3% pancreatina 0.1%).

4.7 Panel test

Le tre tipologie di caciotte, dopo 21 giorni di stagionatura, sono state sottoposte ad un consumer test di 35 persone, suddivise per sesso e per età in 3 categorie (0-25; 25-35 e >35 anni). Ai partecipanti è stato chiesto di valutare vari parametri:

- Requisiti visivi: Aspetto, colore pasta, colore crosta e consistenza.
- Requisiti olfattivi: Odore e odori anomali (da indicare).
- Requisiti gustativi: Aroma, dolcezza, acidità, amarezza, sapidità, piccantezza, persistenza del gusto e sapori anomali (da indicare).
- Requisiti strutturali: Elasticità, durezza, friabilità, adesività, solubilità, umidità.
- Giudizio complessivo.

I vari parametri sono stati valutati con un giudizio da 1 a 7, ed è stata calcolata media, deviazione standard.

4.8 Analisi degli acidi grassi

L'analisi del profilo in acidi grassi tramite Gas-cromatografia è stata svolta sulle caciotte dopo 24 ore dalla caseificazione, dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C.

4.8.1 Estrazione

1 g formaggio è stato posto in troncoconica e addizionato di 3 g Na₂SO₄ e 0.3 mL H₂SO₄ 2.5 M. L'estrazione è stata effettuata per 3 volte con 3 mL di diethylether/heptane (1:1 v/v) e ad ogni estrazione si centrifugava per 2 minuti a 500 RPM a temperatura ambiente. Il surnatante veniva prelevato e messo in troncoconica con 1 g di Na₂SO₄ e 10 mL di heptane.

4.8.2 Frazionamento

Gli acidi grassi neutri e totali sono stati frazionati tramite colonnine SPE con fase solida amminica (NH₂). Nella colonnina, tramite pipetta Pasteur, sono stati messi 10 mL di N-eptano per condizionare la colonna. In seguito il campione è stato addizionato in colonna e fatto concentrare. Gli acidi grassi neutri sono stati estratti con 10 mL di cloroformio-2-propanolo (2:1) mentre gli acidi grassi liberi (FFA) sono stati estratti con 10 mL di etere etilico al 2% di acido formico. Le frazioni sono state conservate a -20°C fino ad analisi gas-cromatografica.

4.8.3 Esterificazione e derivatizzazione

Prima dell'analisi gas-cromatografica, gli acidi grassi neutri e liberi sono stati derivatizzati mediante esterificazione.

Per prima cosa bisogna portare a secco entrambi i campioni con azoto (N₂), per i neutri, dopo aver portato a secco si aggiunge 1 mL di KOH metabolico 2 N e 1 mL di esano, si vortexa per 3 minuti, si aggiunge 1 mL di esano e si raccoglie la fase organica superiore in una troncoconica pesata alla bilancia analitica, si riporta a secco con azoto e si pesa alla bilancia analitica, poi si aggiunge n-esano in volume proporzionale al peso netto dei campioni (circa 8 mg/mL).

Per gli acidi grassi liberi, dopo averli portati a secco con azoto, si aggiunge una goccia di diazometano per metilarli, poi si riportano a secco facendo particolare attenzione alla volatilità degli esteri appena ottenuti, si pesa la troncoconica alla bilancia analitica e si rioso spende in n-esano in volume proporzionale al peso netto dei campioni (circa 8 mg/mL).

4.8.4 Analisi gas-cromatografica

Si aggiunge 1 μL di standard interno, in questo caso un acido grasso C11:0, non presente nel campione, poi si inietta 1 μL di campione.

Per la separazione degli acidi grassi è stato usato un gascromatografo Agilent Technology 6890N, Network GC System abbinato ad uno spettrometro di massa Network Mass Selective detector HP 5973. Per la separazione dei picchi è stata utilizzata una colonna capillare SPB5 SUPELCO con lunghezza di 60 m, diametro interno di 0.25 mm mentre la fase interna era di 0.25 μm .

Il programma di temperatura è stato il seguente: 120°C per 5 minuti seguito da un incremento a 215°C con velocità di incremento della temperatura di 3°C/Minuto seguito da un incremento fino a 225°C con velocità di incremento della temperatura di 0.5°C/minuto fino 225°C poi isoterma a 225°C per 2 minuti.

Il gas di trasporto usato è stato l'elio con un flusso di 1.5 ml/min.

La frammentazione a livello dello spettrometro di massa è avvenuta tramite impatto elettronico a 70 eV. I composti sono stati identificati confrontandone gli spettri di massa con quelli di composti puri contenuti nelle librerie NIST (NIST/EPA / NIH Mass spectral Library, Versione 1.6, Stati Uniti d'America) del 1998 e WILEY (sesta edizione, Stati Uniti d'America) del 1995.

4.9 Valutazione della proteolisi

La valutazione della proteolisi è stata svolta sulle caciotte dopo 24 ore dalla caseificazione, dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C.

4.9.1 Estrazione

Le proteine e i peptidi sono stati estratti secondo il metodo di Kuchroo & Fox (1982), 5 g di formaggio con 20 mL di acqua distillata sono stati omogeneizzati allo stomacher per 3 minuti, il pH è stato portato a 4.6 con HCl 1 N, dopo 30 minuti a temperatura ambiente, l'omogeneizzato è stato messo in bagno termostato a 40°C per 60 minuti, dopo di che è il campione viene centrifugato a

3000g per 20 minuti a 4°C, in fine il pellet viene sospeso in 5 mL di urea 7 M e stoccato a -20°C prima dell'analisi.

4.9.2 Dosaggio delle proteine

Per preparare ogni campione a 700 µL di acqua distillata sono stati aggiunti 100 µL di estratto proteico e 200 µL di Bradford, mentre per il bianco sono stati utilizzati 800 µL di acqua distillata e 200 µL di Bradford, dopo 15 minuti è stata misurata la densità ottica a 595 nm.

4.9.3 Separazione SDS-PAGE

Per l'analisi a 75 µL di campione sono stati aggiunti 25 µL di Laemmli, dopo 10 minuti a bagno a 90°C il campione è stato raffreddato e stoccato a -20°C prima dell'analisi.

La separazione elettroforetica, di 15 µL di campione, è stata svolta su gel SDS-PAGE a 250 V per circa 45 minuti, come standard è stata utilizzato Precision Plus Protein Standards All Blue (BIO RAD), dopo di che il gel è stato colorato immergendolo per 60 minuti in una soluzione colorante (0.1% blu di bromo fenolo, 50% metanolo, 7% acido acetico glaciale e acqua distillata), e per 2 ore nella soluzione decolorante decolorante (50% metanolo, 10% acido acetico glaciale e acqua distillata).

4.10 Analisi del contenuto di amine biogene

La determinazione quali-quantitativa delle amine biogene nel prodotto è stata effettuata grazie all'impiego della tecnica di cromatografia liquida ad alta pressione (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) a 24 ore dalla caseificazione e dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C.

4.10.1 Estrazione delle amine

10 grammi di campione sono stati addizionati di 20 mL di acido tricloroacetico (TCA 5%) (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A) e sono stati posti in un bagnetto termostato a 75°C per 30 minuti. L'estratto è stato centrifugato (8000 rpm, 10 min, 10°C, Beckmann Coulter, USA) e filtrato su carta. Il processo è stato ripetuto una seconda volta e l'estratto è stato portato a volume a 50 mL con la stessa soluzione di TCA 5%. Gli estratti così ottenuti sono stati conservati per un massimo di 7 giorni a 4°C prima di essere sottoposti a derivatizzazione.

4.10.2 Derivatizzazione

La reazione di derivatizzazione è stata effettuata secondo la metodica riportata da Martuscelli et al. (2001). In un matraccio da 10 mL sono stati aggiunti 1 mL di campione, 300 µL di NaHCO₃ saturo, 100 µL di una soluzione a 500 ppm di standard interno (1.7-diaminoeptano, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) e una quantità variabile di una soluzione di KOH 1 M in modo da portare il campione a un valore di pH di 11.5 ± 0.01 (pHmetro BASIC 20, Crison, Modena, Italy). Sono stati in seguito aggiunti 4 mL di soluzione di dansilcloruro (ottenuta sciogliendo 20 mg di dansilcloruro (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) in 4 mL di acetone per HPLC per ogni campione da derivatizzare) e i campioni chiusi e parafilmati sono posti in agitazione in bagnetto termostato a 40°C per 45 minuti (195 strokes) al buio, protetti dalla luce. Al termine di questi 45 minuti la reazione è stata bloccata attraverso l'aggiunta di 400 µL di una soluzione di ammoniaca (NH₃ 30%). I campioni sostano al buio per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente vengono portati a volume con acetonitrile per HPLC. Sono stati poi filtrati con filtri in nylon (\emptyset 0.22 µm) e posti in vials, protetti dalla luce a -20°C per non più di 7 giorni.

4.10.3 HPLC e condizioni cromatografiche

I campioni sono stati iniettati in un HPLC costituito da un sistema Jasco PU-2089 Plus con iniettore manuale Rheodyne model (loop di 20 µL). La colonna

utilizzata per l'analisi è una colonna cromatografica di tipo C18 a fase inversa (Waters Spherisorb ODS-2, 150x4.6 mm, 3 μ m) con precolonna (Waters Spherisorb S5 ODS2, 4.6x10 mm). La rilevazione avviene tramite l'utilizzo di un detector UV-VIS Jasco UV 2070 Plus a 254 nm. Nella tabella è indicato il gradiente di concentrazione degli eluenti utilizzati per l'analisi cromatografica delle amine biogene.

Tempo (minuti)	CH₃CN (%)	K₂HPO₄ (%)	H₂O (%)
0.0	65	35	0
1.0	65	35	0
5.0	80	20	0
5.1	80	0	20
6.0	90	0	10
15.0	90	0	10
20.0	65	35	0
25.0	65	35	0

Tabella 4.1: Gradienti di concentrazione degli eluenti durante l'analisi HPLC.

Per tutti i campioni il tempo di analisi è di 25 minuti, con un tempo di equilibratura di 10 minuti prima di ogni nuova iniezione.

I picchi ottenuti vengono integrati e le aree calcolate vengono rapportate a curve di taratura precedentemente ottenute attraverso l'impiego di soluzioni standard di ammine biogene. Queste soluzioni di standard contengono le ammine biogene (istamina, 2-fenilettilammina, tiramina, putrescina, cadaverina, spermina e spermidina) a concentrazione nota e vengono poi sottoposte alla medesima procedura di derivatizzazione dei campioni. I derivatizzati vengono iniettati con la stessa programmata di gradienti e queste soluzioni sono necessarie per

l'identificazione delle amine, in funzione dei tempi di ritenzione, e per la quantificazione delle stesse attraverso le rette di taratura.

4.10.4 Preparazione degli eluenti per HPLC

Gli eluenti utilizzati sono aceto nitrile (CH₃CN, Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.), acqua per HPLC (Sigma-Aldrich, St Louis, Mo., U.S.A.) e un tampone fosfato (soluzione di potassio fosfato monoacido a 10 mM, portato a pH 7.0 attraverso l'aggiunta di HCl 1 M (pHmetro BASIC 20, Crison, Modena, Italy).

Gli eluenti vengono preventivamente filtrati con filtro a porosità 0.22 µm in nylon (per l'acetonitrile) o acetato di cellulosa (per l'acqua e il tampone acetato). Successivamente vengono sonicati per 10 minuti a 20°C (Starsonic 90, Liarre) prima del loro utilizzo.

4.11 Texture profile analysis (TPA)

L'analisi della texture è stata svolta sulle caciotte dopo 24 ore dalla caseificazione, dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C.

È stato utilizzato un Texture Analyser TA DHI (Stable Micro System, UK) utilizzando come sonda una lama e cella di carico da 5 kg per il campione dopo 24 ore di maturazione a 6°C e 25 kg per i campioni a 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C, la velocità di discesa è stata di 0.50 mm/s ed il campione è stato penetrato per 30 mm, il tutto a 22°C.

I risultati sono la media di 3 tagli su 3 diverse parti delle caciotte.

4.12 Misurazione del pH e a_w

Il pH è stato misurato (pHmetro BASIC 20, Crison, Modena, Italy) appena dopo la cagliata, a 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C, mentre l'attività dell'acqua è stata misurata (aqua lab 4te decagon devices) a 24 ore dalla caseificazione, dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione a 6°C.

Capitolo 5

Risultati

Sono state prodotte tre diverse tipologie di caciotta: una caciotta tradizionale, una caciotta prodotta secondo il diagramma di flusso tradizionale (riportato nel paragrafo 4.2) ed addizionata di *L. paracasei* A13, e una caciotta addizionata del ceppo A13 sottoposto precedentemente ad un trattamento HPH di 50 MPa. Le tre tipologie di caciotta sono state analizzate immediatamente dopo la produzione e dopo 7, 14 e 21 giorni di maturazione in caseificio a 6°C al fine di valutare l'effetto del probiotico considerato, trattato o non trattato ad alta pressione, sulla qualità microbiologica, funzionale e sensoriale del prodotto.

5.1 Valutazione della vitalità di *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. paracasei* A13 e della qualità microbiologica nelle tre tipologie di prodotto in rapporto al tempo di maturazione

I microrganismi starter hanno evidenziato lo stesso comportamento in tutte e tre le tipologie di prodotto. Più specificatamente *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*

hanno mantenuto livelli maggiori rispettivamente di 9 e 6 log UFC/g per tutti i 21 giorni considerati, indipendentemente dalla presenza di *L. paracasei* A13 e dal suo eventuale trattamento ad alta pressione (tabella 5.1).

Il probiotico considerato ha mantenuto un'elevatissima vitalità quando non trattato da alta pressione per tutto il periodo considerato. Per contro, il trattamento ad alta pressione ha determinato un repentino calo di vitalità ma solo dopo 21 giorni di maturazione a 6°C (tabella 5.1). E' importante sottolineare che i microrganismi probiotici sono in generale estremamente sensibili alle condizioni riscontrate nel prodotto lattiero-caseario considerato. Il fatto di avere carichi cellulari di circa 5 log UFC/g dopo 21 giorni di maturazione può essere ritenuto un risultato interessante e paragonabile con dati della letteratura concernenti tipologie di prodotti simili. E' noto che i formaggi a breve maturazione quali caciotta e crescenza si configurano come carrier migliori rispetto ai latti fermentati per i microrganismi probiotici garantendone una maggiore vitalità durante la conservazione refrigerata (Patrignani et al., 2007). Va inoltre sottolineato che la più recente letteratura ha messo in evidenza il ruolo positivo per la salute del consumatore anche delle cellule probiotiche morte e di loro prodotti del metabolismo rilasciati nel sistema alimentare in cui è avvenuto il loro sviluppo (Tabanelli et al 2012a).

Tra le tre tipologie di prodotto non sono state riscontrate differenze per quel che concerne la microflora lattica totale ed i lieviti. I coliformi totali hanno fatto registrare valori leggermente superiori nelle caciotte addizionate di *L. paracasei* A13 trattato e non immediatamente dopo la produzione. Tuttavia essi si attestano a valori al di sotto del limite di determinazione (1 log UFC/g) già a partire da 7 giorni di maturazione (tabella 5.1).

Caciotta	Giorni maturazione	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i> A13	Lattici mesofili totali	Lie viti	Coliformi totali
Caciotta	1	9.57 (±0.13)	6.91 (±0.10)	-	9.53 (±0.12)	<2	1.6 (±0.09)
	7	9.78 (±0.19)	6.61 (±0.07)	-	9.79 (±0.11)	<2	<1
	14	9.08 (±0.16)	6.36 (±0.16)	-	9.04 (±0.15)	<2	<1
	21	9.34 (±0.09)	6.03 (±0.12)	-	9.54 (±0.12)	<2	<1
Tradizionale	1	9.50 (±0.17)	6.88 (±0.11)	8.95 (±0.09)	9.68 (±0.09)	<2	2.3 (±0.10)
	7	9.62 (±0.18)	6.76 (±0.09)	9.57 (±0.15)	9.98 (±0.12)	<2	<1
	14	9.11 (±0.15)	6.41 (±0.19)	9.23 (±0.17)	9.68 (±0.11)	<2	<1
	21	9.23 (±0.21)	6.11 (±0.21)	9.6 (±0.15)	9.25 (±0.16)	<2	<1
<i>L.p.</i> A13 NT	1	9.43 (±0.09)	6.79 (±0.15)	9.32 (±0.12)	9.72 (±0.17)	<2	2.5 (±0.13)
	7	9.81 (±0.11)	6.64 (±0.13)	9.24 (±0.11)	9.82 (±0.14)	<2	<1
	14	9.16 (±0.10)	6.41 (±0.14)	9.17 (±0.12)	9.26 (±0.15)	<2	<1
	21	9.24 (±0.12)	6.09 (±0.09)	4.76 (±0.16)	9.12 (±0.11)	<2	<1

Tabella 5.1: parametri microbiologici delle caciotte in maturazione.

5.2 Parametri chimico-fisici delle tre tipologie di prodotto in rapporto al tempo di maturazione

Nelle tabelle 5.2 e 5.3 sono riportati i valori di pH e attività dell'acqua (a_w) dei prodotti in rapporto alla presenza o meno del probiotico e all'eventuale applicazione del trattamento iperbarico. L'aggiunta del ceppo *L. paracasei* A13 trattato ha indotto un' immediata maggiore acidificazione del prodotto. D'altra parte Lanciotti et al. (2007) hanno evidenziato un'accelerazione delle cinetiche di acidificazione in diversi ceppi probiotici a seguito di un trattamento sub-letale ad alta pressione di omogeneizzazione. Il pH ha fatto registrare valori più bassi rispetto al prodotto tradizionale anche dopo 7 e 14 giorni di maturazione. Tuttavia dopo 21 giorni in questa tipologia di prodotto il pH si attestava a valori di 4.87 significativamente maggiori rispetto al prodotto tradizionale. Il prodotto ottenuto con il ceppo *L. paracasei*. A13 non trattato ha fatto registrare valori di pH più alti immediatamente dopo la produzione ma cinetiche di acidificazione più accelerate rispetto al prodotto tradizionale.

Per quanto riguarda l'attività dell'acqua del prodotto non sono state riscontrate differenze significative in rapporto al tempo di maturazione tra le tre tipologie di prodotto.

Caciotta	Dopo cagliata	7 giorni	14 giorni	21 giorni
Tradizionale	5.11±0.01	4.97±0.03	4.93±0.05	4.58±0.05
<i>L.p.</i> A13 NT	5.21±0.03	4.71±0.03	4.53±0.07	4.60±0.05
<i>L.p.</i> A13 T	5.07±0.03	4.74±0.01	4.75±0.04	4.87±0.05

Tabella 5.2: pH nelle tre diverse caciotte durante la maturazione.

Caciotta	24 ore	7 giorni	14 giorni	21 giorni
Tradicional	0.991±0.000	0.984±0.002	0.985±0.001	0.975±0.001
<i>L.p.</i> A13 NT	0.991±0.001	0.984±0.003	0.984±0.002	0.979±0.002
<i>L.p.</i> A13 T	0.992±0.000	0.984±0.001	0.983±0.001	0.976±0.002

Tabella 5.3: attività dell'acqua nelle diverse caciotte durante la maturazione.

Anche i dati di forza massima di taglio ottenuti mediante texture analyzer hanno evidenziato l'assenza di differenze significative tra i prodotti in rapporto alla presenza del ceppo *L.p.* A13 e dell'eventuale applicazione del trattamento iperbarico nei campioni analizzati immediatamente dopo la produzione e dopo 14 giorni di conservazione. Leggere differenze sono per contro state riscontrate dopo 21 giorni di maturazione. Infatti, come evidenziato dalla figura 5.1, il prodotto tradizionale ha fatto registrare i valori più bassi di forza di taglio mentre la presenza del ceppo A13 non trattato ha determinato il più alto valore di questo parametro.

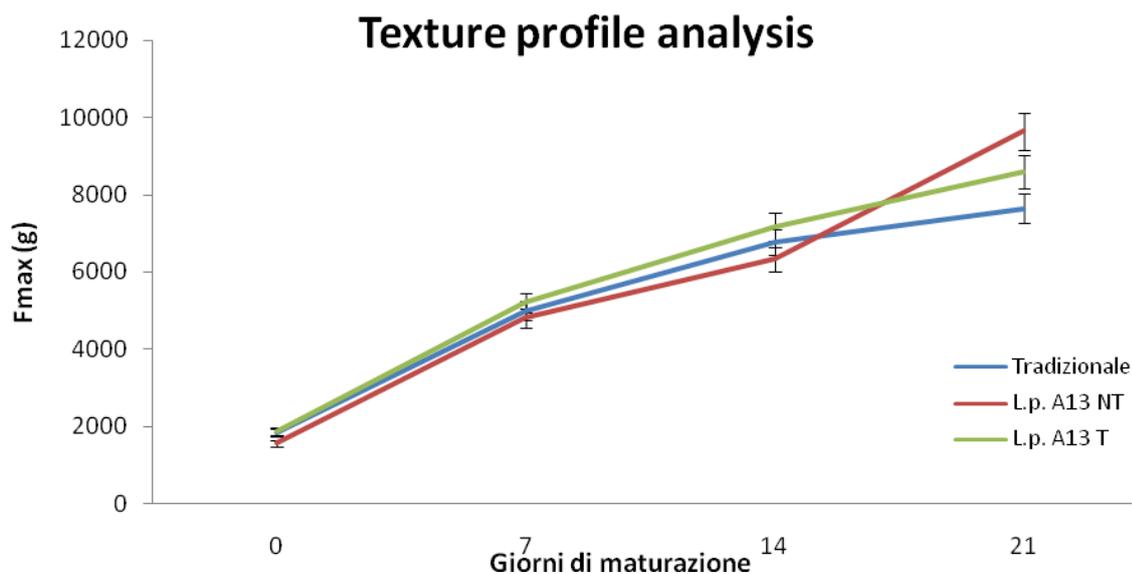


Figura 5.1: valori di forza massima di taglio nelle diverse caciotte durante la maturazione (analisi TPA).

5.3 Resistenza alla digestione gastrointestinale simulata

Immediatamente dopo la produzione e dopo 14 e 21 giorni di maturazione è stata testata la funzionalità dei prodotti attraverso il test di resistenza alla digestione gastrointestinale simulata del ceppo *L. paracasei* A13.

Tale analisi è stata effettuata solo sui formaggi contenenti il ceppo A13 trattato o non perché prove preliminari *in vitro* avevano dimostrato l'assenza di resistenza all'acido e alla bile nei ceppi starter utilizzati per questo processo.

I dati riportati nella tabella 5.4 hanno evidenziato come il ceppo impiegato si dimostri estremamente resistente agli stress acido-gastrico e duodenale mantenendo livelli di vitalità al di sopra del 95% anche dopo 1 giorno dalla produzione. Va sottolineato che le condizioni riscontrate nel prodotto considerato sono da un lato stringenti per i microrganismi probiotici e dall'altra la matrice alimentare può esercitare un effetto protettivo durante il transito nell'apparato digerente umano. I dati ottenuti hanno altresì dimostrato la capacità del trattamento ad alta pressione di incrementare questa proprietà. Infatti, nei formaggi analizzati

dopo 24 ore dalla produzione, sono stati registrati dei valori di resistenza all'acidità gastrica e bile di circa il 98%. Dopo 14 giorni non sono state registrate differenze significative in rapporto all'applicazione, effettuata prima della caseificazione, del trattamento iperbarico alle cellule del probiotico considerato. Dopo 21 giorni di maturazione la resistenza delle cellule trattate risultava significativamente inferiore rispetto a quella del ceppo non trattato. Tuttavia va ricordato che il carico cellulare del probiotico nella caciotta ottenuta con il ceppo A13 trattato era inferiore di più di 4 cicli logaritmici rispetto a quella prodotta con il ceppo non trattato.

Caciotta		% di sopravvivenza del ceppo <i>L.p.</i> A13		
		24 ore	14 giorni	21 giorni
<i>L.p.</i> A13 NT	RG (pH3)	99,8 (±0.3)	86,4 (±0.6)	77,9 (±0.3)
	Bile 1%	99,0 (±0.6)	85,4 (±0.2)	75,4 (±0.4)
	B 0,3%-P 0,1%	95,0 (±0.5)	84,2 (±0.5)	74,9 (±0.2)
<i>L.p.</i> A13 T	RG (pH3)	100,0 (±0.2)	89,4 (±0.2)	68,4 (±0.5)
	Bile 1%	100,0 (±0.1)	87,3 (±0.3)	66,5 (±0.3)
	B 0,3%-P 0,1%	97,0 (±0.2)	86,9 (±0.4)	62,5 (±0.2)

Tabella 5.4: % di sopravvivenza del ceppo *L.p.* A13 non trattato o trattato ad HPH nei diversi passaggi del test di resistenza gastrointestinale simulata durante la maturazione.

5.4 Analisi degli acidi grassi

Nei grafici 5.2 e 5.3 sono riportate le percentuali relative dei principali acidi grassi totali riscontrati nelle tre tipologie di prodotto dopo due settimane di maturazione a 6°C. Come atteso, i principali acidi grassi sono il C 14:0 (acido miristico), C16:0 (acido palmitico), C18:1 (Δ 9 cis) (acido oleico); C18:2 (Δ 7, Δ 10, cis, cis) e in misura minore C 10:0 (acido caprinico), C 12:0 (acido laurico) e non sono state evidenziate differenze significative in rapporto alla presenza del ceppo probiotico trattato o meno all'alta pressione di omogeneizzazione.

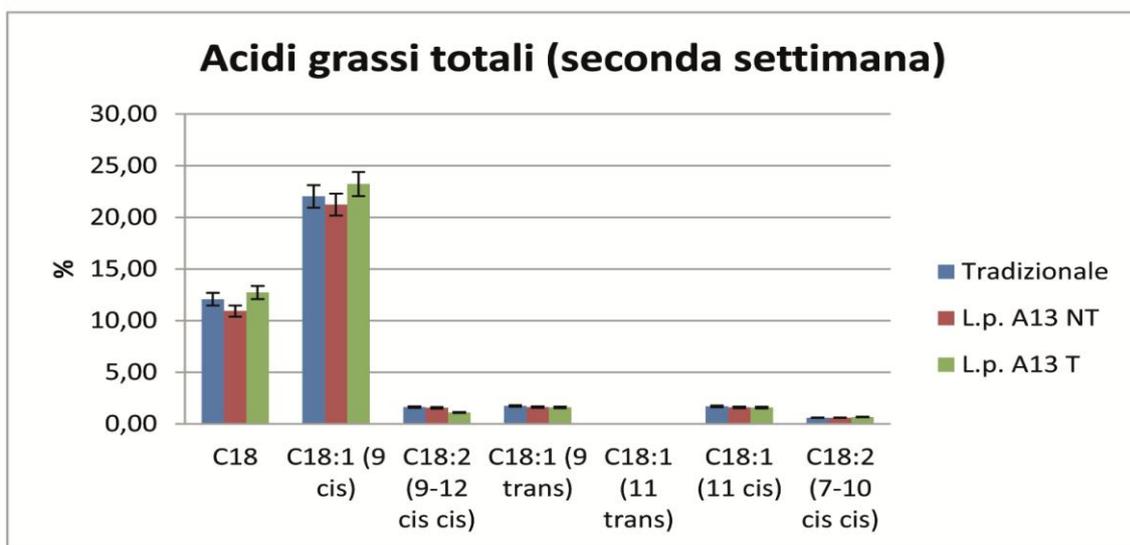
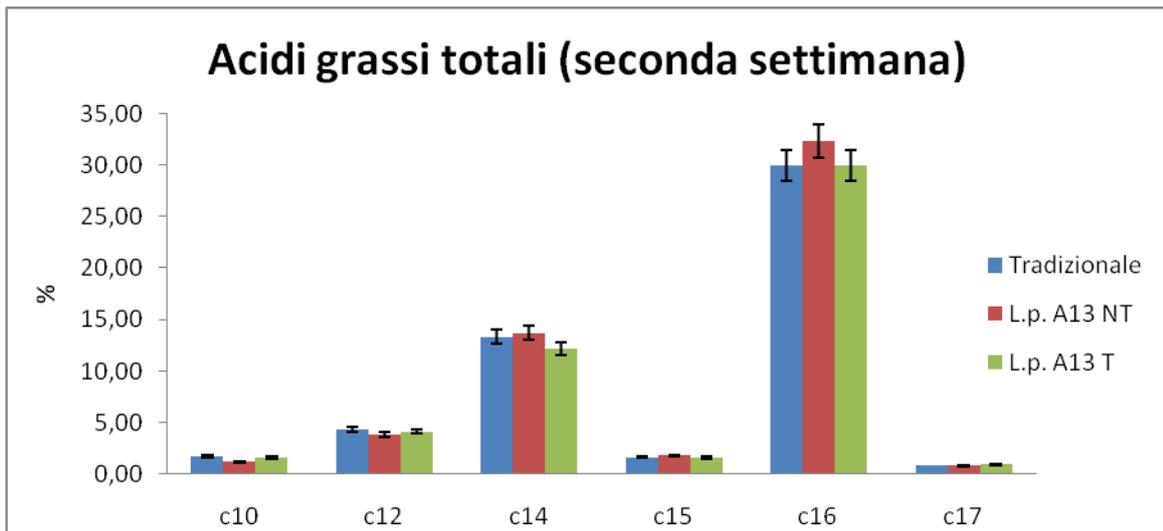


Figure 5.2 e 5.3: percentuali relative dei principali acidi grassi totali riscontrati nelle tre tipologie di prodotto dopo due settimane di maturazione a 6°C.

Per quanto riguarda, invece, gli acidi grassi liberi, notoriamente importanti per la caratterizzazione sensoriale del prodotto, sia per il loro contributo diretto che come precursori di molte molecole di aroma, i risultati ottenuti hanno evidenziato uno specifico profilo per ogni tipologia di caciotta considerata. In tabella 5.5 sono riportate le quantificazioni degli acidi grassi liberi rilevati ai diversi tempi di maturazione in rapporto alla presenza del ceppo *L. paracasei* A13 e all'eventuale applicazione del trattamento omogeneizzante alle cellule del probiotico prima della caseificazione. Gli acidi grassi rilevati in maggiore quantità sono C 14:0, C16:0, C18:1 (Δ 9 cis) C18:2 (Δ 7, Δ 10 cis cis) e in misura minore C 10:0, C 12:0, indipendentemente dalla tipologia di formaggio considerato. Dopo 24 ore dalla

caseificazione le caciotte contenenti il probiotico hanno fatto rilevare 400 ppm di acidi grassi liberi mentre nei controlli sono stati rilevati solo 83 ppm di acidi grassi liberi. Anche le caciotte contenenti il probiotico trattato hanno fatto registrare una lipolisi più precoce, evidenziando una concentrazione di acidi grassi liberi doppia rispetto ai controlli. Dopo 7 giorni di maturazione a 6°C sono state rilevate concentrazioni significativamente superiori rispetto al tempo iniziale di analisi nelle caciotte tradizionali e, in minor misura, in quelle addizionate di *L. paracasei* A13 non trattato. Per contro la caciotta contenente il ceppo trattato ha evidenziato concentrazioni di acidi grassi liberi paragonabili a quelle registrate dopo 24 h di maturazione. Questo dato sembra indicare che la lipolisi è più prolungata nel prodotto tradizionale e la trasformazione degli acidi grassi liberati in altre molecole di impatto da un punto di vista sensoriale (chetoni, aldeidi, acidi esteri, lattoni, idrossiacidi etc..) sembra essere più ritardata. La trasformazione degli acidi grassi liberi nel prodotto tradizionale sembra diventare significativa solo a partire dal 14° giorno di maturazione quando la concentrazione degli acidi grassi liberi scende drasticamente. Nel prodotto contenente il probiotico trattato la concentrazione di acidi grassi liberi subisce poche oscillazioni nel corso della maturazione presumibilmente a causa di un equilibrio tra la formazione di acidi grassi e loro trasformazione. Al fine di evidenziare meglio gli andamenti dei singoli acidi grassi, nei grafici 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8 e 5.9 sono riportate le percentuali relative dei principali acidi grassi dopo 14 e 21 giorni di maturazione. L'aggiunta del ceppo A13 determina di per sé un significativo incremento nelle % relative di C18:1 (Δ 9 cis) (acido oleico), C16:1 (Δ 11 cis), C18:2 (Δ 7, Δ 10 cis) e la comparsa di acidi grassi liberi non rilevati nella caciotta di controllo (C16:1 (Δ 9 cis) (acido palmitoleico), C18:1 (Δ 11 cis) (acido vaccenico), C17:0 (acido margarico)). Per contro l'aggiunta del ceppo probiotico porta a una riduzione di alcuni acidi a media catena sia saturi che insaturi (C10:0 (acido caprinico), C14:1 (Δ 11 cis), C14:0 (acido miristico), C16:0 (acido palmitico)). L'applicazione del trattamento sub-letale ad alta pressione al ceppo A13 prima della caseificazione non modifica il profilo qualitativo specifico del ceppo bensì

cambia i rapporti relativi tra le diverse molecole rilevate. Questo si rifletterà sul profilo sensoriale ed aromatico dei prodotti considerati.

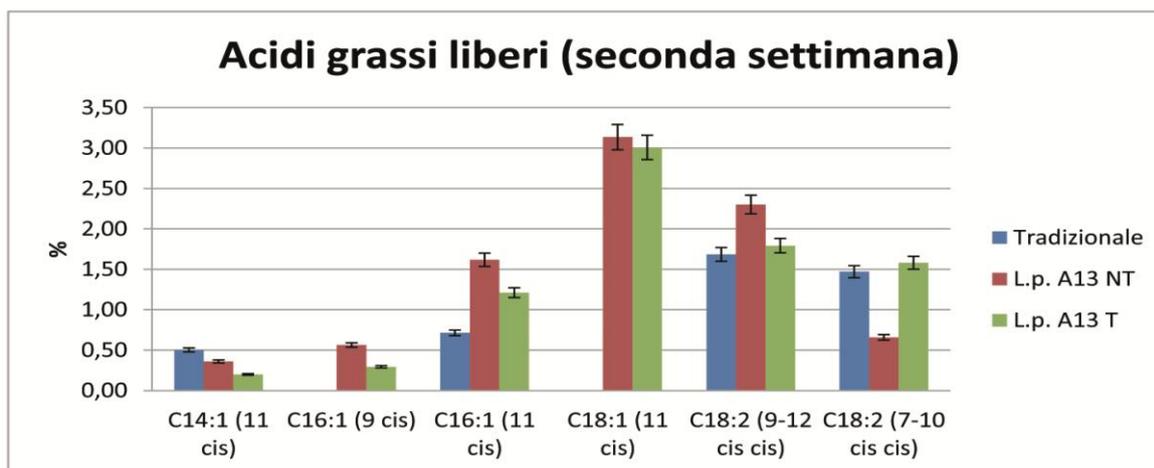
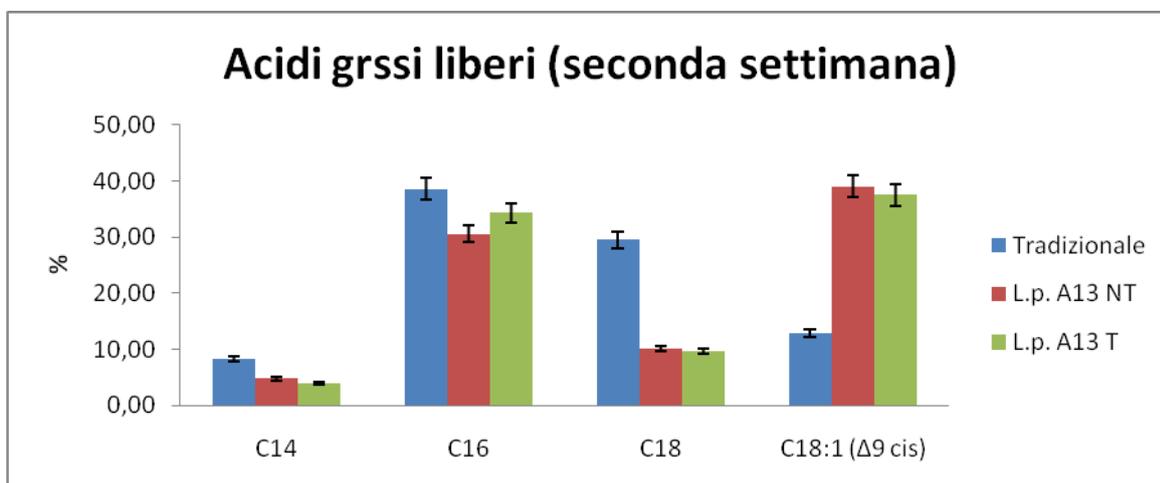
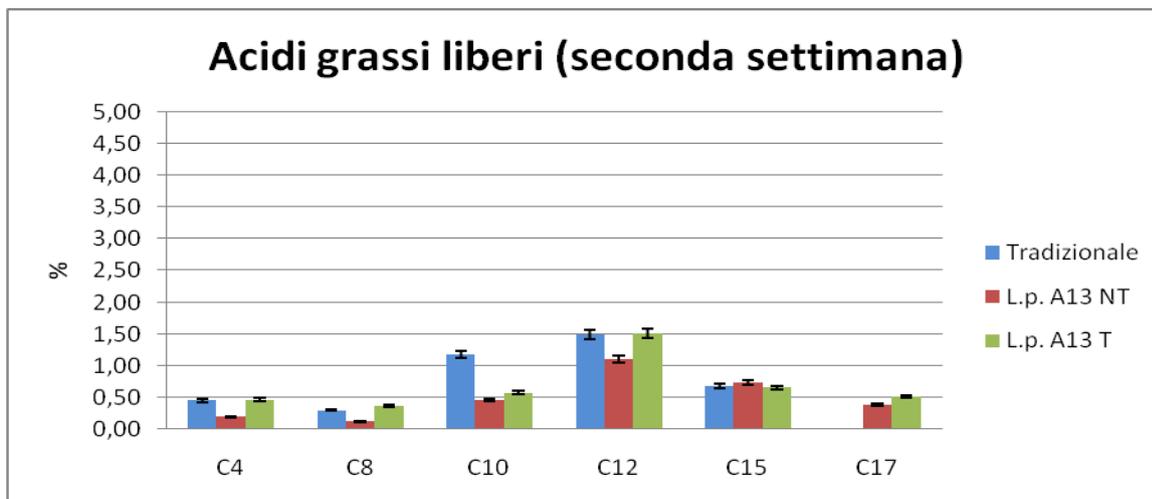


Figure 5.4, 5.5 e 5.6: percentuali relative dei principali acidi grassi liberi riscontrati nelle tre tipologie di prodotto dopo due settimane di maturazione a 6°C.

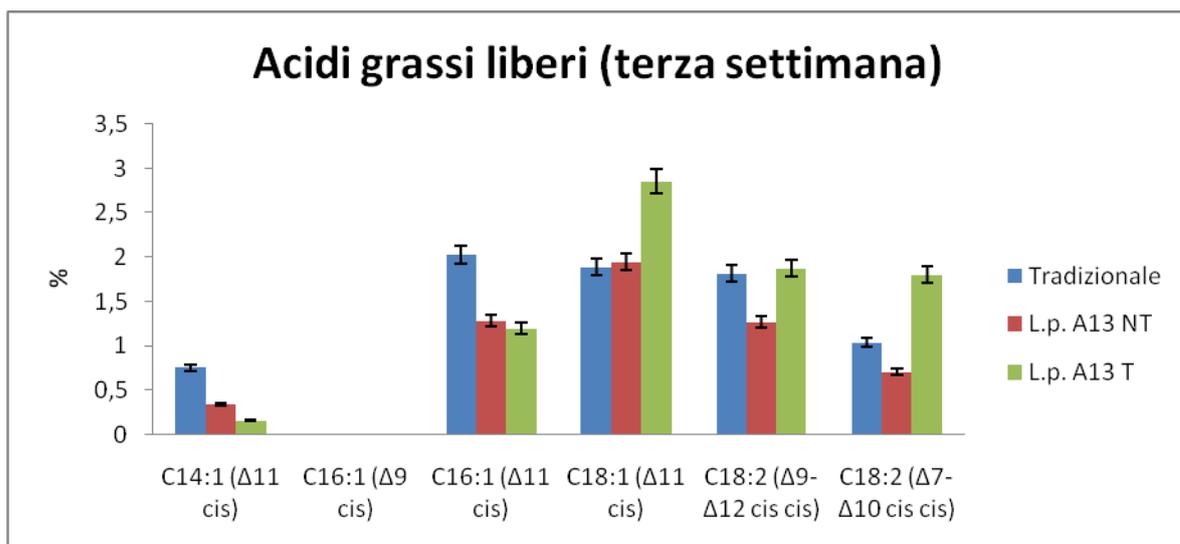
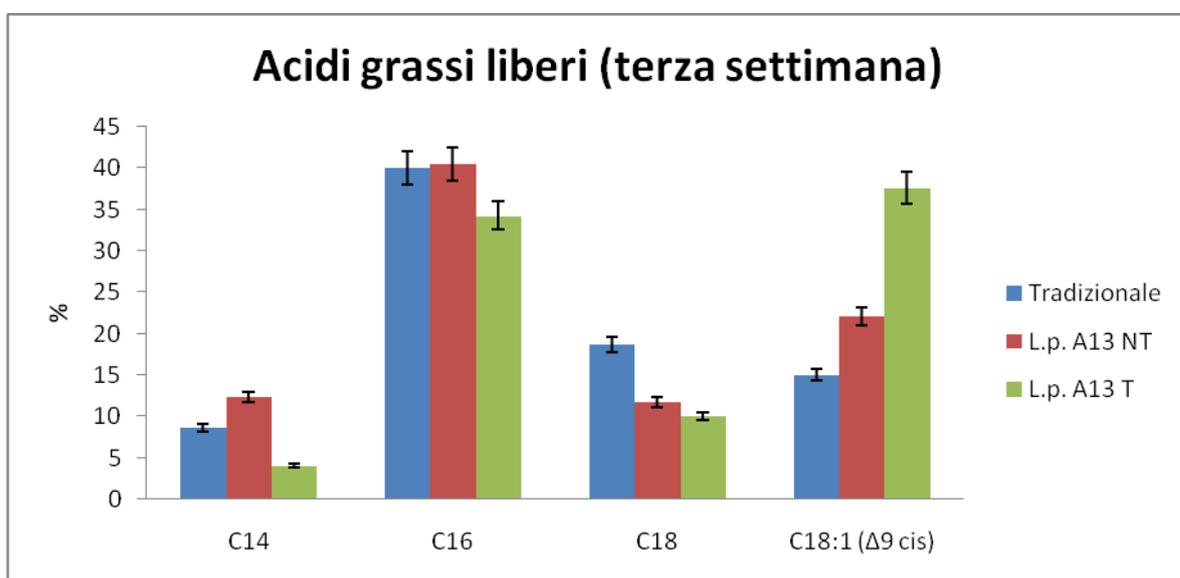
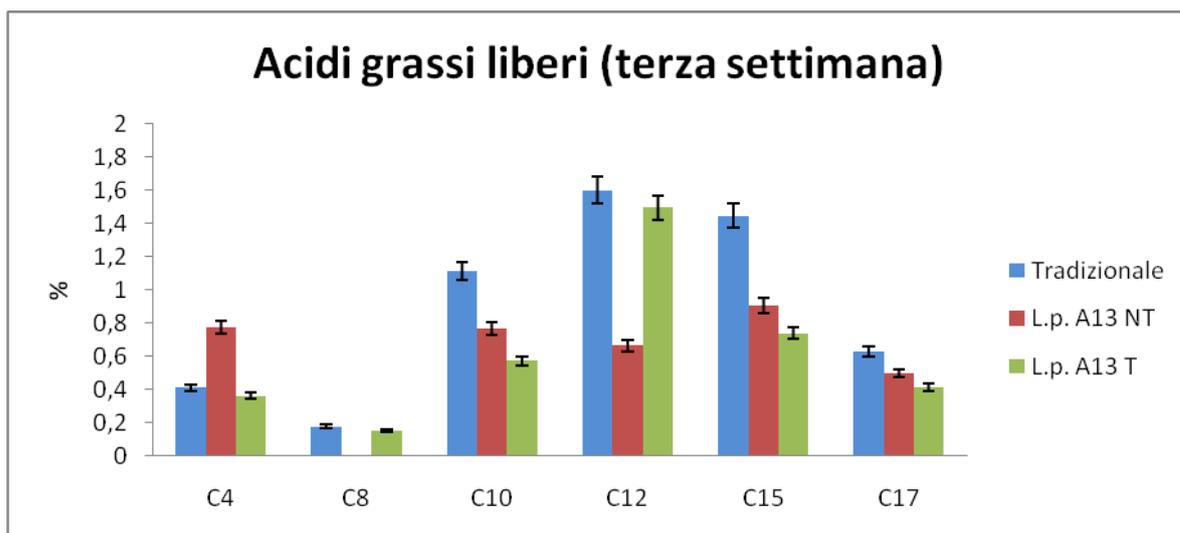


Figure 5.7, 5.8 e 5.9: Percentuali relative dei principali acidi grassi liberi riscontrati nelle tre tipologie di prodotto dopo tre settimane di maturazione a 6°C.

	24 ore			7g			14g			21g		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
hexanoic acid, 2-hydroxy, methyl ester	0.562	3.032	2.479	-*	15.301	13.141	4.967	11.79	1.79	25.772	8.576	2.959
butanedioic acid, dimethyl ester	0.61	3.131	2.158	-	1.366	1.535	1.777	1.649	2.865	2.857	2.056	2.25
C8:0	0.708	2.773	0.845	15.344	1.667	0.748	-	-	1.182	0.017	-	0.012
hexanedioic acid dimethyl ester	0.877	4.585	0.636	11.043	-	0.321	-	-	-	-	-	-
C10:0	1.011	7.527	0.894	12.047	2.386	1.336	2.476	2.112	1.893	4.178	1.102	1.911
nonanoic acid, 9-oxo, methyl ester	0.831	2.192	3.885	9.905	7.878	2.362	1.939	-	0.767	0.522	0.434	8.961
octanedioic acid, dimethyl ester	0.156	0.601	0.166	1.752	-	0.711	0.737	2.867	8.85	-	-	-
undecanoic acid, ethyl ester	-	-	-	2.967	0.937	1.065	1.094	0.618	1.211	1.074	1.802	1.224
C12:0	0.734	2.967	0.754	9.013	2.856	0.818	3.131	5.078	4.973	5.991	0.953	4.991
C14:1 (cis 11)	0.016	0.149	0.024	0.196	-	0.009	0.024	0.037	0.015	0.063	0.011	0.012
C14:0	14.500	65.833	19.279	180.783	37.243	11.103	17.185	21.41	12.852	31.721	1	13.276
C15:0 iso	0.414	2.276	-	5.353	-	-	-	-	-	-	-	-
C15:0 anteiso	0.766	4.705	0.496	10.146	-	0.526	-	1.809	2.035	-	0.588	2.028
C15:0	2.691	17.871	2.173	33.211	7.577	2.388	2.773	6.552	4.154	10.386	2.483	4.741
C16:0 iso	0.424	2.538	-	5.728	1.779	-	-	1.763	-	-	-	-
C16:1 (cis-9)	0.552	3.284	-	7.075	6.316	0.714	-	3.843	1.445	-	-	-
C16:1 (cis-11)	2.29	16.8	2.28	28.92	20.607	3.976	2.237	11.039	5.934	11.294	2.724	5.94
C16:0	31.323	1	84.465	390.317	8	48.595	43.774	75.535	60.966	80.736	6	61.512
C 17:0 iso	0.413	2.257	-	5.093	6.82	-	-	1.285	-	-	-	-
Hexadecanoic acid ethyl ester	0.392	1.233	-	4.933	-	-	-	-	-	-	-	-
C 17:0 anteiso	0.829	4.655	2.048	10.501	9.257	-	-	-	-	-	-	-
cyclopropanenonan oic acid, 2-hexyl, methyl ester	0.435	2.789	-	5.042	8.411	-	-	1.177	-	-	-	-
C17:0	1.472	7.004	1.453	18.689	13.523	2.476	-	3.338	3.148	4.369	1.327	2.574
C18:2 (cis-9, 12)	1.256	7.473	3.544	16.014	17.834	2.455	2.501	7.447	4.164	4.804	1.285	4.393
C18:1 (cis-9)	8.219	30.781	25.927	102.546	4	20.892	10.208	67.523	3.055	21.232	11.92	47.284
C18:1 (cis-11)	0.473	2.468	0.629	5.765	16.243	1.879	-	5.424	3.883	2.668	1.05	3.588
C18:1 (trans-9)	0.374	2.335	-	4.635	6.091	-	-	-	9.115	2.074	-	-
C18:1 (trans-11)	0.127	-	-	1.331	-	-	-	-	10.717	-	-	-
C18:0	10.377	50.028	12.909	129.13	56.29	15.757	21.412	16.006	5.819	24.087	5.768	11.494
C18:2 (cis-cis-7, 10)	0.467	2.784	1.101	5.924	4.446	1.285	2.184	2.13	13.455	2.74	0.71	4.238
cyclopropaneoctano ic acid, 2-octil, methyl ester	-	-	-	-	32.593	1.496	-	11.626	39.491	-	-	-
11-eicosenoic acid, methyl ester	-	-	-	-	-	-	-	8.608	3.715	-	-	-
Totale ppm	83.30	400.95	168.15	1033.40	707.81	135.60	118.43	270.68	207.51	236.58	91.27	183.39

Tabella 5.5: concentrazione degli acidi grassi liberi nelle tre diverse caciotte durante la maturazione.

5.5 Valutazione della proteolisi

Nelle tre tipologie di prodotto sono state analizzati i profili proteolitici in rapporto all'addizione o meno di *L. paracasei*. A13 trattato e non dopo 1, 7, 14 e 21 giorni di maturazione. Nella figura 5.10 sono riportati i profili elettroforetici ottenuti mediante SDS-page della frazione solubile a pH 4.6. Il profilo proteolitico della caciotta di controllo dopo 1 giorno dalla produzione evidenzia l'assenza di bande tra 250 e 75 chilo-dalton (kDa), la presenza di bande molto deboli tra 75 e 28 kDa, due bande molto marcate a 25 e 20 kDa e la presenza di bande a basso peso molecolare di limitata entità. Completamente diversi sono i profili dei prodotti ottenuti con il ceppo A13 non trattato e trattato. I primi si caratterizzano per una maggiore intensità rispetto al controllo di bande comprese tra i 75 e i 37 kDa mentre i secondi mostrano anche un'evidente banda a 100 kDa oltre ad un'accentuazione dell'intensità delle bande tra 75 e 37 kDa rispetto al prodotto ottenuto con il ceppo non trattato.

Dopo 7, 14 e 21 giorni, nel controllo aumentano significativamente l'intensità delle bande ad elevati pesi molecolari a testimonianza di una proteolisi più lenta rispetto ai prodotti contenenti il ceppo probiotico, accompagnata dall'incremento delle intensità delle bande a pesi molecolari inferiori (tra 25 e 10 kDa). Nei prodotti contenenti il ceppo trattato e non la proteolisi è molto più accentuata come testimoniato dalla scomparsa nel tempo delle bande a basso peso molecolare e dall'attenuazione precoce delle bande a peso molecolare più alto (37-150 kDa).

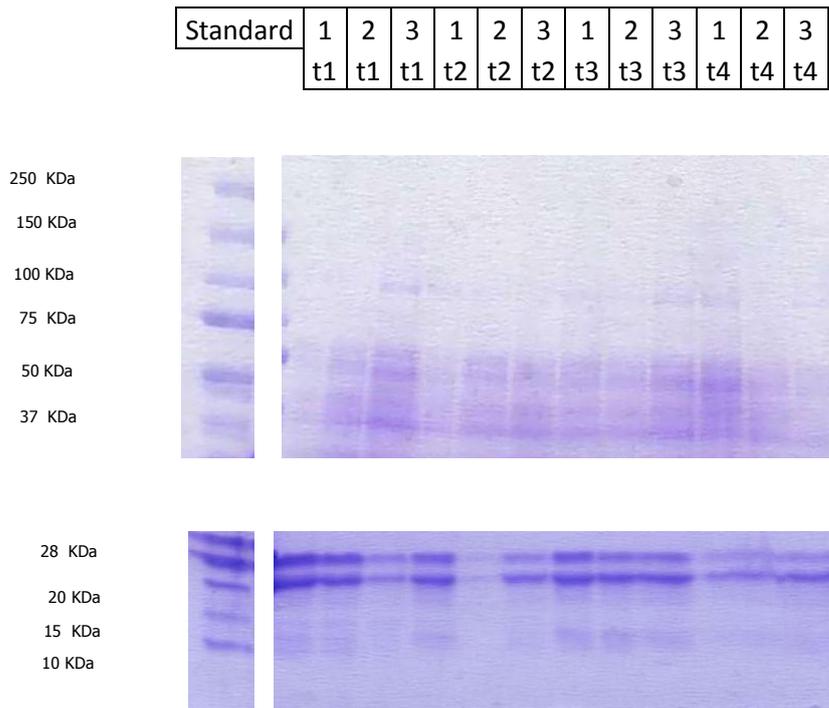


Figura 5.10: profili elettroforetici ottenuti mediante SDS-page della frazione solubile a pH 4.6

1 Caciotta tradizionale

2 Caciotta addizionata del probiotico senza trattamento HPH

3 Caciotta addizionata del probiotico e trattamento HPH

t1 24 ore dopo la cagliata

t2 7 giorni a 4°C

t3 14 giorni a 4°C

t4 21 giorni a 4°C

5.6 Analisi molecole volatili e panel test

Le molecole volatili sono state rilevate mediante GC-MS-SPME e i profili ottenuti per le diverse tipologie di caciotta ai diversi tempi di maturazione sono riportati in tabella 5.6.

Sono state rilevate 38 molecole appartenenti a classi di composti differenti quali alcoli, aldeidi, chetoni, acidi

	24 giorni			1 settimana			2 settimana			3 settimana		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Acetone	4.53	3.28	3.53	1.54	1.16	1.48	2.24	1.54	1.96	1.80	2.04	2.44
2 butanone	1.90	1.40	1.38	0.63	0.52	0.60	0.76	0.50	0.63	0.88	0.96	0.93
2,3-Butanedione	21.55	7.24	16.36	14.92	4.40	4.24	11.83	1.58	3.80	7.97	2.54	2.92
2-pentanone	0.00	4.65	0.00	0.00	4.19	3.18	0.00	5.63	4.23	2.14	4.08	3.99
2,3 pentanedione	0.00	0.29	0.99	5.33	0.42	0.64	4.08	0.51	0.67	0.60	0.48	0.63
2-heptanone	2.38	3.23	2.21	0.00	2.62	1.11	0.29	3.51	2.13	4.76	1.45	1.26
2-butanone, 3-hydroxy	34.47	27.92	26.91	33.47	29.86	33.14	40.63	28.51	33.53	41.88	36.09	41.43
2-propanone, 1-hydroxy	1.48	0.73	0.00	0.23	0.00	0.13	-*	0.14	0.07	-	-	0.71
2-nonanone	0.84	0.62	0.30	0.00	0.85	0.48	-	1.28	0.52	1.21	0.48	0.45
Chetoni	67.16	49.35	51.68	56.11	44.02	45.00	59.82	43.21	47.53	61.23	48.11	54.76
hexanal	1.46	0.69	0.84	0.94	0.43	0.67	1.63	1.17	1.08	0.56	1.33	0.61
heptanal	-	-	-	1.65	-	0.82	0.98	0.61	0.28	-	0.66	0.39
octanale	-	-	-	1.29	-	0.22	-	0.38	-	0.07	-	0.21
nonanal	0.00	0.49	0.43	6.60	1.95	4.15	2.22	1.58	1.55	0.43	0.47	0.50
furfurale	-	-	-	0.72	-	0.21	0.27	0.31	0.20	0.20	0.22	0.21
dodecanal	0.36	0.31	0.23	-	-	-	0.58	0.21	0.45	-	-	-
benzaldehyde	0.47	0.46	0.28	0.42	0.34	0.28	-	0.08	-	0.19	0.21	0.20
Aldeidi	2.29	1.96	1.78	11.62	2.72	6.35	5.67	4.34	3.56	1.45	2.89	2.11
Ethyl alcohol	3.84	1.96	1.75	0.81	0.70	0.56	0.98	0.56	0.67	0.98	1.19	1.08
1-butanol	0.34	0.18	0.00	0.39	0.00	0.24	0.27	0.33	0.23	0.51	0.38	0.44
1-butanol, 3-methyl	1.34	0.87	1.18	1.35	0.48	0.44	0.33	0.33	0.30	0.29	0.16	0.38
1-pentanol	0.47	0.34	0.34	0.36	0.21	0.16	0.29	0.26	0.28	0.37	0.35	0.00
3-buten-1-ol,3methyl-	-	-	-	-	0.17	0.14	0.16	0.17	0.28	0.36	0.25	0.19
2-buten-1-ol.2-methyl	0.60	0.40	0.52	0.32	0.31	0.32	0.24	0.38	0.37	0.50	0.57	0.44
2-propanol,1-butoxy-	-	-	0.92	-	0.15	0.34	-	0.12	0.41	0.26	0.52	-
1-hexanol	-	-	-	1.45	0.34	0.19	0.90	0.64	0.40	0.78	0.38	0.41
3-pentanol	4.89	10.14	9.29	4.93	8.77	9.49	5.97	8.69	8.85	6.38	8.64	8.50
isopropyl alcohol	2.20	5.89	5.48	2.01	4.98	5.37	2.65	4.98	5.15	3.70	4.84	4.69
Alcoli	13.68	19.78	19.48	11.62	16.12	17.25	11.79	16.46	16.93	14.13	17.28	16.12
acetic acid	1.30	15.34	10.99	5.22	20.76	16.97	7.54	21.13	18.96	9.76	16.68	14.85
butanoic acid	0.58	1.39	1.58	2.24	2.68	2.92	2.42	2.12	2.69	2.88	2.88	2.54
hexanoic acid	0.57	0.94	0.94	1.66	1.93	1.52	1.26	1.10	1.24	1.14	1.11	1.05
octanoic acid	0.24	0.70	0.61	0.95	1.01	0.84	0.67	0.47	0.65	0.49	0.45	0.50
sorbic acid	0.00	0.00	0.00	0.59	3.63	2.23	1.07	1.66	1.30	1.56	0.71	0.71
decanoic acid	0.28	0.00	0.00	0.57	0.23	0.44	0.34	0.34	0.00	0.22	0.17	0.21
Acidi	2.97	18.37	14.12	11.22	30.26	24.90	13.29	26.83	24.84	16.05	22.00	19.86
Altro	7.86	5.03	6.80	6.76	4.05	4.72	7.81	7.87	6.03	5.40	6.12	5.03

Tabella 5.6: Composti volatili (in % sull'area assoluta) rilevati nelle tre diverse caciotte in maturazione. Le molecole identificate rappresentano oltre il 93% delle aree totali dei picchi nei diversi campioni. Le deviazioni standard non superavano mai il 5% dell'area del picco. *: Sotto il limite di determinazione.

Una prima analisi della tabella indica chiaramente il marcato effetto dell'aggiunta del probiotico sul profilo in molecole volatili rilevato. Anche il trattamento ha apportato un contributo alla caratterizzazione del profilo in metaboliti volatili, modificando significativamente i rapporti relativi tra le molecole rilevate. Questo aspetto viene meglio evidenziato dalla figura 5.11, ottenuta mediante principal component analysis. Nella figura 5.12 le tre tipologie di caciotta, dopo 24 ore di maturazione, sono chiaramente differenziate lungo la componente 2 che spiega il 18% della varianza. Le caciotte analizzate a tempi di maturazione maggiori si differenziano lungo la componente 1 da quelle analizzate dopo un giorno di maturazione a 6°C. Importante sottolineare che le caciotte tradizionali a tempo di maturazione 7 e 14 giorni si discostano significativamente lungo la componente 2 da tutte quelle caratterizzate dalla presenza di *L. paracasei* A13, trattato o meno, e dalla caciotta tradizionale maturata per 21 giorni. Questo sembra indicare che la presenza del probiotico induca più precocemente l'acquisizione del profilo in molecole volatili caratteristico della caciotta tradizionale matura. In particolare nella figura 5.11 sono evidenziati i composti che determinano la differenziazione (distribuzione lungo la componente 1 e 2) delle diverse tipologie di prodotto in rapporto al tempo di maturazione.

I metaboliti che caratterizzano le diverse tipologie di caciotta dopo 21 giorni di maturazione a 6°C sono meglio riportati nelle figure 5.11. Più specificatamente per quel che riguarda i chetoni la caciotta tradizionale si caratterizza per la maggior presenza di 2,3 butanedione, 2-heptanone, 2-nonanone, molecole prodotte invece in uguale ma minore misura nelle caciotte contenenti il probiotico trattato o non. 2 butanone, 1 pentanone e acetone caratterizzano la caciotta contenente il probiotico non trattato mentre la caciotta addizionata di *L. paracasei* A13 trattato ad alta pressione si caratterizzava per la maggior presenza di 2-idrossi-propanone.

Dall'analisi PCA degli alcoli figure 5.13 5.14 rilevati nelle tre diverse tipologie di caciotta, emerge che la caciotta contenente il probiotico non trattato è caratterizzata da una maggiore presenza di 3-pentanololo, etanololo, 2-metil buten-olo, 1 butoxi propanolo mentre il trattamento del probiotico induce una significativa riduzione degli alcoli rilevati ma la maggiore presenza di 3-metil butanololo,

precursore di acido isovalerico. In figura 5.15 è riportata la distribuzione lungo le componenti 1 e 2 degli acidi rilevati nei profili in molecole volatili delle tre tipologie di caciotta. Interessante notare che la presenza dell'acido sorbico, conservante notoriamente utilizzato per impedire lo sviluppo di lieviti e muffe in formaggi, sia maggiormente presente nel prodotto tradizionale figura 5.16. Bisogna ricordare che l'analisi è stata effettuata prelevando i campioni per l'analisi ad un centimetro della crosta. Questo indica che nel prodotto tradizionale avviene una maggior penetrazione di questo conservante e, conseguentemente, una maggiore assunzione da parte del consumatore. Inoltre, si evince chiaramente l'influenza del metabolismo di *L. paracasei* sulla caratterizzazione del prodotto in termini di accumulo di acido acetico prodotto significativamente nella caciotta addizionata di probiotico non trattato e, in minor misura, in quella ottenuta dal probiotico trattato ad alta pressione. D'altra parte il trattamento iperbarico è riportato modificare, in maniera dipendente dalla specie e dal ceppo, i prodotti del metabolismo primario (Lanciotti et al., 2007). Questo è particolarmente interessante da un punto di vista applicativo perché in grado di ridurre i fenomeni di iper-acidificazione legati alla presenza di probiotici (figure 5.15, 5.16). D'altra parte la marcata presenza di acido acetico nella caciotta addizionata del probiotico non trattato è stata rilevata anche mediante panel test allestito dopo 21 giorni di maturazione come dimostrano le figure 5.17 e 5.18. Questo prodotto si caratterizza anche per la minore dolcezza e la maggiore consistenza. Per contro la caciotta addizionata di *L. paracasei* A13 trattato è risultata la più dolce e meno acida, con aroma e odore più marcati ed, in generale, caratterizzata da un miglior apprezzamento generale.

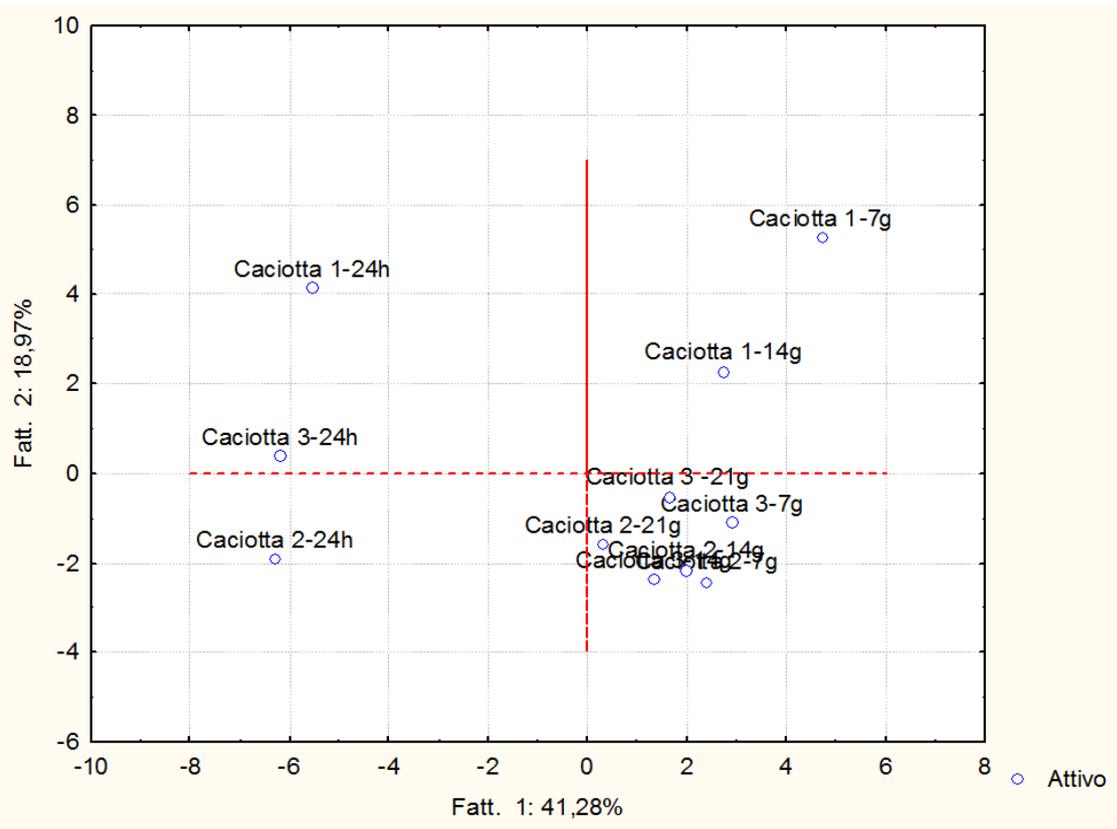
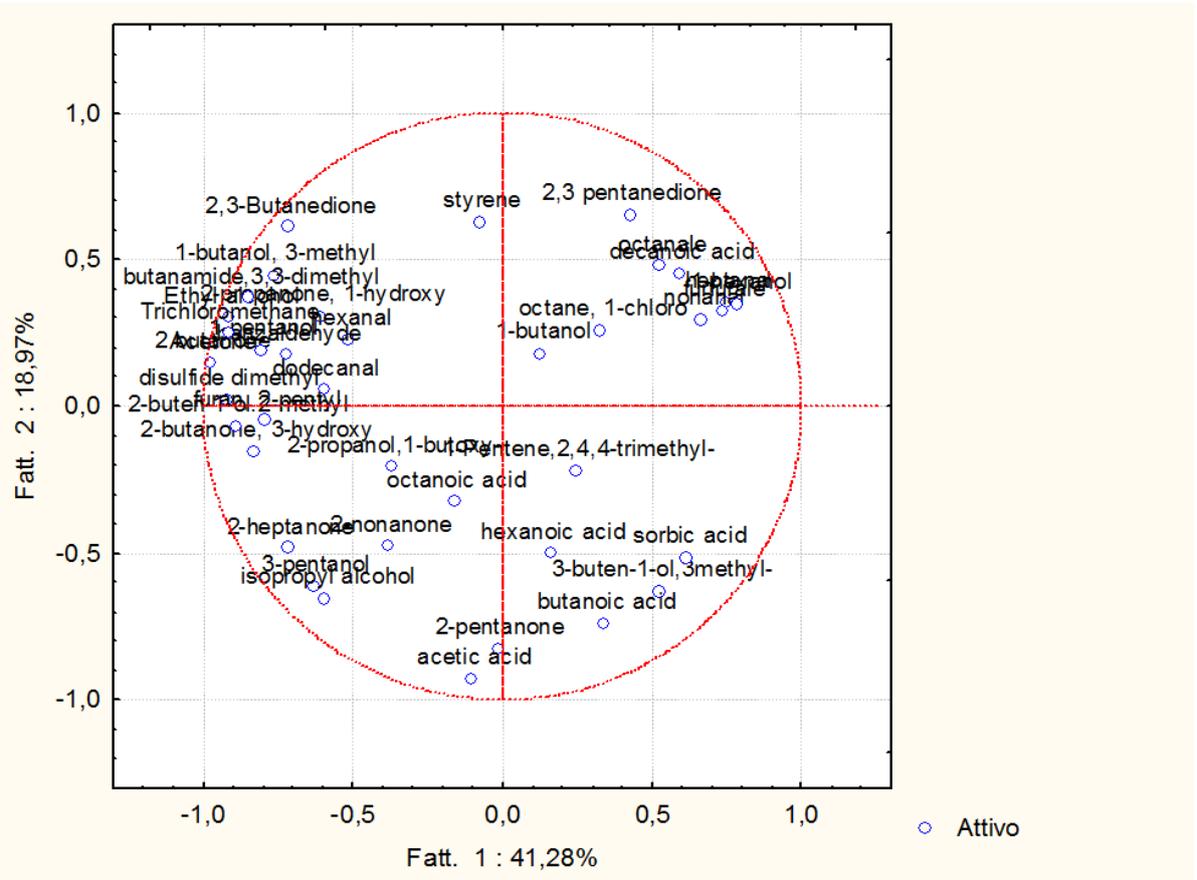


Figura 5.11 e 5.12: Analisi PCA (Principal Component Analysis) dei composti volatili rilevati.

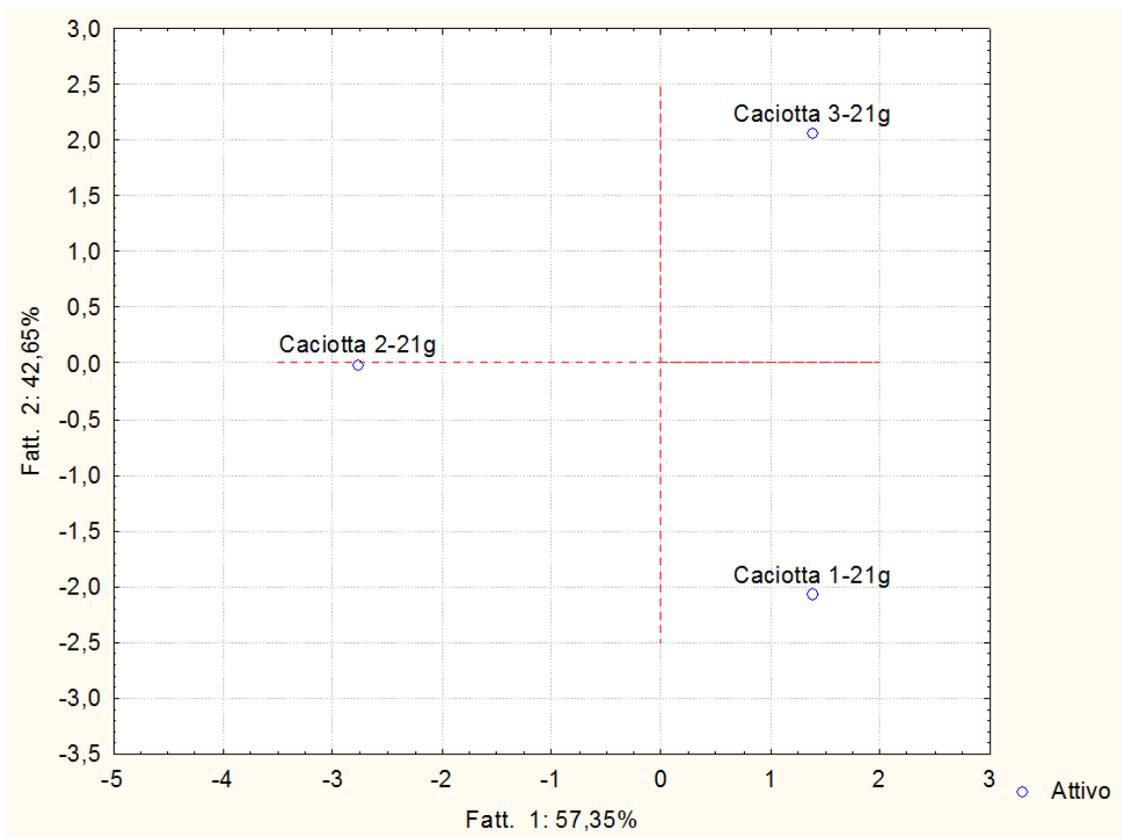
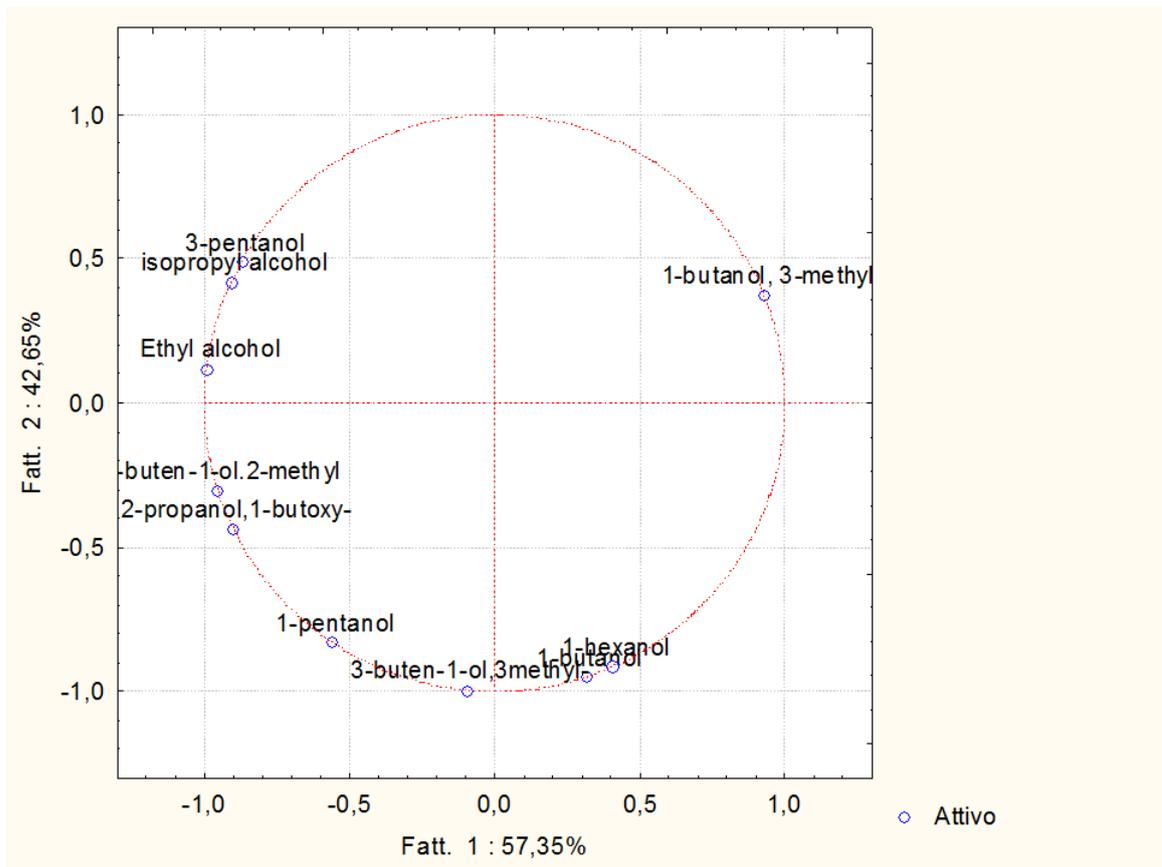


Figura 5.13 e 5.14: Analisi PCA degli alcoli rilevati nelle tre diverse tipologie di caciotta dopo 21 giorni di maturazione.

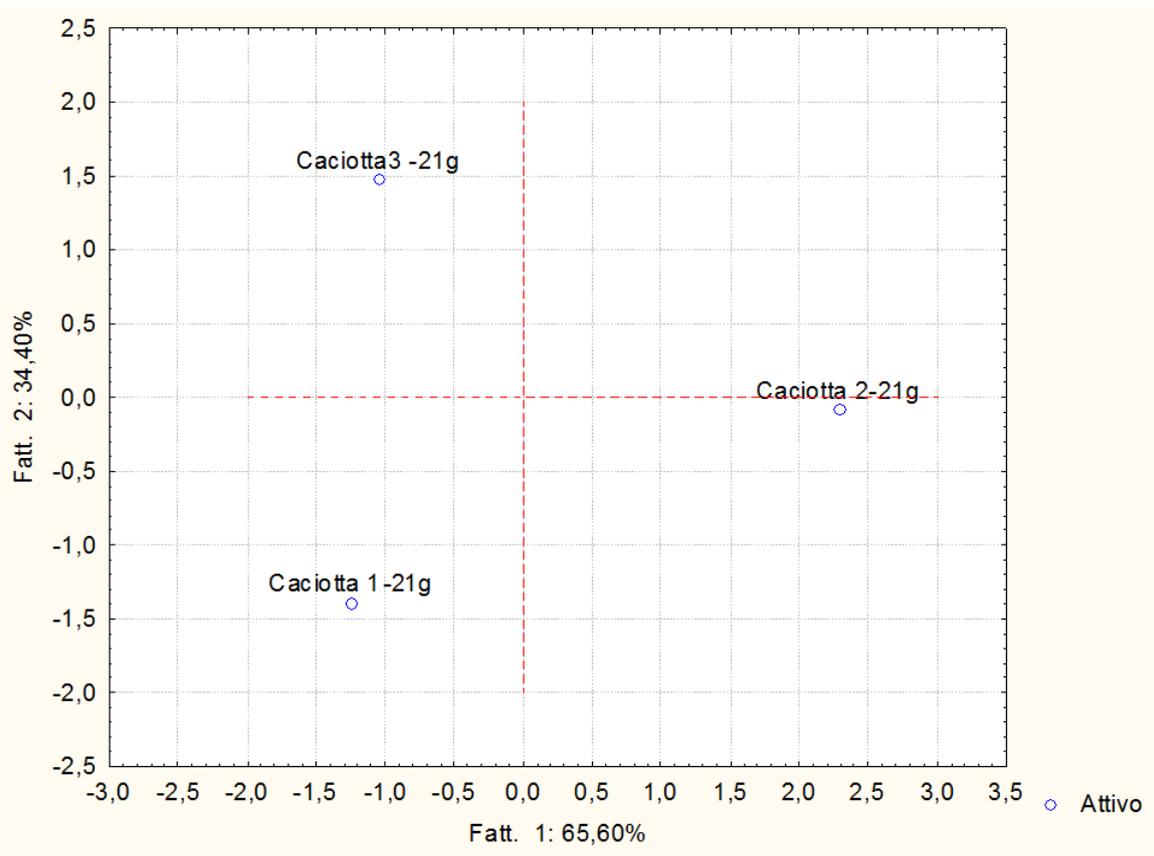
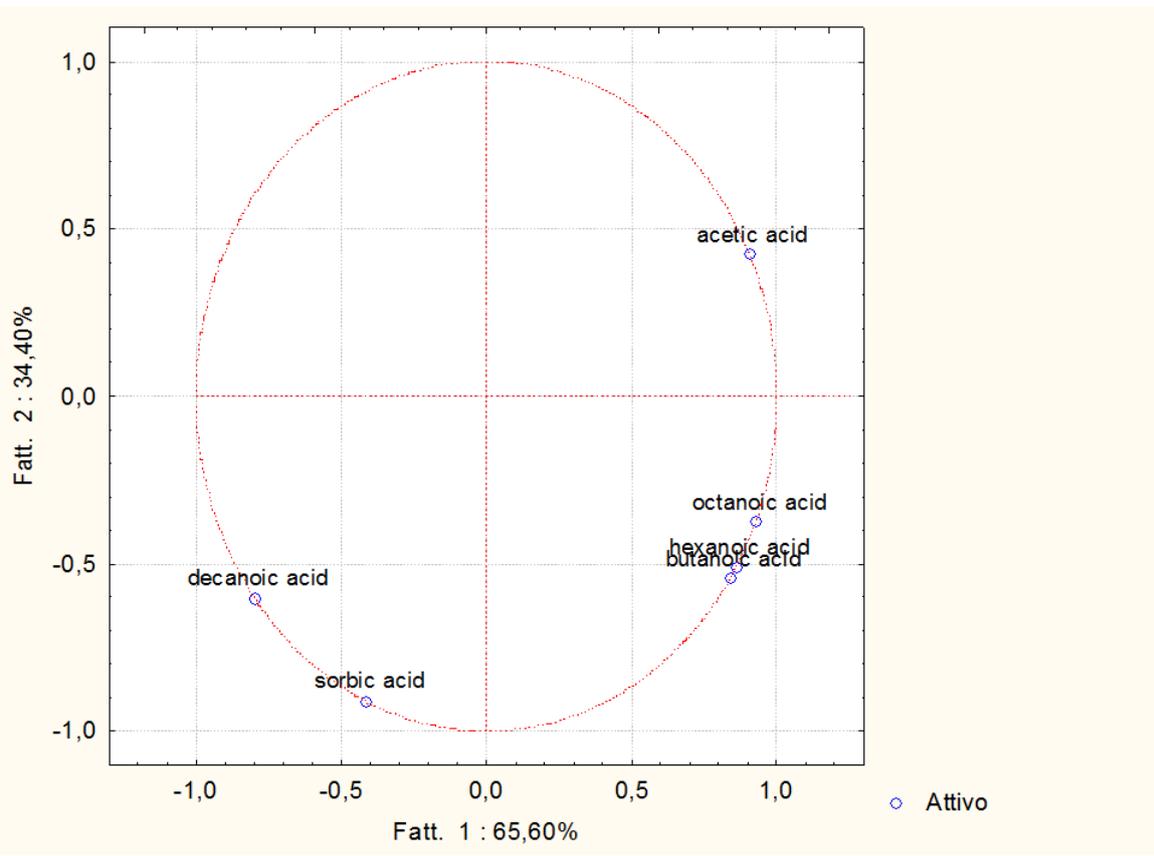


Figura 5.15 e 5.16: Analisi PCA degli acidi rilevati nelle tre diverse tipologie di caciotta dopo 21 giorni di maturazione.

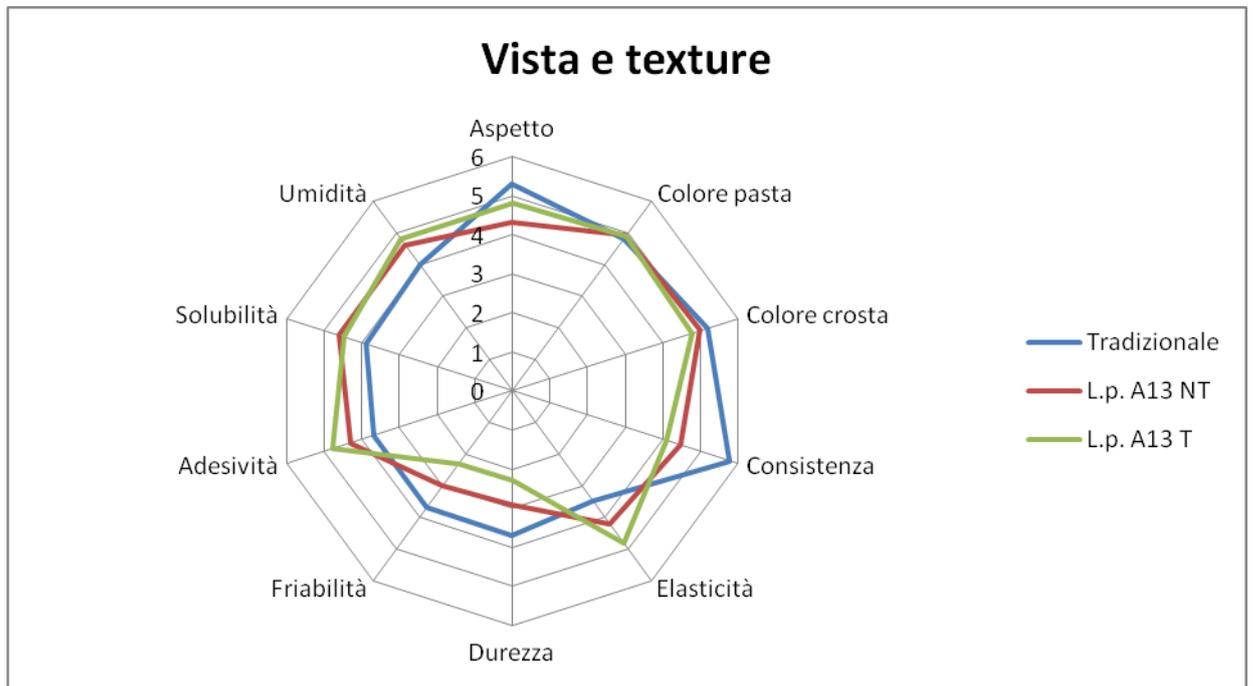


Figura 5.17: Risultati dell'esame visivo e della texture del panel test.

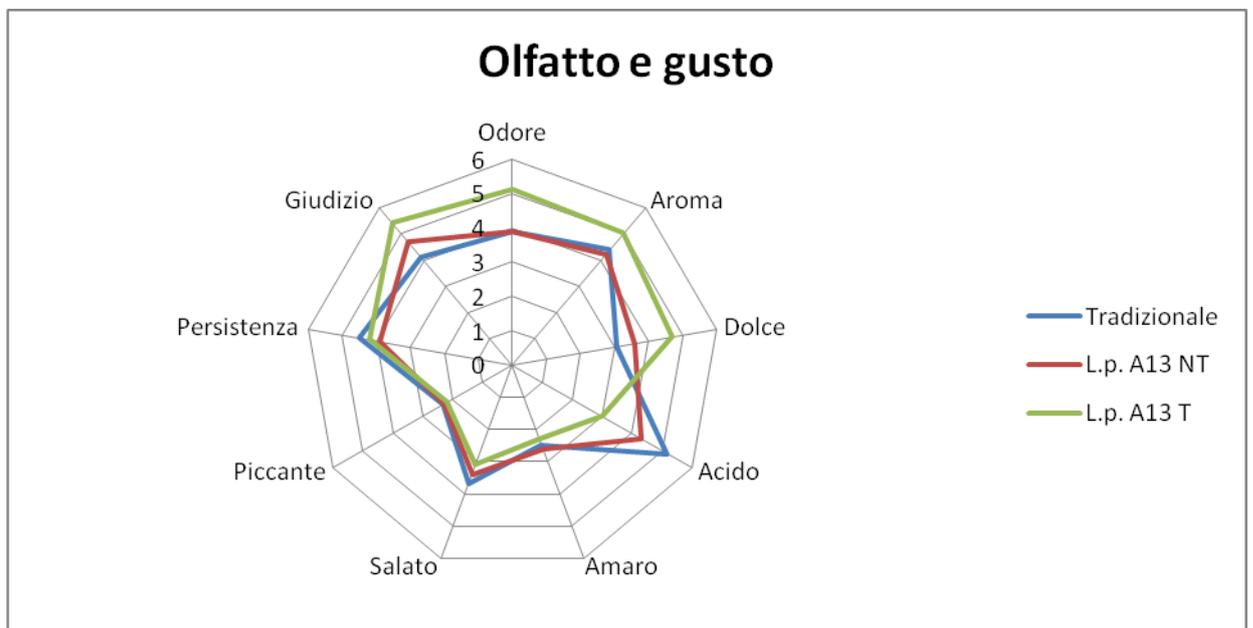


Figura 5.18: Risultati dell'esame gustativo e olfattivo del panel test.

5.7 Analisi del contenuto di amine biogene

Il contenuto di amine biogene è sotto il limite di rilevabilità dello strumento (2ppm in questo tipo di analisi) in tutte tre le tipologie di caciotta a tutti i tempi di maturazione.

Capitolo 6

Conclusioni

I prodotti lattiero-caseari fermentati, sono percepiti dai consumatori, come positivi perché rappresentano una buona fonte di vitamine e minerali. Il contenuto nutrizionale e la digeribilità dei prodotti lattiero-caseari fermentati sono spesso aumentati dagli starter utilizzati i quali non costituiscono il microbiota umano intestinale e hanno spesso una sopravvivenza limitata dopo l'ingestione del prodotto. (Patrignani et al 2007).

L'introduzione di microrganismi probiotici in prodotti lattiero caseari fermentati, ha contribuito ad aumentare le acclamate proprietà funzionali di questi prodotti e ne ha aumentato il consumo. Rispetto ai latti fermentati, che sono uno dei più comuni carrier di microrganismi probiotici, formaggi a breve maturazione quali crescenza e caciotte poco stagionate (massimo 30 giorni), hanno dimostrato essere migliori perché non sono necessari prolungati periodi di conservazione refrigerata e per il maggiore potere tampone e protettivo durante il transito gastro-intestinale della matrice. Oltre agli effetti in grado di promuovere la salute del consumatore, anche altre proprietà quali il livello di acidità, il contenuto in acidi grassi, la produzione di composti d'aroma, il profilo sensoriale e il valore

nutrizionale, contribuiscono ad influenzare le scelte del consumatore. Per tanto alla base della selezione degli starter o co-starter si deve tenere conto della loro capacità di impartire al prodotto buone caratteristiche sensoriali (Mattila-sandholm et al 2002). In generale i prodotti fermentati ottenuti da microrganismi probiotici utilizzati come starter sono spesso caratterizzati dalla mancanza di caratteristiche sensoriali e di texture positive e da iperacidificazione (Gobbetti e nostri). Al fine di migliorare le proprietà organolettiche di tali prodotti sono state proposte diverse strategie che prevedono la produzione di esopolisaccaridi o il co-inoculo di microrganismi probiotici con gli starter classici di fermentazione. Inoltre i dati della letteratura indicano anche il ruolo positivo delle alte pressioni di omogeneizzazione applicate al latte per aumentare o modulare la viscosità di prodotti lattiero-caseari fermentati senza effetti sulla loro shelf-life e sicurezza. E' riportato anche che l'alta pressione di omogeneizzazione applicata al latte per la caseificazione sia in grado di meglio supportare o mantenere la vitalità di microrganismi probiotici addizionati grazie alla precoce liberazione nel sistema di aminoacidi e acidi grassi liberi (Burns et al 2008) di importanza fondamentale per la crescita di batteri lattici. Inoltre studi recenti hanno dimostrato che l'applicazione di livelli sub-letali di pressioni di omogeneizzazione a ceppi di batteri lattici, è in grado di modificarne i profili metabolici ed idrolitici.

L'applicazione di un trattamento sub-letale al ceppo di *L. paracasei* A13 ha consentito di incrementare la resistenza al transito gastrico-intestinale per lo meno nei prodotti maturati fino a 14 giorni, mantenendo inalterata la sua vitalità nel prodotto. Quest'ultima scende a livelli di circa 5 log UFC/g solo dopo 21 giorni di maturazione. Inoltre, il trattamento iperbarico ha altresì permesso di accelerare la maturazione delle caciotte ottenute, come evidenziato dalla precoce proteolisi e lipolisi, e di conseguire, già tra 7 e 14 giorni, un profilo in molecole volatili molto simile a quello della caciotta tradizionale matura (21 giorni) senza i fenomeni di iper-acidificazione e difetti sensoriali associati alla presenza del ceppo non trattato. Per tanto questo dimostra le grandi potenzialità applicative del trattamento iperbarico adottato per la produzione di formaggi probiotici a breve maturazione. I dati ottenuti hanno infatti dimostrato che questa tecnologia aumenta

significativamente la sostenibilità dell'intero processo, riducendo i tempi di maturazione in condizioni di refrigerazione. Inoltre i dati sensoriali e i profili in molecole volatili hanno dimostrato che la tecnologia applicata non è solo in grado di differenziare il prodotto dal tradizionale, contribuendo ad allargare la disponibilità sul mercato di prodotti probiotici, ma anche di migliorarlo significativamente.

Bibliografia

Anon, 1999, Fermented Milks flow from Japan to Europe, Fod Industry Bulletin 126, 1-3.

Axelsson L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. Pages 1-72 in Lactic Acid Bacteria; Microbiology and Functional Aspects. S. Salminen and A. Von Wright, ed. Marcel Dekker Inc., New York, NY.

Baldwin C.V., and Robinson C.W., 1990. Disruption of *Saccharomyces cerevisiae* using enzymatic lysis combined with high- pressure homogenization. Biotechnol. Technol. 4, 329-334

Baldwin C.V., and Robinson C.W., 1994. Enhanced disruption of *Candida utilis* using enzymatic pretreatment and high-pressure homogenization. Biotechnol. Bioeng. 43, 46-56.

Basson A. Flemming L.A. and Chenia H.Y., 2007. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *Flavobacterium johnsoniae*-Like Isolates. Microb. Ecol. 55, 1-14.

Benno Y., Mitsouka T., 1986, Development of intestinal microflora in humans and animals, Bifidobacteria Microflora 5, 13-25.

Blanchette L., Roy D., Belanger G. & Gauthier S.F., 1996. Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria. Journal of Dairy Science 79, 8-15.

Boylston T.D., Vinderola C.G., Ghoddusi H.B. & Reinheimer J.A., 2004. Incorporation of Bifidobacterium into cheeses: Challenges and rewards. *International Dairy Journal*, 14, 375-387.

Buriti F.C.A., da Rocha J.S. & Saad S.M.I., 2005. Incorporation of *Lactobacillus acidophilus* in Minas fresh cheese and its implications for textural and sensorial properties during storage. *International Dairy Journal* 15, 1279-1288.

Burns P., Patrignani F., Serrazanetti D., Vinderola G., Reinheimer J.A., Lanciotti R. & Guerzoni M.E. 2008a Probiotic Crescenza cheese containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus* manufactured with high pressure-homogenized milk. *Journal of Dairy Science*, 91, 500-512.

Burns P., Vinderola G., Binetti A., Quiberoni A., de los Reyes-Gavila C.G., & Reinheimer J.A. 2008b. Bile-resistant derivatives obtained from non-intestinal dairy lactobacilli. *International Dairy Journal*, 18, 377–385.

Burns P., Vinderola G., Molinari F., & Reinheimer J.A. 2008c. Suitability of whey and buttermilk for the growth and frozen storage of probiotic lactobacilli. *International Journal of Dairy Technology*, 61, 2.

Burns P., Reinheimer J.A., & Vinderola G. 2011. Impact of bile salt adaptation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* 200 on its interaction capacity with the gut. *Research in Microbiology*, 162, 782-790.

Capurso G., Marignani M., Delle Fave G.D.. Probiotics and the incidence of colorectal cancer: when evidence is not evident. *Dig Liv Dis* 2006;38:S277-82.

Cheplin H., Rettger L., 1992, The Therapeutic Application of *Lactobacillus acidophilus*, *Abs. Bact.* 6, 24.

Chohendy M., 1906, Essais d'acclimatation Microbienne dans la Cavite Intestinale, C. R. Soc. Biol. 60, 364.

Corbo M.R., Albenzio M., De Angelis M., Sevi A. & Gobbetti M., 2001. Microbiological and biochemical properties of canestrato pugliese hard cheese supplemented with bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 84, 551-561.

Cueva O.A. 2009. Pulsed electric field influences on acid tolerance, bile tolerance, protease activity and growth characteristics of *Lactobacillus acidophilus* La-k. PhD Thesis.

De Ancos B., Cano M.P., Gomez R., 2000. Characteristics of stirred low fat yogurt as affected by high pressure. *International Dairy Journal*, 10, 105-111.

Desmond C., Ross R.P., O'Callaghan E., Fitzgerald G., Stanton C. 2002a. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. *Journal of Applied Microbiology* 93, 1003-1011.

Desmond C., Stanton C., Fitzgerald G., Collins K., Ross R.P., 2002b. Environmental adaptation of probiotic lactobacilli towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 12, 183-190.

Diels A.M.J., Callewaert L., Wuytack E.Y., Masschalck B., and Michiels C.W., 2004. Moderate temperatures affect *Escherichia coli* inactivation by high-pressure homogenization only through fluid viscosity. *Biotechnol. Prog.* 20, 1512-1517.

Diels A.M.J., Callewaert L., Wuytack E.Y., Masschalck B., and Michiels C.W., 2005a. Inactivation of *E. coli* by high-pressure homogenization is influenced by fluid viscosity but not by water activity and product composition. *Int. J. Food Microbiol.* 101, 281-291.

Diels A.M.J., De Taye J., and Michiels C.W., 2005b. Sensitization of *Escherichia coli* to antibacterial peptides and enzymes by high-pressure homogenization. *Int. J. Food Microbiol.* 105, 165-175.

Diels A.M.J. & Michiels C., 2006. High-Pressure Homogenization as a non-thermal technique for the Inactivation of Microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*, 32, 201-216.

Doulah M.S., Hammond T.H., and Brookman J.S.G., 1975. A hydrodynamic mechanism for the disintegration of *Saccharomyces cerevisiae* in an industrial homogenizer. *Biotechnol. Bioeng.* 17, 845-858.

Duchmann R., Kaiser I., Hermann E., Mayet W., Ewe K., Meyer zum Bueschenfelde K.H., 1995, Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease, *Clinical and Experimental Immunology*, 448-455.

Elmstahl S., Svensson U., Berglund G., 1999, Fermented Milk Products are Associated to Ulcer Disease. Results from a Cross-sectional Population Study, *European Journal of Clinical Nutrition* 52, 668-674.

Engler C.R., and Robinson C.W., 1981. Disruption of *Candida utilis* cells in high pressure flow devices. *Biotechnol. Bioeng.* 23, 765-780.

FAO/WHO 2002. Evaluation of Probiotics in Food. Report from FAO/WHO Expert Consultation, 30 April-1 May, 2002, Ontario, Canada.

Feijoo, S.C., Hayes, W.W., Watson, C.E., and Martin, J.H., 1997. Effect of microfluidizer technology on *Bacillus licheniformis* spores in ice cream mix. *J. Dairy Sci.* 80, 2184-2187.

Fuller R.J., 1989, Probiotics in Man and Animals, *Applied Bacteriology* 66, 365-378.

Garcia-Risco M., Ramos M., & Lopez-Fandino R., 2002. Modifications in milk proteins induced by heat treatment and homogenization and their influence on susceptibility to proteolysis. *International Dairy Journal* 12, 679-688.

Gibson G.R., Roberfroid M.B., 1995, Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics, *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.

Gobbetti, M., Corsetti, A. Smacchi, E., Zocchetti, A. & De Angelis, M., 1998. Production of Crescenza cheese by incorporation of bifidobacteria. *Journal of Dairy Science*, 81, 37-47.

Gomes A.M.P., Malcata F.X., Klaver F.A.M. & Grande H.J., 1995. Incorporation and survival of *Bifidobacterium* sp. strain Boand *Lactobacillus acidophilus* strain Ki in a cheese product. *Neth. Milk Dairy Journal* 49, 71-95.

Gomes A.M.P. & Malcata F.X., 1999. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science and Technology* 10, 139-157.

Gordon D., Macrae J., Wheater D., 1957, A *Lactobacillus* Preparation for use with Antibiotics, *The Lancet*, May, 899-901.

Groenlund M.M., Arvilommi H., Kero P., Lehtonen O.P., Isolauri E., 2000, Importance of intestinal colonization in the maturation of humoral immunity in early infancy: a prospective follow up study of healthy infants aged 0-6 months, *Archives of Diseases in Children* 83, F186-F192.

Grzeskowiak, L., Isolauri, E., Salminen, S., Gueimonde, M., 2011. Manufacturing process influences properties of probiotic bacteria. *British Journal of Nutrition* 105, 887–894.

Guarner F., Malagelada J.R., 2003. Gut flora in health and disease. *Lancet* 34, S19-24.

Guerzoni M.E., Chaves Lopez C., Vannini L., Lanciotti R., Westall F., 1996. High pressure homogenization of egg products. Status and products decontamination and preservation of poultry and egg products. *Atti del Cost Action 97 – Status and prospects of decontamination and prevention of poultry meat and egg products*. Ploufragan, Francia.

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

Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F. & Suzzi G., 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 69, 79-89.

Haque A., Richardson R.K. & Morris E.R., 2001. Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids*, 15, 593-602.

Harrison S.T.L., Chase H.A., and Dennis J.S. 1991. The disruption of *Alcaligenes eutrophus* by high pressure homogenization: key factors involved in the process. *Bioseparation* 2, 155-166

Hawley H., Shepherd P., Wheather D., 1959, Factors Affecting the Implantation of Lactobacilli in the Intestine, *J. Bacteriol.*, 62, 771-777.

Hayes M.G. & Kelly A.L., 2003. High pressure homogenisation of raw whole bovine milk (a) effects on fat globules size and other properties. *Journal of Dairy Research*, 70, 297-305.

He F., Ouwehand A., Isolauri E., Hosoda M., Benno Y., Slinem S., 2001, Differences in composition and mucosal adhesion of bifidobacteria isolated from healthy adults and healthy seniors, *Current Microbiology* 43, 351-354.

Heller K.J., Bockelmann W., Schrezenmeir J., & de Vrese M., 2003. Cheese and its potential as a probiotic food. In E. R. Farnworth (ed.), *Handbook of Fermented Functional Foods* (203-225). Boca Raton, FL: CRC Press.

Holscher H.D., Czerkies L.A., Cekola P., Litov R., Benbow M., Santema S., Alexander D.D., Perez V., Sun S., Saavedra J.M., Tappenden K.A. 2012. *Bifidobacterium lactis* Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 36, 106S-117S.

Hosono A., 1992, *Fermented Milk in the Orient, Functions of Fermented Milk: Challenges for the Health Sciences*, 61-78.

Hugenholtz J., 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12, 165-178.

Huis in't Veld J., Havenaar R., 1991, Probiotics and Health in Man and Animal, *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology* 51, 562-567.

Huppertz T., Fox P.F., Kelly A.L., 2004. High pressure-induced denaturation of alpha-lactalbumin and beta-lactoglobulin in bovine milk and whey: a possible mechanism. *Journal of Dairy Research*. 71, 489-495.

Iucci L., Patrignani F., Vallicelli M., Guerzoni M.E., Lanciotti R.. Effects of high pressure homogenization on the activity of lysozyme and lactoferrin against *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18 2007 558–565.

Iucci L., Patrignani F., Vallicelli M., Lanciotti R., Maina Mathara J., Holzapfel W.H., & Guerzoni M.E. 2006b. 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.

Jean J., Biais B., Darveau A., and Fliss L., .2001. Detection of Hepatitis A Virus by the Nucleic Acid Sequence-Based Amplification Technique and Comparison with Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5593-5600.

Johansson M.-L., Molin G., Jeppsson B., Nobaek S., Ahrne S., Bengmark S., 1993, Administration of Different *Lactobacillus* Strains in Fermented Oatmeal soup: In Vivo Colonization of Human Intestinal Mucosa and Effect on the Indigenous Flora, *Applied and Environmental Microbiology*, 15-20.

Kabeerdoss J., Devi R.S., Mary R.R., Prabhavathi D., Vidya R., Mechenro J., Mahendri N.V., Pugazhendhi S., Ramakrishna B.S. 2011. Effect of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. *Nutrition Journal* 10, 138.

Kalavrouzioti I., Hatzikamari M. Litopoulou-Tzanetaki E. & Tzanetakis N., 2005. Production of hard cheese from caprine milk by the use of two types of probiotic cultures as adjuncts. *International Journal of Dairy Technology*, 58, 30-38.

Kasımoğlu A., Goncuoğlu M. & Akgu S., 2004. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. *International Dairy Journal*, 14, 1067-1073.

Kelemen M.V., Sharpe J.E.E., 1979. Controlled cell disruption: a comparison of the forces required to disrupt different microorganisms. *J. Cell Sci.* 35, 431-141.

Keshavarz-Moore E., Hoare M., and Dunnill P., 1990. Disruption of baker's yeast in a high-pressure homogenizer: New evidence on mechanism. *Enzyme Microbial Technol.* 12, 764-770.

Kleinig A.R., and Middelberg A.P.J. 1996. The correlation of cell disruption with homogenizer valve pressure gradient determined by computational fluid dynamics. *Chem. Eng. Sci.* 51, 5103-5110.

Kheadr E.E., Vachon J.F., Paquin & P., Fliss I., 2002. Effect of dynamic pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *International Dairy Journal* 12, 435-446.

Kleinig A.R., Mansell C.J., Nguyen Q.D., Badalyan A., and Middelberg A.P.J., 1995. Influence of broth dilution of the disruption of *Escherichia coli*. *Biolechnol. Technol.* 9, 759-762.

Knorr D. 1999. Novel approaches in food-processing technology: new technologies for preserving foods and modifying function. *Current Opinion in Biotechnology*, 10, 485-491.

Knorr D., Zenker M., Heinz V. & Lee D.U. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 261-266.

Kuchroo C.N. & Fox P.F. 1982 Soluble nitrose in Cheddar chese: Comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37 331-335

Lado B.H. & Yousef A.E., 2002. Alternative food-preservation technologies: efficacy and mechanisms. *Microbes and Infection*, 4, 433-440.

Lanciotti R., Sinigaglia M., Angelini P., & Guerzoni M.E. 1994. Efects of homogenization pressure on the survival and growth of some food spoilage and pathogenic microorganisms. *Letters in Applied Microbiology*, 18, 319–322.

Lanciotti R., Chaves-Lopez C., Patrignani F., Papparella A., Guerzoni M.E., Serio A. & Suzzi G., 2004a. 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.

Lanciotti R., Vannini L., Pittia P. & Guerzoni M.E., 2004b. Suitability of high dynamic- pressure-treated milk for the production of yogurt. *Food Microbiology*, 21, 753-760.

Lanciotti R., Patrignani F., Iucci L., Saracino P., & Guerzoni M.E. 2007. Potential of High-Pressure Homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some *Lactobacillus* species. *Food Chemistry*, 102, 542–550.

Lilly D., Stillwell, 1965, Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced By Microorganisms, *Science*, 147, 747-748.

Lopez-Fandino R., De la Fuente M.G., Ramos M. & Olano A. 1998. Distribution of minerals and proteins between the soluble and colloidal phases of pressurised milks from different species. *Journal of Dairy Research*, 65, 69-78.

Lucey J.A. & Singh H., 1997. Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30, 529-542.

Lucey J.A., 2004. Cultured dairy products: an overview of their gelation and texture properties. *International Journal of Dairy Technology*, 57, 77-84.

Mac Donald T.T., Monteleone G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science* 2005;307:190-28

Macpherson A.J., Hunziker L., McCoy K., Lamarre A., 2001. IgA responses in the intestinal mucosa against pathogenic and non-pathogenic microorganisms. *Microbes and Infection* 3, 1021–1035.

Mattila-Sandholm T., Myllarinen P., Crittenden R., Mogensen G., Fonden R., Saarela M., 2002. Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal* 12, 173–182.

Matto J., Alakomi H.L., Vaari A., Virkajarvi I., Saarela M.H., 2006. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *International Dairy Journal* 16, 1029–1037.

Menendez S., Centeno J.A., Godnez R. & Rodriguez-Otero J.L., 2000. Effect of *Lactobacillus* strains on the ripening and organoleptic characteristics of Arzuoa´-Ulloa cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 59, 37-46.

Metchnikoff E., 1907, *Prolongation of Life*, William Heinemann, London.

Middelberg A.P., O'Neill B.K., and Bogle I.D.L. 1992a. A new model for the disruption of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization Part 1. Model development and verification. *Trans. I. ChemE. Part C*, 70, 205-212.

Middelberg A.P., O'Neill B.K., Bogle I.D.L., Gully N.J. Rogers and A.H., Thomas C.J. 1992b. A new model for the disruption of *Escherichia coli* by high-pressure homogenization Part II. A correlation for the effective cell strength. *Trans. I. ChemE. Part C*, 70, 213-218.

Middelberg A.P.J., and O'Neill B.K. 1993. A correlation for the effective strength of *Escherichia coli* during homogenization. *Biotechnol. Prog.* 9, 109-112.

Middelberg A.P.J. 2000. Microbial cell disruption by high- pressure homogenization. In *Methods in Biotechnology 9: Downstream processing of proteins: Methods and protocols*, ed. M.A. Desai, 11- 21. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Mollet B. 1999, Genetically Improved Starter Strains: Opportunities for the Dairy Industry, *International Dairy Journal* 9, 11-15.

Moroni O., Jean J., Autret J. & Fliss I., 2002. Inactivation of lactococcal bacteriophages in liquid media using dynamic high pressure. *International Dairy Journal*, 12, 907-913.

Ohashi Y., Nakai S., Tsukamoto T., Kitamura K., 2000, Habitual Intake of Lactic Acid Bacteria and Risk Reduction of Bladder Cancer, *Proceedings American Cancer Association*, Abstract 3561.

Ong L., Henriksson A. & Shah N.P., 2007. Chemical analysis and sensory evaluation of Cheddar cheese produced with *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* or *Bifidobacterium sp.* *International Dairy Journal*, 17, 937-945.

Ouwehand A.C., Isolauri E., He F., Hashimoto H., Benno Y., Salminen S., 2001, Differences in Bifidobacterium flora composition in allergic and healthy infants, *Jurnal of Allergy and Clinical Immunology* 108, 144-145.

Ouwehand A.C., Salminen, S.J., Isolauri E., 2002, Probiotics : an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82, 279-289.

Paéz R., Lavari L., Vinderola G., Audero G., Cuatrin A., Zaritzky N., Reinheimer J. 2012. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 48, 748–754.

Pandolf W.D. 1998. High-pressure homogenization: Latest technology expands performance and product possibilities. *Chem. Process* 61, 39-43.

Parker R.B., 1974, Probiotics: The other half of the antibiotics story, *Animal Nutr. Hlth* 29, 4-8.

Patrignani F., Iucci L., Lanciotti R., Vallicelli M., Maina Mathara J., Holzapfel W.H. & Guerzoni M.E., 2007. Effect of high pressure homogenization, not fat milk solids and milkfat on the technological performances of a functional strain for the production of probiotic fermented milks. *Journal of Dairy Science*, 90, 4513-4523.

Patrignani F., Vannini L., Leroy Sado Kamdem S., Lanciotti R., Guerzoni M.E. 2009a. Effect of High Pressure Homogenization on *Saccharomyces cerevisiae* inactivation and physico-chemical features in apricot and carrot juices. *International Journal of Food Microbiology* 136:26–31.

Patrignani F., Burns P., Serrazanetti D., Vinderola G., Reinheimer J.A., Lanciotti R. & Guerzoni M.E. 2009b. Suitability of high pressure-homogenized milk for the production of probiotic fermented milk containing *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Dairy Research*, 76, 74-82.

Patrignani F., Vannini L., Leroy S., Kamdem S., Lanciotti R., and Guerzoni M.E., 2010a Potentialities of High-Pressure Homogenization to Inactivate *Zygosaccharomyces bailii* in Fruit Juices. M116 *JOURNAL OF FOOD SCIENCE*—Vol. 75, Nr. 2, M116.

Patrignani F., Lanciotti R., Guerzoni M.E., 2010b. Emerging Technologies for Probiotic and Prebiotic Foods. In: N. P. SHAH A. GOMES DA CRUZ J. DE ASSIS FONSECCA FARIA. *Probiotic and Prebiotic Foods: Technology, Stability and Benefits to Human Health*. (pp. In press-). ISBN: 978-1-61728-825-8. SAN PAOLO: NOVA SCIENCE PUBLISHER.

Popper L. & Knorr D., 1990. Applications of high-pressure homogenization for food preservation. *Food Technology*, 44, 84-89.

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

Reid G., 1999, *Testing of the Efficacy of Probiotics, Probiotics a Critical Review*, 129-140, Horizon Scientific Press, Wymondham.

Saarela M.H., Virkajarvi I., Alakomi H.L., Mattila-Sandholm T., Vaari A., Suomalainen T., Matto J., 2005. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1330–1339.

Saarela M.H., Virkajarvi I., Alakomi H.L., Sigvart-Mattila P., Matto J., 2006. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. *International Dairy Journal* 16, 1477–1482.

Saarela M.H., Alakomi H.L., Puhakka A., Matto J., 2009. Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of in vitro analyses of cell physiological functions to predict it. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1204–1212.

Salminen S., Bouley C., Boutron-Ruault M.-C., Cummings J., Gibson G., Isolauri E., Roberfroid M., Rowland I., 1998, *Functional Food Science and Gastrointestinal Physiology and Function*, *Brit. J. Nutr.* 80, 147-171.

Save S.S., Pandit A.B., and Joshi J.B., 1994. Microbial cell disruption-role of cavitation. *Chem. Eng. J. Biochem. Eng. J.* 55, B67-B72.

Shah N.P. 2007. Functional cultures and health benefits. *International Dairy Journal*, 17, 1262-1277.

Shamlou P.A., Siddiqi S.F., and Titicherner-Hooker N.J., 1995. A physical model of high-pressure disruption of bakers' yeast cells. *Chem. Eng. Sci.* 50, 1383-1391.

Shortt C., 1999, *Host-Microflora Interface in Health and Disease*, *Trends in Food Science and Technology* 10, 182-185.

Shortt C., 2000, *Communicating the Benefits of Functioning Foods to The Consumer*, *Functional Foods II Claims and Evidence*, 7-75, Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Songisepp E., Kullisaar T., Hutt P., Elias P., Brilene T., Zilmer M. & Mikelsaar M., 2004. A new probiotic cheese with antioxidative and antimicrobial activity. *Journal of Dairy Science*, 87, 2017-2023.

Subirade M., Kelly I., Guéguen J. & Pézolet M., 1998. Molecular basis of film formation from a soybean protein: Comparison between the conformation of glycinin in aqueous solution and in films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 23, 241-249.

Tabanelli G., Patrignani F., Vinderola G., Reinheimer J.A., Gardini F., Lanciotti R. 2012a. Effect of sub-lethal High Pressure Homogenization Treatments on the in vitro functional and biological properties of lactic acid bacteria. *LWT - Food Science and Technology* submitted.

Tabanelli G., Burns P., Patrignani F., Gardini F., Lanciotti R., Reinheimer J.A., Vinderola G. 2012b. Effect of a non-lethal High Pressure Homogenization treatment on the in vivo response of probiotic lactobacilli. *Food Microbiology* (accepted).

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

Vachon J.F., Kheadr E.E., Giasson J., Paquin P. & Fliss I. 2002. Inactivation of foodborne pathogens in milk using dynamic high pressure. *Journal of Food Protection*, 65, 345-352.

Vannini L., Lanciotti R., Baldi D. & Guerzoni M.E. 2004. Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *Journal of Food Microbiology* 94, 123-135.

Verrips C.T., 1989. Growth of microorganisms in compartmentalized products. In G. W. Gould (ed.), *Mechanisms of Action of Food Preservation Procedures* (363-369). London, UK: Elsevier Applied Science.

Vinderola G., Briggiler Marcó M., Guglielmotti D.M., Perdigón G., Giraffa G., & Reinheimer J.A., 2007. Phage resistant mutants of *Lactobacillus delbrueckii* may have functional properties that differ from those of parent strains. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 96-102.

Vinderola G., Cespedes M., Mateolli D., Cardenas P., Lescano M., Aimaretti N., Reinheimer J.A., 2011. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavoured commercial fermented milks during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology* 64, 269–275

Vinderola G., Zacarías M.F., Bockelmann W., Neve H., Reinheimer J.A., Heller K. 2012. Preservation of functionality of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1 after incorporation of freeze-dried cells into different food matrices. *Food Microbiology* 30, 274-280.

Wan J., Coventry J., Sanguansri P. & Versteeg C. 2009. Advances in innovative technologies for microbial inactivation and enhancement of food safety – pulsed electric field and low-temperature plasma. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 414-424.

Wuytack E.Y., Diels A.M.J., & Michiels C.W., 2002. Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 205-212.