

Microorganismi probiotici

Concetta Scalfaro

Istituto Superiore di Sanità



Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare
Reparto Microorganismi e Tecnologie Alimentari

Università di Tor Vergata, 26 Febbraio 2009



Indice degli argomenti

- Introduzione
- Caratteristiche dei microrganismi probiotici
- I Lattobacilli
- Trasformazioni utili in campo alimentare
- Gli Streptococchi
- I Lattococchi e gli Enterococchi
- I Bifidobatteri
- I Batteri sporigeni
- Considerazioni finali



Introduzione

Il metabolismo microbico è responsabile di molti processi di trasformazione.

I prodotti che ne derivano, possono essere utili o dannosi per l'uomo: nel primo caso l'uomo ha messo a punto tecniche per promuovere o guidare questi processi, nel secondo caso l'obiettivo è stato di prevenire o arrestare le trasformazioni indesiderate.

Molti dei cibi che consumiamo sono il risultato di una trasformazione microbica o possono subirla loro malgrado.

Analizzando queste trasformazioni, si cercherà di spiegare in quali condizioni avvengono, quali microrganismi intervengono e in che cosa consiste l'intervento dell'uomo.



Definizione di Probiotico

Il termine probiotico deriva dal greco *pro* e *bios* e significa “a favore della vita”.

Recentemente la Commissione di Esperti FAO/WHO ha definito, con il termine probiotici i “microrganismi vivi che, ingeriti in un certo numero, esercitano degli effetti benefici sulla salute in aggiunta a quelli innati della nutrizione generale”. □



I probiotici sono dunque batteri che esercitano effetti positivi sulla salute umana.

E' necessario che i microrganismi probiotici, quando assunti, siano:

vivi e vitali
non inattivati
presenti in alto numero

(si ritiene che debbano essere ingerite almeno 10^9 UFC al giorno).

Inoltre è necessario che i benefici sulla salute siano dimostrati scientificamente da studi clinici sull'uomo.



Criteri di selezione dei probiotici

Prevenzione della colonizzazione da parte di batteri patogeni.

Stimolazione della risposta immunitaria.

Produzione di sostanze antimicrobiche (batteriocine, perossido d'idrogeno, acidi organici o altri composti inibitori).

Attività antimutagene e anticancerogene.

Produzione di composti bioattivi (enzimi, peptidi).

Appartenenza a un gruppo batterico G.R.A.S. (*generally regarded as safe*)



Caratteristiche dei Lattobacilli



Hanno forma bastoncellare o coccica.

Sono positivi alla colorazione di Gram.

Non sono sporigeni, catalasi negativi, anaerobi ma ossigeno tolleranti.

Fermentano gli zuccheri con produzione di acido lattico come principale prodotto

Si dividono in omofermentanti o eterofermentanti, acidurici o anche acidofili

Hanno esigenze nutrizionali complesse richiedendo per il loro sviluppo aminoacidi, purine, pirimidine e vitamine.

Ne esistono oltre 100 specie



Al gruppo dei batteri lattici attualmente sono ascrivibili moltissimi generi, tra cui le specie e i ceppi maggiormente utilizzati nelle fermentazioni alimentari e/o come microrganismi probiotici, appartengono ai generi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* ed *Enterococcus*.

Genere	Forma ^b	CO ₂ da glucosio	Crescita a T (°C)		Crescita con NaCl (%)		Crescita a pH		Acido lattico
			10	45	6,5	18	4,4	9,6	
<i>Aerococcus</i>	CT	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Pediococcus</i>	CT	-	±	±	±	-	+	-	L,DL
<i>Tetragenococcus</i>	CT	-	-	-	+	+	-	+	L
<i>Enterococcus</i>	C	-	+	+	+	-	+	+	L(+)
<i>Lactococcus</i>	C	-	-	-	-	-	±	-	L(+)
<i>Leuconostoc</i>	C	+	-	-	±	-	±	-	D(-)
<i>Oenococcus</i>	C	+	-	-	±	-	±	-	D(-)
<i>Streptococcus</i>	C	-	-	±	-	-	-	-	L
<i>Vagococcus</i>	C	-	-	-	-	-	±	-	L
<i>Lactobacillus</i>	B	±	±	±	±	-	±	-	D,L,DL
<i>Carnobacterium</i>	B	-	+	-	ND ^b	-	ND	-	L(+)
<i>Weissella</i>	B/C	+	-	-	±	-	±	-	D,DL



La maggior parte delle specie di lattobacilli sono molto esigenti da un punto di vista nutrizionale, richiedendo per la crescita substrati complessi contenenti oltre alle fonti di carbonio e azoto, composti fosforati e solforati.

Sono largamente distribuiti in natura ritrovandosi in differenti habitat: la cavità orale, il tratto intestinale umano ed animale. Altri habitat comuni sono rappresentati da vegetali, insilati, suolo, acqua, letame, cereali, alimenti fermentati (latte, carne e vegetali).

Possono crescere in un range di temperatura compreso tra 5°C e 53°C con valori ottimali di 30-40°C. Sono acidurici, con un pH ottimale di crescita di 5,5-5,8 potendo crescere anche a $\text{pH} < 5$.



Classificazione

In base alla presenza o all'assenza degli enzimi responsabili del tipo di omo o etero-fermentazione degli zuccheri, rispettivamente gli enzimi fruttosio-1,6-difosfato aldolasi e la fosfochetolasi, le specie appartenenti al genere *Lactobacillus* sono divise in 3 gruppi fisiologici:

Gruppo I: Lattobacilli omofermentanti

Gruppo II: Lattobacilli eterofermentanti facoltativi

Gruppo III: Lattobacilli eterofermentanti obbligati



Gruppi fisiologici

Gruppo I Lattobacilli omofermentanti

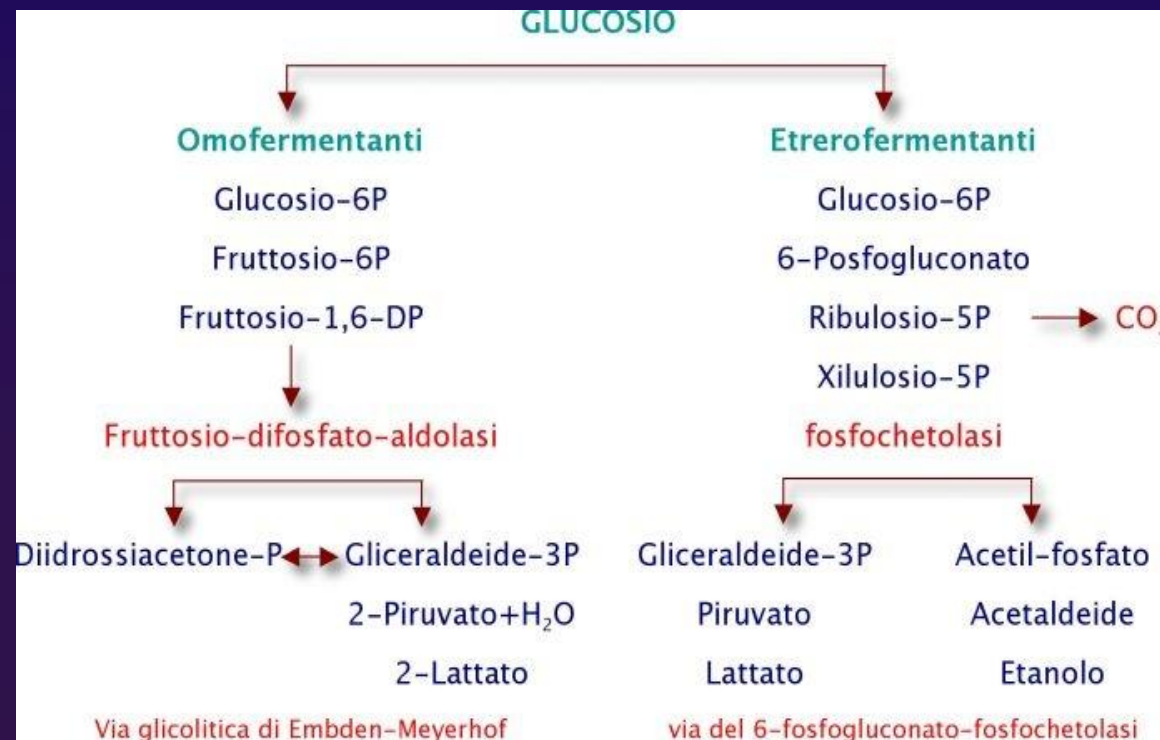
Appartengono a questo gruppo specie che fermentano gli esosi quasi esclusivamente ad acido lattico attraverso la via glicolitica di Embden-Meyerhof e che sono incapaci di fermentare i pentosi e il gluconato.

Gruppo II Lattobacilli eterofermentanti facoltativi

Le specie del gruppo fermentano gli esosi attraverso la via di Embden-Meyerhof o glicolisi e producono quasi esclusivamente acido lattico. Tuttavia in presenza limitata di glucosio, producono lattato, acetato, etanolo o acido formico; sono in grado di fermentare i pentosi a lattato ed acetato per mezzo di una fosfochetolasi inducibile dalla presenza di pentosi.

Gruppo III Lattobacilli eterofermentanti obbligati

I lattobacilli appartenenti a questo gruppo fermentano gli esosi a lattato, acetato (o etanolo) e CO₂ attraverso la via metabolica del fosfogluconato, mentre i pentosi sono fermentati, sempre mediante l'intervento dell'enzima fosfochetolasi a lattato e acetato.





Attività metaboliche

Fermentazione dei carboidrati

Azione sulle proteine

Produzione di sostanze aromatiche

Produzione di sostanze ad azione antimicrobica

Attività proteolitica

I batteri lattici possono utilizzare, in funzione del loro corredo enzimatico proteolitico, una serie di composti proteici per soddisfare le loro esigenze in aminoacidi.

- L'esigenza in aminoacidi è ceppo-dipendente e può variare da 4 fino a 14 diversi aminoacidi.
- Nel latte la crescita dei LAB dipende dai loro enzimi proteolitici.
- Le caseine costituiscono circa l'80% delle proteine nel latte: α s1, α s2, β e k-caseina.
- Le caseine contengono tutti gli aminoacidi necessari alla crescita dei LAB.
- La quantità di aminoacidi liberi e peptidi nel latte è molto bassa.



Componenti del sistema proteolitico

PROTEINASI Sono localizzate a livello della parete cellulare e appartengono al gruppo delle serina-proteasi. Scindono le proteine in peptidi che sono trasportati nella cellula da un sistema di trasporto degli oligopeptidi.

Sono classificate in base a pH e temperature ottimali ovvero alla specificità del substrato.

PEPTIDASI Possono essere sia extra che intra-cellulari e idrolizzano i peptidi in amminoacidi.

CARRIERS Sistemi enzimatici di membrana che operano il trasporto di peptidi e amminoacidi all'interno della cellula.



Specie più importanti

Gruppo I

Lb. delbrueckii subsp. delbrueckii ; *Lb. delbrueckii subsp. lactis*;
Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus; *Lb. acidophilus*; *Lb. crispatus*;
Lb. Jensenii; *Lb. helveticus*; *Lb. salivarius*.

Gruppo II

Lb. casei; *Lb. paracasei*; *Lb. curvatus*; *Lb. pentosus*; *Lb. plantarum*; *Lb. sakei*; *Lb. rhamnosus*; *Lb. bavaricus*.

Gruppo III

Lb. brevis; *Lb. fermentum*; *Lb. kefir*; *Lb. sanfranciscencis*; *Lb. fructivorans*; *Lb. hilgardii*; *Lb. reuteri*.

Trasformazioni utili

L'attività dei microbi in genere, ma soprattutto di batteri, lieviti e funghi ha come conseguenza la trasformazione della materia di cui si nutrono.

Questa caratteristica ha portato l'uomo a riconoscere, sfruttare e spesso guidare i processi trasformativi, che gli risultano utili nel campo alimentare.

Sono esempi di questo tipo di manipolazione, la produzione del pane, del vino e del formaggio.





Impieghi dei Lattobacilli

Produzione di alimenti fermentati

Crauti, olive verdi, sottaceti, insaccati, prodotti da forno, formaggi, bevande fermentate lattiche.

Alterazione di alimenti

Birra, frutta, pesce marinato, latte, carne e prodotti carnei, bevande fermentate.

Attività probiotica

Alcune specie sono capaci di apportare benefici alla salute umana:

Lb. acidophilus, Lb. casei, Lb. johnsonii, Lb. reuteri, Lb. rhannosus, Lb. salivarius, Lb. crispatus e Lb. plantarum.



Possono essere considerati come i classici batteri “*buoni*” in quanto sono coinvolti positivamente in diversi processi produttivi riguardanti soprattutto il settore agro-alimentare e quello dietetico-farmaceutico.

Per poter vivere non richiedono aria in quanto non sono in grado di respirare, ma fermentano gli zuccheri semplici (glucosio, lattosio, ect.), dando origine ad acido lattico, acidificando quindi l’ambiente in cui si sono sviluppati.

Questa caratteristica attività metabolica, la *fermentazione lattica*, viene da lungo tempo sfruttata dall’uomo a proprio beneficio, forse anche da alcuni nostri progenitori alcune centinaia di migliaia di anni. Tuttavia lo sfruttamento cosciente e razionale dei batteri lattici è iniziato soltanto cent’anni fa.



Alcuni alimenti che subiscono la fermentazione lattica, assumono caratteristiche chimico-fisiche, organolettiche, sensoriali e nutritive differenti, a volte anche migliorate, da quelle del prodotto di partenza. Questi alimenti fermentati presentano inoltre una maggiore conservabilità e talora anche un più alto grado di sicurezza d'uso.

I batteri lattici, tra cui *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*, possono essere anche responsabili dell'acidificazione del latte, evento comunemente considerato come un processo alterativo. Se invece governato in modo opportuno, questo processo porta all'ottenimento di *latte fermentati* come lo *yogurth*.

Anche la produzione dei *formaggi* altro non è che un differente tipo di trasformazione del latte, dove vi è pure una decisiva, indispensabile partecipazione dei batteri lattici.

Lo stesso caratteristico aroma del *burro* è dovuto alla presenza del diacetile, che è un metabolita di alcuni batteri lattici, che vengono a svilupparsi durante la fase di maturazione della crema del latte.



Ricordiamo pure che alcuni batteri lattici interessanti per il settore lattiero-caseario, sono pure in grado di produrre delle sostanze, le **batteriocine**, attive contro batteri patogeni, come *Listeria monocytogenes*, che possono essere veicolati dagli alimenti. Le batteriocine vengono prodotte industrialmente, mediante processi di fermentazione.

Altri ceppi sono produttori di diverse sostanze proteiche, le **nisine**, con attività antibatterica; vengono aggiunti, infatti, ai formaggi fusi, come i formaggini, per la loro capacità di prevenire o bloccare l'attività alterativa di batteri sporigeni eventualmente presenti.

Sono tra i pochi antibiotici che per legge possono essere addizionati agli alimenti.



La caratteristica attività fermentativa dei batteri lattici, viene pure sfruttata per conservare alimenti di origine vegetale come i *crauti*, le olive, i cetrioli.

Anche l'ottenimento degli *insilati* è dovuto all'attività di specifici batteri lattici: essi vengono preparati per poter alimentare con foraggio "fresco", cioè ad alto contenuto di acqua, il bestiame di allevamento, ed in particolare le bovine da latte, durante la stagione invernale.

In questi casi l'attività fermentativa viene sfruttata soprattutto per conservare prodotti alimentari con un elevato tenore di acqua, che andrebbero incontro a fenomeni di putrefazione dovuti all'intervento di particolari microbi.



I batteri lattici trovano impiego anche nella preparazione di *prodotti da forno*.

Per ottenere panettone, pandoro, cracker, o pane con migliori caratteristiche sensoriali (sapore, aroma), devono necessariamente intervenire, oltre al lievito, anche alcuni batteri lattici.

Vi è, ad esempio, un pane particolare, il pane *San Francisco*, prodotto solo a Los Angeles, per il quale ne viene utilizzato uno specifico, il *Lactobacillus sanfrancisco*.



Anche nella produzione di *vino* in molti casi, specie per i vini rossi destinati all'invecchiamento, vi è l'intervento dei batteri lattici, in particolare di *Leuconostoc oenos*, che è in grado di migliorare il vino trasformando l'acido malico in acido lattico. Questo intervento risulta utile quando vi è un eccesso di ac. malico nei vini.

Persino per alcuni *insaccati* i processi di maturazione sono governati positivamente anche da determinati tipi di batteri lattici.

Tutti questi processi fermentativi attualmente non vengono più lasciati al caso, ma vengono gestiti mediante l'impiego di selezionate colture di avvio (*colture starter*), che apposite industrie o laboratori producono e vendono agli operatori dei vari settori.

Genere Streptococcus



Cocchi in catene, Gram-positivi, catalasi e ossidasi negativi.

Originalmente suddiviso da Sherman nel 1937, sulla base di caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche in quattro gruppi:

- Piogeni o streptococchi emolitici
- Viridans o streptococchi orali
- Streptococchi lattici
- Streptococchi fecali

Attualmente, sulla base delle similarità di sequenza del 16S rRNA, sono riconosciuti tre generi principali: Streptococcus, Lactococcus e Enterococcus.



Streptococcus thermophilus

E' l'unica specie del genere *Streptococcus* di interesse alimentare, essendo una importante coltura starter utilizzata nella produzione di formaggi e (in associazione con *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) di yogurt.

Nel 1984 fu proposto di considerare questa specie come una sub-specie di *S. salivarius*.

Più tardi, studi di ibridazione del DNA dimostrarono che tale classificazione era ingiustificata e attualmente *S. thermophilus* conserva il suo stato di specie.



Lactococcus e Enterococcus

Cocchi in corte o lunghe catene, Gram-positivi, non sporigeni.

Catalasi negativi, microaerofili, omofermentanti.

Crescono a 10° ma non a 45°C (Lactococcus)

Crescono a 10° e a 45°C (Enterococcus)

Non crescono in presenza del 6,5% di NaCl (Lactococcus)

Crescono in presenza del 6,5% di NaCl (Enterococcus)

Specie come *Lc. lactis* subsp. *cremoris*, *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* sono largamente impiegate come colture starter nella produzione di formaggi e burro.



□ In particolare *Lc. lactis* subsp. *lactis* produce la NISINA, l'unica batteriocina prodotta da LAB autorizzata nella conservazione degli alimenti.

Alcune specie di Enterococchi, sono presenti in diversi formaggi e spesso sono usate come colture starter per la loro produzione.

Inoltre, preparazioni commerciali di *Enterococcus faecium* sono utilizzate come probiotici per la prevenzione e il trattamento di disordini intestinali sia dell'uomo che di animali.



I bifidobatteri



Sono bastoncini di forma irregolare, a Y, che producono, come i batteri lattici, acido lattico, ma attraverso una differente via metabolica.

Svolgono naturalmente *un'attività probiotica* e si riscontrano facilmente nel tratto intestinale dei neonati ed in quello gastroenterico dei soggetti giovani di diversi animali, anche da allevamento.

Agiscono quindi a favore della nostra salute impedendo che nel nostro intestino si sviluppino microbi dannosi ad attività putrefacente.

Con ceppi selezionati di bifidobatteri, vengono preparati dei particolari *latti fermentati*, per la loro attività probiotica.



Catalasi negativi, immobili

Anaerobi stretti (alcune specie possono tollerare l'O₂ solo in presenza di CO₂)

Non acidurici

Temperatura di sviluppo ottimale a 37-42°C (minima tra 25-28°C)

Fermentano gli esosi via fruttosio 6P-fosfochetolasi



Altro esempio di bifidobatteri *sono i Batteri propionici.*

Hanno anch'essi forma bastoncellare irregolare e producono, sempre per via fermentativa, acido propionico ed altri interessanti metaboliti.

Si ritrovano naturalmente in alcuni formaggi, ad es. nell'*Emmenthal* e nel *Gruviera*, in cui danno origine ai famosi buchi (occhiature), attraverso la produzione di metaboliti gassosi, come l'anidride carbonica.

Non solo l'aspetto, ma anche il sapore e l'aroma di questi formaggi sono dovuti alla loro attività e precisamente alla produzione di acido propionico e di altri metaboliti con attività aromatizzante.



I batteri sporigeni

Sono di forma bastoncellare, alcuni sono aerobi (genere *Bacillus*), altri anaerobi (genere *Clostridium*).

Tra i batteri sporigeni aerobi troviamo ceppi produttori di enzimi di interesse pratico come: *amilasi* e *proteasi* per il settore alimentare.

Alcune particolari proteasi neutre trovano impiego nella preparazione dell'aspartame, un dolcificante costituito da due amminoacidi, a partire da una grossa molecola peptidica ottenuta da un batterio geneticamente modificato.



Un altro modo di presentare i microbi “amici”

I batteri analizzati fin qui, possono essere presentati anche in modo più simpatico, ad es. in base alle loro prerogative "*professionali*".

In questo caso potremmo parlare di *microbi gastronomi*, in specifico microbi panettieri, pastai, pasticceri, salumieri, caseari, enotecnici, birrai, e poi di *microbi agricoltori*, ortolani, zootecnici, farmacisti, chimici, ecc.



Alcune considerazioni finali...

La cattiva fama dei microbi è ampiamente immeritata.

La stragrande maggioranza di essi svolge "attività" di grande utilità per l'uomo, gli altri viventi e l'ambiente.

I microrganismi costituiscono un gruppo decisamente eterogeneo di viventi.

Nell'ambito di questo gruppo vi è pure un elevato grado di biodiversità.

Possiamo ritenere che presto, con l'acquisizione di idonei mezzi di indagine, saremo in grado di scoprire nuove specie microbiche, alcune delle quali potrebbero anche possedere delle capacità metaboliche di particolare interesse per l'uomo.