

## **Prezioso come uno scarto: dal permeato di siero un imballaggio sostenibile ad attività antimicrobica**

*Manuela Rollini, Alberto Barbiroli, Daniele Cavicchioli, Stefano Farris, Laura Higuera, Luisa Pellegrino, Diego Romano, Alida Musatti*

*L'interesse verso gli imballaggi alimentari attivi sta rapidamente crescendo. In quest'ottica, il progetto NANOSAK ha consentito di sviluppare a partire da permeato da ultrafiltrazione di siero materiali attivi in grado di inibire lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*.*

Il progetto NANOSAK (*Nanocellulose- Sakacin A conjugates for food packaging purposes*), finanziato da Fondazione Cariplo, ha coinvolto ricercatori del Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente (DeFENS) e del Dipartimento di Scienze e Politiche Ambientali (ESP) dell'Università degli Studi di Milano, di Innovhub-SSI Divisione Carta, Cartoni e Paste per Carta e dell'Istituto di Agrochimica e Tecnologia per gli Alimenti (IATA-CSIC) di Valencia, in Spagna.

Il progetto ha avuto la finalità di valorizzare il permeato di siero presamico, sottoprodotto del settore lattiero-caseario. Attraverso la messa a punto di due processi biotecnologici paralleli è stato possibile creare un sistema di veicolazione di un principio attivo antimicrobico naturale, da utilizzare in materiali di imballaggio primario. Il permeato di siero è stato impiegato per la produzione di due molecole, in particolare:

- sakacina-A: antimicrobico naturale prodotto dal batterio lattico *Lactobacillus sakei* con una attività specifica nei confronti di *Listeria monocytogenes*;
- cellulosa batterica: polimero prodotto da batteri acetici (*Komagataeibacter xylinus*) utilizzato come veicolo del principio attivo.

La cellulosa, modificata successivamente alla sua produzione fino a raggiungere dimensioni nanometriche (nanocellulosa), è stata associata alla sakacina-A al fine di formare coniugati ad attività antimicrobica da impiegare in imballaggi alimentari a diretto contatto con l'alimento. L'effettiva attività antimicrobica dei materiali prodotti è stata valutata allestendo prove di conservazione di alimenti rientranti nella categoria dei prodotti "pronti al consumo" (Ready-

to-Eat, RTE) a rischio *L. monocytogenes*, con l'obiettivo di aumentarne la shelf life, la conservabilità e la sicurezza nei confronti del batterio patogeno.

### **Il permeato di siero: un sottoprodotto valorizzabile**

Il siero di latte è il sottoprodotto del processo di produzione del formaggio; rappresenta circa il 90% del volume iniziale del latte e ne contiene tutte le componenti solubili che non sono trattenute nella cagliata, come lattosio, sieroproteine, peptidi e amminoacidi, sali minerali e vitamine idrosolubili. Per le loro proprietà nutrizionali e funzionali uniche, le proteine del siero vengono per lo più recuperate attraverso processi di ultrafiltrazione (UF) del siero, e impiegate come ingrediente per la formulazione di alimenti, preparazioni farmaceutiche e cosmetiche. Il processo di ultrafiltrazione genera un secondo sottoprodotto, denominato permeato di siero, che rappresenta l'ultimo residuo del settore lattiero caseario.

Il valore di mercato di questo sottoprodotto può variare notevolmente in base alle condizioni di approvvigionamento: secondo l'opinione di tecnici del settore il prezzo del permeato di siero in forma liquida è all'incirca di 1-1.5 € cent/L, inclusi i costi di refrigerazione, mentre si aggira intorno a 0.70 €/kg (pari a 5 € cent/L) per la forma in polvere. Nella valutazione della fattibilità economica di un impianto di valorizzazione di questo sottoprodotto, risulta rilevante la scelta tra le due fonti di approvvigionamento (siero permeato liquido tal quale o in polvere ricostituito), anche in funzione dei volumi trasformati giornalmente. Il ricorso alla prima fonte (liquido), seppur in apparenza meno costosa, deve considerare i costi di trasporto dai centri di produzione (o stoccaggio) del permeato liquido, che sarebbero aggiuntivi e variabili in base alla localizzazione dell'impianto. Inoltre, la deperibilità del permeato tal quale ne limiterebbe le possibilità di stoccaggio, comportando costi aggiuntivi e rendendo il processo di trasformazione dipendente dall'approvvigionamento periodico. Il permeato in polvere da ricostituire all'opposto presenta un prezzo maggiore, associato ovviamente ai costi di disidratazione, ma avrebbe il vantaggio di abbattere i costi di trasporto e di potere disporre di materia prima seconda stoccabile.

### **Listeriosi e batteriocine**

La listeriosi è una infezione alimentare provocata dal batterio *L. monocytogenes*: una volta introdotto nell'organismo attraverso alimenti contaminati, *Listeria* raggiunge il lume intestinale e attraverso il passaggio al circolo sanguigno può diffondersi all'organismo. Se il batterio permane nell'intestino, la listeriosi si manifesta con una gastroenterite acuta febbrile che evolve favorevolmente nei soggetti sani; se invece evolve nella forma invasiva o sistemica, può insorgere setticemia o meningite. In quest'ultimo caso il tasso di letalità può raggiungere il 20-30% tra i pazienti ospedalizzati.

*L. monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario, isolato in numerosi prodotti alimentari sia non trattati come latte, vegetali, carne, pesce, etc. sia sottoposti a trattamento termico, come risultato di una contaminazione secondaria; in questo secondo caso, la listeriosi è frequentemente associata a prodotti pronti al consumo (RTE). I prodotti RTE risultano particolarmente a rischio in quanto *Listeria* è in grado di resistere e svilupparsi anche a temperature di refrigerazione, alle quali i prodotti RTE sono generalmente conservati, e vengono consumati senza ricorrere ad un ulteriore trattamento termico.

Al fine di prevenire lo sviluppo di *L. monocytogenes* sugli alimenti, possono essere applicate strategie diverse, tra cui il trattamento termico, il congelamento, l'utilizzo di radiazioni oppure l'aggiunta di antimicrobici. Tra questi ultimi, notevole interesse rivestono quelli di origine naturale, come le batteriocine.

Le batteriocine sono molecole di natura proteica prodotte generalmente da batteri lattici, molti dei quali sono a loro volta comunemente presenti negli alimenti; sono molecole sicure per il consumatore (una volta ingerite, vengono digerite nel tratto gastrointestinale), hanno una elevata attività antimicrobica (anche 1.000.000 di volte superiore ai comuni antimicrobici) e sono resistenti ai trattamenti termici come ad esempio la pastorizzazione, in alcuni casi anche alla sterilizzazione. Allo stato attuale della legislazione, la nisina (E234) è l'unica batteriocina inclusa "come tale" nell'elenco degli additivi alimentari (Direttiva n. 95/2/CE); ad ogni modo sono attualmente disponibili in commercio ceppi di batteri lattici produttori di altre batteriocine: questi microrganismi vengono classificati come ingredienti e da tempo addizionati alle preparazioni alimentari anche per la loro capacità di produrre batteriocine *in situ*, direttamente nell'alimento nel corso della conservazione. In aggiunta, vengono commercializzati per le loro proprietà conservanti anche dei concentrati di colture di batteri lattici, naturalmente ricchi di batteriocine.

La sakacina-A in particolare è prodotta da *Lactobacillus sakei*, batterio lattico comunemente presente negli starter microbici disponibili in commercio per la preparazione di prodotti alimentari a base carne, come ad esempio il salame. Come le altre batteriocine appartenenti alla sua classe, la sakacina-A ha una attività microbica specifica contro *L. monocytogenes*: la molecola è in grado di legarsi in modo specifico alla cellula del patogeno e di formare dei pori che causano la fuoriuscita di materiale cellulare, portando alla morte della cellula stessa.

### **Permeato di siero: produzione di sakacina-A e cellulosa batterica**

La sakacina-A da *L. sakei* è stata prodotta allestendo colture liquide in fermentatore. Per la formulazione del terreno colturale è stato utilizzato permeato da UF di siero presamico, gentilmente fornito per tutto il progetto da Latteria Soresina; al permeato di siero sono stati addizionati alcuni ingredienti (estratto di lievito, estratto di carne, vitamine) utili per favorire lo sviluppo del microrganismo e la produzione di batteriocina. Il terreno formulato grazie al permeato di siero ha un costo circa il 70% inferiore rispetto all'MRS (terreno colturale di riferimento per i batteri lattici). Dopo la crescita microbica, il brodo di coltura è stato sottoposto ad un processo cromatografico separativo al fine di ottenere un concentrato arricchito in sakacina-A.

La produzione di cellulosa batterica è avvenuta in parallelo a quella della batteriocina, impiegando un ceppo appartenente alla famiglia dei batteri acetici, *Komagataeibacter xylinus*. In questo caso il microrganismo è stato fatto crescere in un terreno colturale costituito da permeato di siero addizionato dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi, in grado di idrolizzare il lattosio, e favorire quindi la crescita del batterio acetico e la produzione di cellulosa. A fine processo, la cellulosa batterica è stata recuperata e trattata con acido solforico per ridurla a dimensioni nanometriche e introdurre sulla molecola delle cariche negative, necessarie per il successivo legame con la sakacina-A. Tale processo ha consentito di produrre nanocristalli di cellulosa batterica che spontaneamente si legano con la sakacina-A, carica positivamente, formando dei coniugati da utilizzare per la preparazione di materiali ad attività antimicrobica. I coniugati prodotti permettono il rilascio controllato della batteriocina dalla confezione all'alimento, in modo da consentire l'attività antimicrobica.

## **Produzione di materiali ad attività antimicrobica**

Nel corso del progetto NANOSAK è stato possibile produrre imballaggi alimentari attivi attraverso due tecniche: l'incorporazione del coniugato all'interno del materiale, oppure la spalmatura superficiale (coating).

La procedura di coating ha previsto la spalmatura di una soluzione contenente i coniugati ad attività antimicrobica sulla superficie di un materiale idoneo all'utilizzo come imballaggio primario. All'interno del progetto NANOSAK, sono stati utilizzati sia carta idonea al contatto con alimenti, sia il biopolimero acido polilattico (PLA). Le prove degli imballaggi attivi a base carta sono state condotte *in vivo* su formaggio tipo crescenza, intenzionalmente inoculato con *L. innocua* DSM 20649, surrogato del patogeno *L. monocytogenes*. Il microrganismo è stato inoculato superficialmente sulle porzioni di formaggio ad una concentrazione pari a 1000 cellule/g; le singole fette sono state successivamente avvolte nelle carte attive, preparate ad una concentrazione di sakacina-A pari a 25 AU/cm<sup>2</sup>, e successivamente conservate fino a 21 giorni a 5 °C (Figura 1). Rispetto alle fette avvolte nella carta senza il coating attivo (controllo negativo), i campioni avvolti nelle carte attive hanno mostrato una riduzione della popolazione di *Listeria* pari a circa 1.5 cicli logaritmici, da 1000 a 50 cellule/g, confermando l'effetto battericida nei confronti del patogeno.

La sakacina-A spalmata su PLA ha fornito risultati ancora più incoraggianti contro *Listeria* su formaggio da latte di pecora (Figura 2) e formaggio fresco vaccino: i film attivi sono stati preparati sempre ad una concentrazione di batteriocina pari a 25 AU/cm<sup>2</sup>, e i campioni di formaggio conservati fino a 8 giorni a 5 °C. Le prove hanno evidenziato un abbattimento totale della popolazione di *Listeria* e, nel caso del formaggio fresco, sono stati evidenziati buoni risultati anche contro *Staphylococcus aureus*, altro batterio patogeno contaminante i prodotti alimentari freschi pronti al consumo.

## **Conclusioni**

L'interesse verso gli imballaggi alimentari attivi sta rapidamente crescendo, in funzione della maggiore attenzione da parte dei consumatori nei confronti delle tematiche di sicurezza alimentare, di riduzione dello spreco di alimenti e della possibilità di impiego nel cibo di composti ad attività antimicrobica di origine naturale. Il progetto NANOSAK ha consentito

di mettere a punto due tipi di materiali attivi, uno a base carta e uno a base biopolimerica, in grado di inibire lo sviluppo microbico del patogeno *Listeria monocytogenes*, a partire da permeato da UF di siero, sottoprodotto dell'industria lattiero casearia. Tale approccio costituisce un esempio di sviluppo di economia circolare sostenibile, in grado di utilizzare un residuo di lavorazione per la produzione di molecole ad elevato valore aggiunto (nel caso specifico sakacina-A e cellulosa batterica) da reimpiegare nello stesso ambito produttivo (confezionamento di prodotti caseari).

Rimane ancora da approfondire lo spettro di azione e il potenziale applicativo verso prodotti aventi caratteristiche chimico-fisiche peculiari (valori di pH estremi, bassa umidità) che potrebbero limitare il rilascio della sakacina-A dall'imballaggio verso l'alimento, oppure inibire il suo meccanismo d'azione nei confronti del patogeno. I risultati ottenuti rappresentano un interessante esempio di come la messa a punto di processi biotecnologici può consentire di migliorare la sicurezza alimentare nel settore della conservazione degli alimenti freschi e pronti al consumo e, al tempo stesso, valorizzare sottoprodotti dell'industria stessa.

## Figure



**Figura 1. Prove di attività anti-*Listeria* su formaggio tipo crescenza.** La crescenza porzionata a fette è stata avvolta in carta ad uso alimentare, preventivamente spalmata con una soluzione di coating contenente i coniugati Sakacina-A/nanocellulosa .



**Figura 2. Prove di attività anti-*Listeria* su formaggio da latte di pecora.** Il formaggio opportunamente porzionato è stato confezionato in PLA preventivamente spalmato con una soluzione di coating contenente i coniugati Sakacina-A/nanocellulosa.