

Realizzazione industriale di prodotti finiti a base di probiotici: l'incidenza dei fattori ambientali

BIODUE

S. Corlazzoli¹, C. Lissana¹,
B. Pavolini², M. Pellizzato^{3,4},
E. Cocco⁴, G. Nannoni²

¹BIODUE, Bergamo

²BIODUE, Firenze

³SIFNut president

⁴RECERCARE, Castelfranco Veneto
giulia.nannoni@biodue.com

Introduzione

Lo sviluppo e la realizzazione di prodotti contenenti probiotici differiscono in modo sostanziale rispetto alla realizzazione e sviluppo di altri prodotti per l'health care. Infatti lo scopo primario del processo, non è solo veicolare correttamente l'attivo ma, trattandosi di organismi vivi, preservarne la vitalità lungo tutta la lavorazione e fino al termine della *shelf-life*. Poiché i parametri ambientali dei locali produttivi sono ritenuti fattori rischio per la vitalità dei ceppi probiotici, è necessario effettuare un attento monitoraggio della temperatura e dell'umidità relativa degli stessi, al fine di garantire un ambiente maggiormente favorevole per la loro sopravvivenza. I dati di letteratura rispetto alla *shelf-life* dei probiotici mostrano come una diminuzione della conta di microrganismi vitali sia fisiologica durante la vita del prodotto, motivo per cui è pratica comune e riconosciuta quella di applicare surdosaggi dei ceppi probiotici stabiliti sulla base dell'andamento del decadimento di vitalità, che in genere è peculiare di ciascun ceppo. Temperature ed umidità elevate possono accelerare tale fisiologica perdita di cellule vive, rendendo insufficiente il surdosaggio standard. È infatti riconosciuto che, quando la temperatura di lavorazione è superiore a 25 °C e l'umidità relativa è prossima o superiore al 35%, i valori di attività dell'acqua (*aw*) delle miscele superano il limite di specifica (*aw* = 0,250) già in fase di produzione, mostrando poi un trend in crescita durante la *shelf-life* del prodotto. Conseguentemente, in queste condizioni, la conta probiotica decade molto velocemente. Produrre a temperature di 22 °C ± 3 °C e umidità relative ≤35% RH, invece consente di mantenere valori di *aw* particolarmente bassi della miscela probiotica e quindi contenere la riduzione della vitalità dei probiotici durante la *shelf-life* del prodotto finito, permettendo di limitare al minimo il sovradosaggio. In questo studio sono state analizzate miscele probiotiche confezionate in tre diverse forme farmaceutiche, per ciascuna delle quali sono stati valutati i valori di acqua libera, conta probiotica e vitalità dei microrganismi.

Materiali e Metodi

Come standard di riferimento per il presente studio è stato utilizzato un prodotto con probiotici in capsule confezionate in vial, con sequestrante di umidità.

È stata scelta questa forma farmaceutica essendo tra le più diffuse in commercio per i prodotti a base di probiotici. Per valutare come le condizioni dei locali produttivi possono influire sulla vitalità dei microrganismi probiotici, sono state prodotte capsule alle seguenti condizioni ambientali:

- Locali a temperatura regolata e controllata di 22 °C ± 3 °C e umidità relativa ≤35% RH.
- Locali a temperatura regolata e controllata di 22 °C ± 3 °C e umidità relativa pari a 50% RH ± 10%.

Sono stati valutati i seguenti parametri: attività dell'acqua e vitalità dei microrganismi probiotici. Successivamente sono stati analizzati e comparati i dati provenienti dagli studi di stabilità di miscele probiotiche prodotte in capsule (a condizioni ottimali) e miscele probiotiche confezionate in stick pack e flaconcini (realizzati secondo le condizioni di produzione risultate più idonee).

Le miscele analizzate sono composte da ceppi di microrganismi probiotici, appartenenti ai generi *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Limosilactobacillus* e *Streptococcus*.

Il confezionamento è avvenuto in flaconcini in PET con serbatoio in PE-PP con sequestrante e stick pack poliaccoppiati PET-ALU-PP.

Gli studi stabilità sono stati eseguiti in una camera climatica a temperatura regolata e controllata di 25°C ± 2°C e umidità relativa pari a 60% RH ± 5%.

Sono stati determinati i seguenti parametri:

- Conta di microrganismi probiotici vitali: metodica conta in piastre, Mitsuoka Buffer, HHD agar, condizioni di prova 37 ± 1 °C, anaerobiosi, 72 h ± 6 h;
- Acqua libera: strumento Novasina Labmaster-aW.

Per definire la conformità dei prodotti è stato stabilito un valore interno di *aw* ≤0,250 (migliorativo rispetto a ≤0,500 come da UNI/PdR 112:2021), mentre l'esito della conta probiotica, essendo diverso per ogni miscela e forma farmaceutica, è stato utilizzato per calcolare la vitalità dei probiotici ai differenti time point rapportandolo al valore di conta ottenuta all'inizio dello studio di stabilità (T0).

Risultati

I dati disponibili per gli studi di stabilità dei prodotti in capsule realizzati a differenti condizioni ambientali di produzione (22 ± 3 °C e umidità relativa ≤35% RH e 22 ± 3 °C e umidità relativa ≤50% RH±5%) sono riportati nella **Figura 1** e nella **Figura 2**, rispettivamente.

Sulla base di risultati si conferma che le condizioni ambientali dei locali in cui vengono realizzati i prodotti a base di probiotici influenzano la vitalità dei probiotici stessi. In particolare, la vitalità nei prodotti A e B (prodotti in condizioni ottimali) cala fino a valori rispettivamente di 55% e 63% al T24, mentre quella dei prodotti C

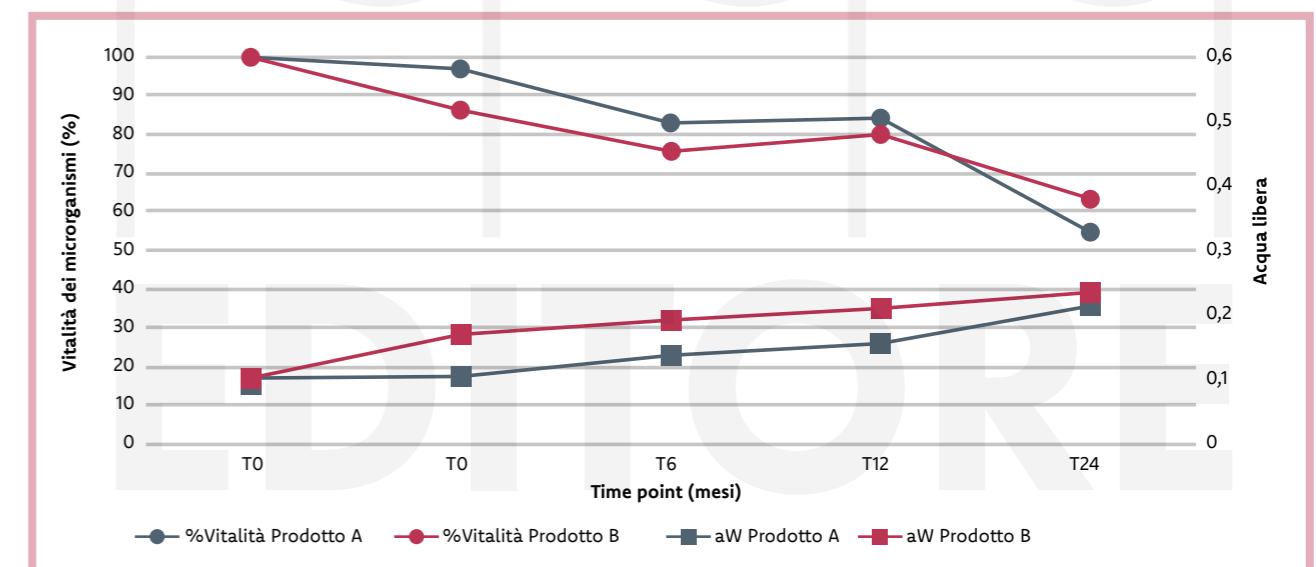


Figura 1 • Vitalità dei probiotici in capsule correlati all'acqua libera realizzati a temperatura 22,0 °C ± 3,0 °C e umidità relativa ≤ 35,0% RH.

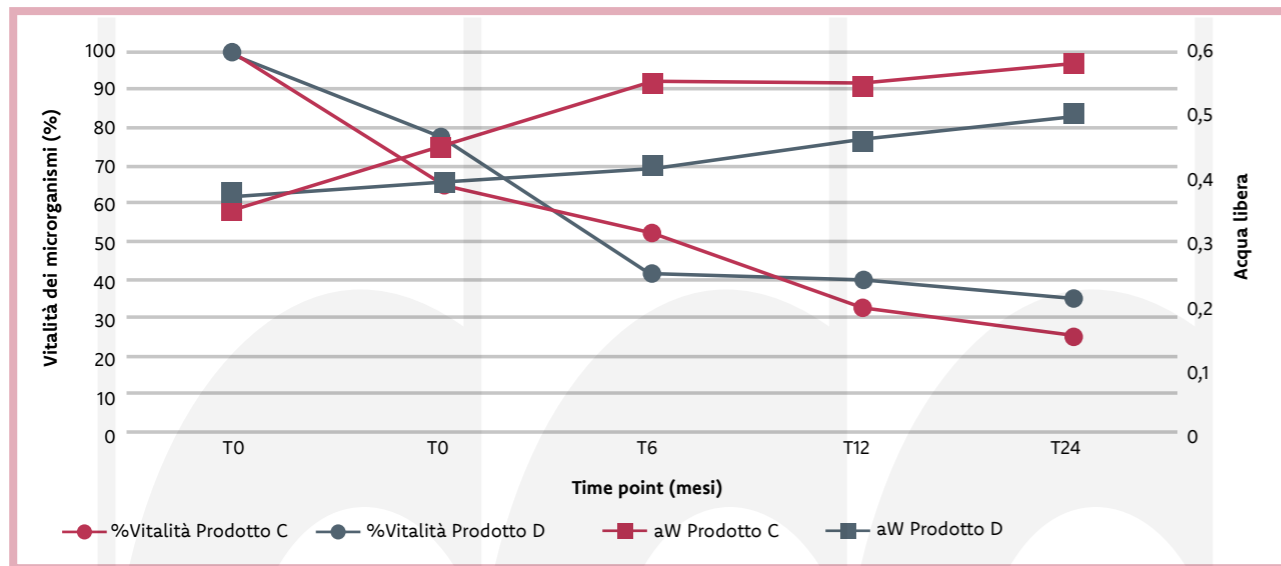


Figura 2 • Vitalità dei probiotici in capsule correlati all'acqua libera realizzati a temperatura 22,0 °C ± 3,0 °C e umidità relativa 50% RH ± 10% RH.

e D a T24 scendono fino al 26% e 36% con valori di aW di sopra i limiti stabiliti rispettivamente di 0,583 e 0,501. Prendendo riferimento i dati riportati nella **Figura 1**, sono stati valutati i valori di vitalità e aW ottenuti durante gli studi di stabilità condotti su prodotti confezionati in

flaconcini con serbatoio sequestrante e stick pack. Tutte le formulazioni comparate sono state realizzate in condizioni ambientali favorevoli.

I risultati ottenuti sono riportati nella **Tabella 1** e nella **Tabella 2**.

Tabella 1 • Vitalità percentuale dei microrganismi probiotici in prodotti realizzati in condizioni ambientali idonee

		Vitalità (%)				
Forma farmaceutica	Prodotto	T0 (%)	T3 (%)	T6 (%)	T12 (%)	T24 (%)
Capsule	A	100	96,8	82,9	83,7	55
Capsule	B	100	86,5	75,6	80,1	62,8
Flaconcini	E	100	95,7	84,2	74	57,1
Flaconcini	F	100	100	93,5	87,1	60
Stick pack	G	100	88,1	76,5	63	60,2
Stick pack	H	100	100	80,8	57,7	53,8

Tabella 2 • Valori di aW di prodotti realizzati in condizioni ambientali idonee

		aW				
Forma farmaceutica	Prodotto	T0 (%)	T3 (%)	T6 (%)	T12 (%)	T24 (%)
Capsule	A	0,099	0,105	0,133	0,156	0,218
Capsule	B	0,102	0,169	0,189	0,209	0,233
Flaconcini	E	0,048	0,052	0,065	0,078	0,098
Flaconcini	F	0,071	0,131	0,130	0,140	0,170
Stick pack	G	0,125	0,142	0,152	0,157	0,190
Stick pack	H	0,153	0,178	0,219	0,231	0,246

I valori di vitalità osservati per i prodotti confezionati in flaconcini alla fine della *shelf-life* si attestano al 57,1% e al 60% rispetto al valore iniziale (T0), mentre per i prodotti in stick pack tali valori risultano pari al 60,2% e al 53,8%.

I valori di aW osservati per i prodotti in flaconcini a fine *shelf-life* sono 0,098 e 0,170, mentre per gli stick pack 0,190 e 0,246. Questi risultati risultano coerenti con quanto osservato nei prodotti di riferimento in capsule a base di probiotici confezionati in vial (**Figura 1**).

In nessun caso sono state riscontrate riduzioni della vitalità o incrementi dell'aW paragonabili a quelli riportati nella **Figura 2**, dove sono presentati i dati relativi a prodotti a base di probiotici in capsule realizzati in condizioni ambientali non idonee.

Discussione e Conclusioni

La produzione industriale di integratori alimentari a base di probiotici necessita di precise condizioni ambientali, indipendentemente dalla forma farmaceutica.

I dati ottenuti dagli studi di stabilità evidenziano l'importanza della fase di produzione e un andamento decrescente della vitalità in funzione dell'aumento dell'attività dell'acqua (aW).

La realizzazione dei prodotti a base di probiotici in condizioni di temperatura di 22,0 ± 3 °C e umidità relative ≤35% RH, permette di ottenere prodotti finiti conformi alle specifiche di conta probiotica e acqua libera per l'intera *shelf-life* del prodotto (valori di aW ≤0,250 e di vitalità residue di circa 55-60%) a differenza delle formulazioni prodotte in condizioni ambientali differenti (temperatura di 22,0 ± 3 °C/50% RH ± 10%), dove a fine *shelf-life* (stabilità) si registrano valori di aW superiori a 0,500, con un impatto negativo sulla vitalità dei probiotici (vitalità residue di circa 30%).

Da tali osservazioni emerge come la lavorazione in condizioni di temperatura e umidità relativa controllate lungo l'intera filiera consenta di ottenere prodotti a base di probiotici stabili, riducendo al minimo le oscillazioni di vitalità e di aW per tutta la durata della *shelf-life* in tutte le tre forme farmaceutiche esaminate.

Bibliografia

- de Deus C, Duque-Soto C, Rueda-Robles Sánchez-Pozo A et al. Stability of probiotics through encapsulation: Comparative analysis of current methods and solutions. *Food Res Int.* 2024;197(1):115183.
- Tripathi MK, Giri SK. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *J Funct Foods.* 2014;9:225-241.