

STUDIO DEI COMPOSTI VOLATILI PRODOTTI DA BATTERI LATTICI AUTOCTONI IN FORMAGGI MODELLO

Bertolino M., Giordano M., Scursatone B. e Zeppa G.

Università degli Studi di Torino, Facoltà di Agraria, Di.Va.P.R.A. Settore Industrie Agrarie,
Via Leonardo da Vinci, 44 - 10095 Grugliasco (TO) Tel: +390116708705 email:
marta.bertolino@unito.it

INTRODUZIONE

In molte aree europee il formaggio viene tradizionalmente prodotto utilizzando colture naturali ottenute incubando a particolari condizioni il latte od il siero di precedenti lavorazioni. L'inoculo, così ottenuto, è caratterizzato da una presenza ben bilanciata di batteri lattici mesofili e termofili che consentono di ottenere prodotti di buona qualità e sufficientemente standardizzati pur partendo da latte crudo. Poiché questo tipo di innesti è caratterizzato da una significativa variabilità nel tempo e dalla necessità di lunghi periodi di preparazione si è verificata, di conseguenza, una diffusione sempre più capillare delle colture starter liofilizzate o congelate caratterizzate invece da una grande semplicità d'uso, da costi contenuti e da una standardizzazione ottimale del prodotto finito. Tuttavia proprio questa standardizzazione ha determinato anche un impoverimento organolettico dei prodotti stessi oltre ad una perdita della biodiversità microbica propria degli areali di produzione portando, negli ultimi anni, ad un interesse più accentuato verso la selezione e la successiva caratterizzazione genotipica e fenotipica di ceppi batterici autoctoni isolati da formaggi artigianali da utilizzarsi quali starter in caseificazione (Weerkamp *et al.*, 1996; Cogan *et al.*, 1997; Ayad *et al.*, 1999, Ayad *et al.*, 2000; Wouters *et al.*, 2002). In questo modo si unisce la semplicità d'uso propria delle colture starter alla conservazione della biodiversità microbica e delle caratteristiche compositive e sensoriali proprie delle produzioni artigianali.

Sebbene in Italia queste colture starter autoctone siano da tempo utilizzate per la produzione di alcuni importanti formaggi DOP, quali l'Asiago, il Bitto, la Fontina ed il Pecorino toscano nessuno dei formaggi piemontesi utilizza ancora questo tipo di innesti. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di contribuire alla definizione di uno starter autoctono per la Toma Piemontese DOP, il principale formaggio da latte vaccino crudo o pastorizzato dell'arco alpino nord-occidentale, caratterizzando le sostanze volatili prodotte da 32 ceppi di batteri lattici isolati da formaggi e cagliate artigianali e potenzialmente utilizzabili a questo scopo.

MATERIALI E METODI

Campioni

I 32 ceppi di batteri lattici (21 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 1 *Lactobacillus paracasei*, 1 *Lactobacillus fermentum*, 1 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, 5 *Streptococcus macedonicus* e 1 *Streptococcus thermophilus*) sono stati isolati da cagliata o formaggio Toma Piemontese ed identificati tramite PCR della regione spaziatrice 16S/23S. Prima dell'utilizzo ogni ceppo è stato coltivato in terreno di coltura M17 (Merck, Darmstadt, Germania) con 2 trasferimenti a 37°C per 24 ore (1% di inoculo).

Produzione dei formaggi modello

Le analisi sono state eseguite su formaggi modello di circa 500 g ottenuti in laboratorio mediante una tecnologia molto simile a quella adottata per la produzione della Toma Piemontese DOP da circa 6 litri di latte intero pastorizzato commerciale. Il latte è stato quindi riscaldato a 37°C, aggiunto di 0,2 g/L di CaCl₂. Dopo 15 minuti di sosta è stato

aggiunto un inoculo al 2 % di lattocultura (preparata a partire dalla brodocultura) e dopo 10 minuti del 2 % di caglio liquido (titolo 80:20, forza 1:10000). Dopo una sosta di circa 10 minuti la cagliata è stata rotta finemente (chicco di riso), riscaldata a 41°C per 10 minuti e infine di favorire la sineresi ed infine posta in fascere. Non vi è stata pressatura e stagionatura si è protratta in una apposita cella di stagionatura per 60 giorni al termine dei quali i formaggi sono stati congelati fino al momento dell'analisi.

Analisi dei composti volatili

L'analisi è stata effettuata mediante la tecnica SPME su 5 g di formaggio posti in un vial da 10 mL chiuso con un tappo in PTFE/silicone da 20 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). L'equilibratura è avvenuta a 60°C per 10 min mentre l'estrazione è stata effettuata a 60°C per 60 min in spazio di testa statico usando una fibra DVB/Carboxen/PDMS da 2 cm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Il desorbimento è stato effettuato a 250°C per 5 min in modalità splitless. L'identificazione dei composti è stata effettuata utilizzando un gas cromatografo Shimadzu GC-17A accoppiato ad uno spettrometro di massa quadrupolo Shimadzu QP-5000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Giappone). Per l'analisi è stata utilizzata una colonna capillare DB-WAX (30 m × 0.25 mm i.d., spessore film 0.25 µm) (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) e le condizioni operative sono state le seguenti: 35°C per 5 min; 2°C/min fino a 183°C; 1 min a 183°C; 15°C/min fino a 210°C; 5 min a 210°C.

I composti sono stati identificati mediante uno spettrometro di massa con un voltaggio di ionizzazione di 70 eV operando in un range di massa di 33-300 amu. Gli spettri di massa sono stati registrati in TIC.

La temperatura della sorgente ionica e dell'interfaccia sono state fissate a 220°C.

I composti sono stati identificati mediante il confronto con tempi di ritenzione di composti standard e/o gli indici di Kovats e/o le banche dati NIST 12, NIST 62 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) ed Adams (2001).

La quantificazione dei composti è stata effettuata determinando in TIC l'intensità dello ione caratteristico della molecola. Per ciascun campione sono state effettuate tre analisi.

RISULTATI

Le analisi hanno permesso di identificare, nei formaggi modello prodotti utilizzando i 32 ceppi di batteri lattici in studio, 80 composti volatili fra cui 19 alcoli, 18 esteri, 16 acidi, 12 chetoni, 5 lattoni, 1 aldeide, 1 terpene e alcuni composti aventi più gruppi funzionali (Tabella 1).

L'Analisi Cluster, effettuata sui valori mediani delle aree degli ioni caratteristici calcolati per gli 80 composti volatili identificati nelle tre repliche dei formaggi, ha individuato la presenza nei ceppi di quattro raggruppamenti (Figura 1).

Al fine di evidenziare le differenze compositive fra i suddetti quattro gruppi, i valori mediani dei composti individuati ed utilizzati nell'Analisi Cluster sono stati sommati in funzione del gruppo di appartenenza del ceppo e riportati graficamente nella Figura 2.

Tabella 1: Composti identificati dall'analisi SPME-GC-MS sui formaggi prodotti con l'intervento dei ceppi lattici autoctoni in studio. Per ciascun composto è riportato il valore dell'indice di Kovats calcolato (KI) e lo ione caratteristico utilizzato per la quantificazione della molecola (m/z).

Composti	m/z	KI	2-Metilbutil esanoato	43	1318
Alcoli			Esil esanoato	43	1615
Etanolo	31	930	Etil octanoato	43	1437
Isobutanolo	43	1097	3-Metilbutil ottanoato	88	1455
2-Pentanololo	45	1142	Etil 9-decanoato	70	1474
1-Butanololo	41	1152	Etil 4-decanoato	55	1481
2-Metil-1-butanolo	56	1212	Metil nonanoato	41	1493
3-Metil-1-butanolo	55	1215	Butil decanoato	74	1780
1-Pentanololo	42	1256	Etil dodecanoato	56	1766
2-Eptanololo	45	1334	3-Metilbutil decanoato	88	1770
1-Esanolo	56	1354	Etil tetradecanoato	70	2051
2-Butossietanololo	57	1380	Etil esadecanoato	88	2226
2-Nonanololo	45	1528	Etil oleato	55	2480
Aldedi e Chetoni					
<i>c,i</i> 2,3-Butandiolo	45	1550	2-Pentanone	43	980
1-Ottanololo	41	1561	3-Metil-2-pentanone	43	1010
<i>meso</i> 2,3-Butandiolo	45	1583	Esanale	44	1080
2-Undecanololo	45	1596	2-Eptanone	43	1184
3,3-Dimetil-2-butanolo	57	1688	1-Ottanone	43	1280
Benzil alcol	79	1871	2-Ottanone	45	1274
Feniltil alcol	91	1912	3-idrossi-2-butanone (acetoino)	31	1294
1-Dodecanolo	43	1971	3-idrossi-2-pentanone	43	1384
Acidi			2-Nonanone	43	1410
Acido acetico	60	1406	5-Metil-2-esanone	43	1603
Acido propionico	74	1523	2-Undecanone	79	1630
Acido isobutanoloico	43	1563	1-(2-Piridil)-etanone	43	1799
Acido butanolico	60	1619	2-Tridecanone	43	2012
Acido isopentanolico	60	1664	2-Pentadecanone		
Acido pentanolico	60	1519	Lattoni		
Acido esanolico	60	1852	δ-Octalattone	99	1910
Acido insaturo	41	1923	δ-Nonalattone	99	2028
Acido eptanolico	60	1963	δ-Decalattone	99	2134
Acido ottanolico	60	2081	δ-Dodecalattone	99	2328
Acido nonanolico	60	2206	γ-Butirilattone	42	1622
Acido decanolico	60	2390	Terpene		
Acido undecenoico	60	2520	Limonene	68	1184
Acido undecanoico	60	2460	Miscellanea		
Acido benzolico	105	2423	1-Undecene	41	1190
Acido dodecanoico	60	2570	6-Metil-Ottadecano	57	1740
Esteri			1,3-Dimetossibenzene	138	1723
Etil butanoato	43	1040	1,1'-Ossibis-Ottano	57	1838
Etil esanoato	43	1238	2-Metossi-Piridina	79	1730
Metil ottanoato	74	1389	(2H)-2-Piranone, 5,6-didro-4-metil-	82	1613
Butil esanoato(Esil butanoato)	43	1425	Non identificato (45, 58, 75, 87, 102)	45	1450
Etil ottanoato	88	1438	Glicerina	61	2200

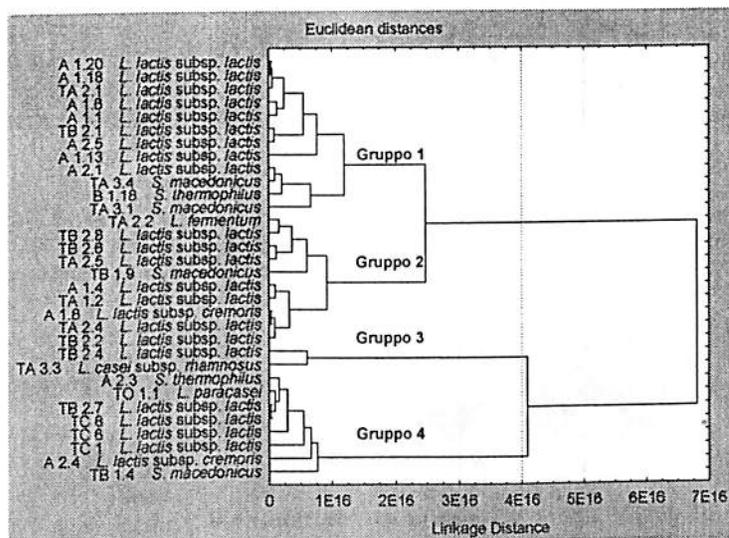
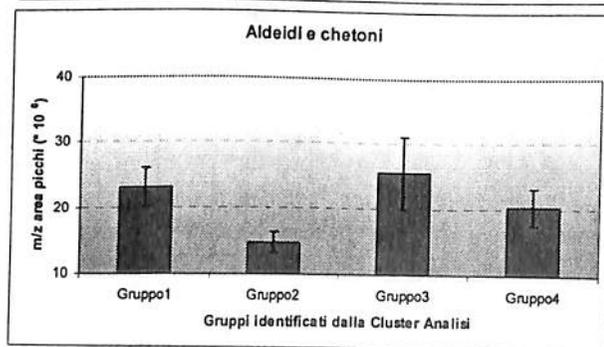
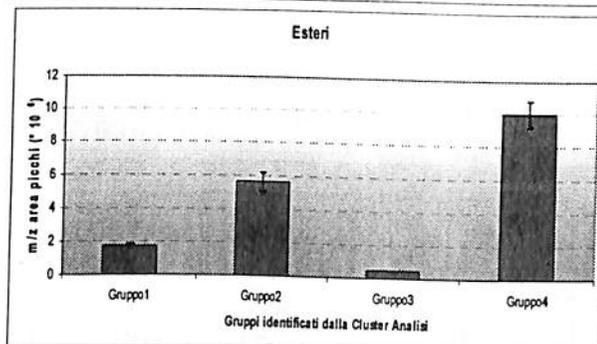
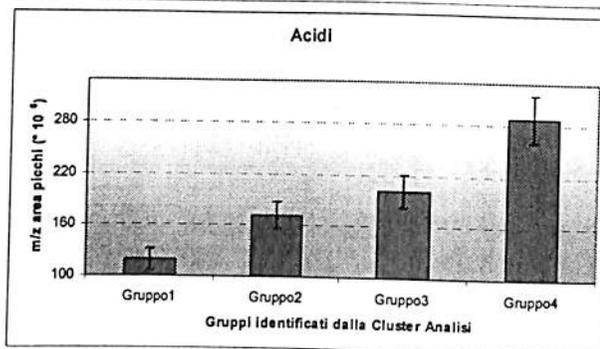
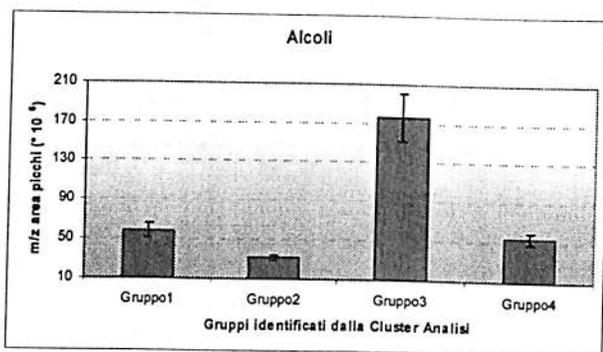


Figura 1: Dendrogramma ottenuto applicando l'Analisi Cluster sui valori delle intensità degli ioni caratteristici dei composti volatili determinati mediante SPME-GC-MS sui formaggi prodotti con i ceppi di batteri lattici autoctoni in studio.



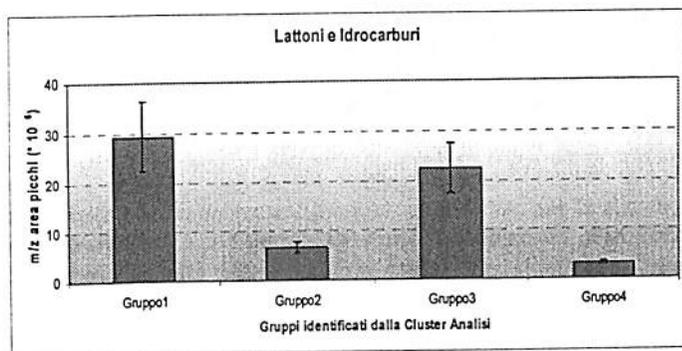


Figura 2: Sommatorie dei valori di intensità degli ioni caratteristici per le diverse classi di composti ed i diversi gruppi individuati dalla Cluster Analysis.

Il primo gruppo, costituito da 12 ceppi di cui 9 *L. lactis* subsp. *lactis*, 2 *S. macedonicus* e un ceppo di *S. thermophilus*, risulta caratterizzato da una produzione elevata di lattoni e idrocarburi e da basse produzioni di acidi (Figura 2). Il secondo gruppo è formato da 7 ceppi di *L. lactis* subsp. *lactis*, da un ceppo di *L. lactis* subsp. *cremoris* e un ceppo di *S. macedonicus*. Questo gruppo risulta costituito da ceppi batterici caratterizzati da basse produzioni di alcoli, aldeidi e chetoni. Al terzo gruppo sono ascritti invece solo due ceppi batterici, un *L. lactis* subsp. *lactis* e un *L. casei* subsp. *rhamnosus* che risultano produttori in particolare di alcoli, aldeidi e chetoni. Il quarto gruppo infine è formato da sette ceppi batterici di cui quattro *L. lactis* subsp. *lactis*, un *L. lactis* subsp. *cremoris*, un *L. paracasei* e un *S. macedonicus*. Questi ceppi batterici risultano essere caratterizzati da alte produzioni di acidi ed esteri, ma anche da basse produzioni di lattoni e di idrocarburi.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo studio oltre a confermare le potenzialità della tecnica SPME-GC-MS hanno evidenziato le spiccate differenze esistenti fra ceppi diversi di batteri lattici per quanto concerne la produzione di composti volatili.

Questi risultati unitamente ad altri rilievi di tipo biochimico e tecnologico quali la produzione di amine biogene o la velocità acidificante stanno consentendo di mettere a punto uno starter per la Toma Piemontese DOP che costituirà il primo esempio di innesto autoctono ottimizzato per un formaggio piemontese.

BIBLIOGRAFIA

- Adams R.P. (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadruple Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
- Ayad E.H.E., Verheul A., de Jong C., Wouters J.T.M., Smit G. (1999). Int. Dairy J. 9, 725-735.
- Ayad E.H.E., Verheul A.A., Wouters J.T.M., Smit G. (2000). Int. Dairy J. 10, 169-179.
- Cogan T.M., Barbosa M., Beuviel E., Bianchi-Salvadori B., Coconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C., Rodriguez E. (1997). J. Dairy Res. 64, 409-421.
- Weerkamp A.H., Klijn N., Neeter R., Smit G. (1996). Neth. Milk Dairy J. 50, 319-332.
- Wouters J.T.M., Ayad E.H.E., Hugenholtz J., Smit G. (2002). Int. Dairy J. 12, 91-109.