

STUDIO DEI COMPOSTI VOLATILI PRODOTTI DA BATTERI LATTICI AUTOCTONI IN LATTOINNESTI

Study of volatile compounds produced by wild lactic acid bacteria in milkcultures

Parole chiave: batteri lattici autoctoni, composti volatili, starter

Key words: wild lactic acid bacteria, flavour compounds, starter

SUMMARY

The aim of this work was to study 35 strains of wild lactic acid bacteria, isolated from Toma Piemontese cheeses, for their volatile compound production capability related to their use as starters. The data obtained from this research together with other biochemical and technological analysis, such as biogenic amines production and acidification kinetic, should be considered in the development of a new autochthonous starter that could be used for the production of Toma Piemontese cheese.

SOMMARIO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare dal punto di vista aromatico 35 ceppi di batteri lattici, isolati da cagliata e formaggio Toma Piemontese DOP, al fine di definirne la potenzialità aromatica in vista di un loro possibile utilizzo quali starter autoctoni. I risultati hanno evidenziato spiccate differenze aromatiche fra i ceppi studiati che unitamente ad altre analisi di tipo biochimico e tecnologico, quali la produzione di amine biogene o la cinetica di acidificazione, potranno consentire la messa a punto di uno starter autoctono da utilizzarsi nella produzione della Toma Piemontese.

INTRODUZIONE

Le caratteristiche compositive, sensoriali e strutturali di un formaggio sono in larga parte ascrivibili alla microflora presente o che vi ha operato durante le numerose fasi di produzione. È quindi evidente che l'utilizzo di latte crudo, così come avviene per molti dei formaggi italiani, pur salvaguardando la tradizionalità della produzione, può determinare, in relazione alla presenza di una microflora quanto mai variabile per entità e tipologia, una spiccata variabilità a livello compositivo, sensoriale e strutturale dei prodotti ottenuti. Al fine di ovviare a questo problema si sono quindi diffusi, da tempi ormai remoti, i lattoinnesti ed i sieroinnesti ossia miscele di batteri lattici preparate incubando, in condizioni particolari, il latte o il siero di lavorazioni precedenti. L'aggiunta di questi prodotti al latte prima della

caseificazione consente di controllarne la microflora presente e quindi di ottenere prodotti sufficientemente standardizzati pur partendo da latte crudo. La loro preparazione è però complessa ed essendo anch'essi caratterizzati da una variabilità nel tempo sono stati attualmente sostituiti dalle colture starter liofilizzate o congelate prodotte da industrie specializzate. Questi prodotti presentando costi di utilizzo molto contenuti, grande facilità di impiego ed un ottimo controllo delle caratteristiche finali del prodotto si sono ampiamente diffusi presso tutti i caseifici, soprattutto in quelli industriali e laddove l'utilizzo di latte pastorizzato richieda una integrazione alla microflora lattica presente (Sandine, 1996). L'utilizzo di queste colture starter selezionate ha però comportato una standardizzazione compositiva e sensoriale dei prodotti ottenuti ed una perdita di parte della tipicità ad essi

correlabile. Per ovviare a questo problema sono state quindi effettuate negli ultimi anni numerose ricerche volte alla selezione ed alla successiva caratterizzazione genotipica e fenotipica di batteri lattici autoctoni ossia di batteri isolati da formaggi artigianali da utilizzarsi come colture starter o non-starter funzionali durante la caseificazione nella produzione industriale degli stessi formaggi (Cogan *et al.*, 1997; Ayad *et al.*, 2000; Beukes *et al.*, 2001; De Vuyst *et al.*, 2002; Wouters *et al.*, 2002). Inoltre molti prodotti tradizionali raggiungono la loro intensità di 'flavour' grazie a batteri lattici non-starter (NSLAB), che si sviluppano nel prodotto durante la maturazione come microflora secondaria (Beresford *et al.*, 2001; De Angelis *et al.*, 2001).

In Italia, ad esclusione del Grana Padano DOP e del Parmigiano Reggiano DOP, la grande maggioranza dei formaggi viene attualmente prodotta con l'ausilio di colture starter e solo la Fontina DOP ed il Pecorino Toscano DOP fanno ricorso a starter autoctoni. In Piemonte, nonostante la presenza di ben dieci formaggi DOP, le colture starter autoctone non sono ancora disponibili e quindi da alcuni anni si sono sviluppate delle ricerche volte all'isolamento di batteri lattici utilizzabili quali starter autoctoni.

Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di caratterizzare, dal punto di vista aromatico, 35 ceppi di batteri lattici autoctoni, isolati da cagliate e formaggi stagionati di Toma Piemontese DOP, in vista di un loro possibile utilizzo come colture starter o come batteri lattici non-starter funzionali.

MATERIALI E METODI

Ceppi

I 35 ceppi di batteri lattici (21 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, 2 *Lactobacillus paracasei*, 1 *Lactobacillus fermentum*, 1 *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, 6 *Streptococcus macedonicus* e 2 *Streptococcus thermophilus*) studiati in questa ricerca sono stati isolati da cagliata o formaggio Toma Piemontese DOP (fig. 1) ed identificati mediante amplificazione della regione spaziatrice 16S/23S (RSA) e PCR specie-specifiche. Prima dell'utilizzo ogni ceppo, conservato in glicerolo a -30°C, è stato rivitalizzato in terreno di coltura M17 (Merck, Darmstadt, Germania).

Produzione dei lattoinnesti

I lattoinnesti (3 per ogni ceppo in esame) sono stati preparati con due trapianti successivi: il primo effettuato su 10 mL di latte pastorizzato commerciale a partire da brodocultura in M17 e il secondo su 30 mL di latte a partire dalla lattocoltura precedentemente ottenuta (per entrambi i trapianti: 2% di inoculo e incubazione a 37°C per 24 ore). Trascorse le 24 ore, il latte coagulato è stato posto a -18°C fino al momento dell'analisi. Come bianco è stato utilizzato il latte pastorizzato impiegato per i trapianti.

Analisi dei composti volatili

L'estrazione è stata effettuata mediante la tecnica SPME su 3 g di lattoinnesto posti in un vial da 10 mL con 0,84 g (28% w/w) di NaCl, 10 µL di standard inter-

no (1-eptanolo, 11,68 µg/mL) e chiusi con tappo in PTFE/silicone da 20 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). L'equilibratura è avvenuta a 42°C per 30 min, mentre l'estrazione è stata effettuata a 42°C per 20 min in spazio di testa statico e sotto agitazione magnetica utilizzando una fibra 50/30 µm DVB/Carboxen/PDMS da 2 cm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (Mallia *et al.*, 2005). Il desorbimento è stato effettuato a 270°C per 4 min (modalità splitless). La separazione e l'identificazione dei composti è stata effettuata utilizzando un gascro-



Fig. 1 - Toma Piemontese DOP.

matografo 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 x 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 acquisiti mediante uno spettrometro di massa con un voltaggio di ionizzazione

di 70 eV operando in un range di massa di 33-300 amu. La temperatura della sorgente ionica e dell'interfaccia sono state fissate a 220°C.

I composti sono stati identificati mediante il confronto degli analiti con tempi di ritenzione di composti standard autentici 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 integrando in TIC l'area (unità arbitraria) dei singoli composti e rapportandola allo standard interno.

Le analisi statistiche sono state eseguite mediante il software Statistica per Windows ver. 7.1 (StatSoft, Tulsa, USA).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Le analisi hanno permesso l'identificazione e la quantificazione, nei lattoinnesti prodotti con l'utilizzo di 35 ceppi di batteri lattici in studio, di un totale di 41 composti volatili. La Cluster Analysis effettuata sui valori mediani, calcolati sulle tre repliche, delle concentrazioni di ciascun composto identificato ha permesso di differenziare i ceppi in 6 gruppi (fig. 2).

Tra le differenti classi di composti volatili prodotti dai batteri lattici in esame, la predominante è risultata essere quella degli acidi liberi a corta catena provenienti principalmente dai metabolismi batterici della lipolisi e dalla conversione del lattosio (Smit *et al.*, 2005) (tab. 1). All'interno della classe degli acidi l'acido acetico è

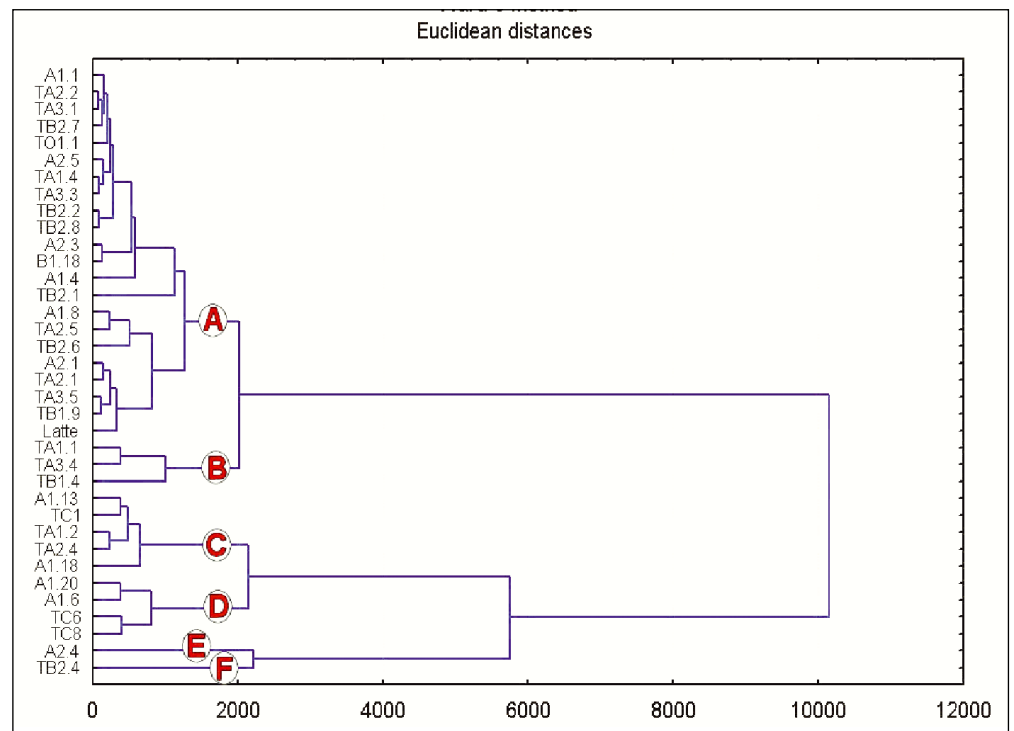


Fig. 2 - Dendrogramma ottenuto dall'Analisi Cluster eseguita sui valori mediani calcolati per ciascun composto volatile prodotto dai ceppi batterici in studio.

risultato il più abbondante, prodotto, in particolare, dal gruppo F costituito dal solo ceppo *L. lactis* subsp. *lactis* (TB 2.4).

Il gruppo E, costituito anch'esso da un solo ceppo di *L. lactis* subsp. *lactis* (A 2.4), è stato caratterizzato invece dalla più alta concentrazione di alcoli ed in particolare di isopentanololo ed isobutanolo. Entrambi i gruppi hanno inoltre prodotto le più elevate concentrazioni di aldeidi, in particolare di 2- e 3-metil-butanale. Di conseguenza il metabolismo predominante di questi ceppi è rappresentato dal catabolismo degli aminoacidi, quali la leucina e l'isoleucina, formando le rispettive aldeidi ed alcoli. Tali aldeidi ramificate, impartiscono note di malto/ciocccolato con bassa soglia olfattiva. La produzione di un tale flavour maltato sembra essere caratteristico di

pochi ceppi 'wild' di *L. lactis* (Ayad *et al.*, 1999), differenti dai comuni starter. Il gruppo B, costituito da 3 ceppi di *S. macedonicus*, ha prodotto invece le minori quantità di alcoli ma le più elevate quantità di α -chetoni (acetoino e 3-idrossi-2-pentanone), di α -dichetoni (diacetile) e di esteri anch'essi di forte impatto aromatico. L'acetoino e il diacetile sono due composti che derivano dal metabolismo degli zuccheri e dell'acido citrico e sono riconosciuti come i composti responsabili dell'aroma di burro, tipico dei formaggi. Il gruppo A, costituito da 21 ceppi, è risultato invece il meno caratterizzato aromaticamente in quanto ha presentato un profilo aromatico quali-quantitativo simile a quello del latte di partenza a cui viene per altro accomunato dalla Cluster Analysis.

Tabella 1

Composti identificati (in ordine di eluizione) e quantificati (valori mediани della concentrazione ($\mu\text{g}/\text{kg}$) calcolati per ciascuno dei gruppi individuati dall'Analisi Cluster).

Composti	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C	Gruppo D	Gruppo E	Gruppo F
2-CH ₃ -Propanale+Acetone ^a	-	-	-	-	335,6	240,2
Acetone	75,6	172,0	88,8	120,3	-	-
Etil acetato	4,4	11,1	-	6,7	8,4	-
2-Butanone	34,4	50,5	30,9	33,3	51,3	26,8
2-CH ₃ -Butanale	-	-	21,1	47,5	178,4	320,5
3-CH ₃ -Butanale	-	-	33,6	29,3	705,7	-
Etanolo	31,9	53,8	36,6	89,6	343,5	27,9
2-Pentanone	-	8,3	-	-	-	-
2,3-Butandione (Diacetile)	29,6	101,9	25,6	14,7	18,5	37,1
2,3-Pentandione	7,5	61,7	-	0,8	-	-
Butil acetato	-	2,9	-	-	-	-
Esanale	0,2	-	-	-	-	-
Isobutanolo	-	-	19,4	37,8	101,6	125,8
Pentilacetato	-	-	-	-	-	3,7
2-Eptanone	6,7	21,7	8,8	10,6	20,9	15,7
2-Pentenale	-	-	-	-	-	16,4
Isopentanolo	8,6	5,7	678,8	1.332,9	3.747,8	2.329,1
3-CH ₃ -3-Buten-1-olo	2,6	9,3	1,8	-	-	-
1-Pentanolo	3,1	5,5	2,3	1,0	-	4,6
Acetoino	170,9	482,2	28,6	36,2	14,5	409,4
3-CH ₃ -2-Buten-1-olo	2,1	-	1,9	1,0	-	-
3-OH-2-Pentanone	23,9	122,4	13,2	32,1	-	25,7
Alcool (non identificato)	15,2	81,5	12,5	14,8	132,8	17,3
1-Esanolo	1,7	6,6	-	0,4	-	2,8
2-Nonanone	0,4	-	0,6	-	-	4,4
2-Butossietanolo	5,1	7,5	2,1	4,0	-	14,8
1-Etossi -2-eptene	-	-	7,0	-	-	-
Acido acetico	177,7	313,4	284,4	435,9	806,7	1761,7
Metil estere dell'ac. 2-OH-4-						
CH ₃ -pentanoico	-	-	60,1	22,7	989,3	137,6
Acido formico	-	-	4,5	7,0	24,6	19,2
2-CH ₃ -Tetraidrotiofen-3-one	-	-	-	8,5	-	10,0
2,3-Butandiolo <i>d,l</i>	-	-	-	9,5	19,3	63,9
2,3-Butandiolo <i>meso</i>	-	-	-	5,1	-	335,6
Acido butanoico	176,9	362,4	229,5	299,7	426,3	171,3
Acido isovalerico	-	-	-	-	13,5	-
Acido esanoico	332,8	623,7	385,6	552,5	879,9	384,6
Di-CH ₃ -sulfone	-	2,9	-	-	6,4	-
2-Feniletanolo	-	-	15,2	33,1	42,8	105,7
Acido ottanoico	116,7	261,4	134,9	226,0	352,3	166,0
Acido decanoico	24,1	55,7	31,3	56,4	76,8	40,5
Acido benzoico	12,1	14,4	6,5	35,0	46,8	31,1

^a Co-eluzione.

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo studio, oltre a confermare le potenzialità della tecnica HS-SPME-GC/MS nell'individuazione di composti aromatici a differente pola-

rità da matrici biologiche, hanno evidenziato spiccate differenze esistenti fra i ceppi di batteri lattici studiati dal punto di vista aromatico. Questi risultati, unitamente ad altre analisi di tipo biochimico e tecnologico, quali la produzione

di amine biogene o la cinetica di acidificazione consentiranno la messa a punto di nuovi starter che costituiranno il primo esempio di innesto di tipo autoctono da utilizzarsi nella produzione della Toma Piemontese DOP.

BIBLIOGRAFIA

- W.E. Sandine (1996). Commercial production of dairy starter cultures. In T.M. Cogan, J.-P. Accolas (Ed.), *Dairy starter cultures*, pp. 191-206, New York: Wiley-VCH.
- T.M. Cogan, M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchi-Salvadori, P.S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulos, A. Ledda, M. Medina, M.C. Rea, E. Rodrigez (1997). Characterisation of lactic acid bacteria in artisanal dairy products, *J. Dairy Res.*, 64, 409-421.
- E.H.E. Ayad, A. Verheul, J.T.M. Wouters, G. Smit (2000). Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making. *Int. Dairy J.*, 10, 169-179.
- E.M. Beukes, B.H. Bester, J.F. Mostert (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *Int. J. Food Microbiol.*, 63, 189-197.
- L. De Vuyst, V. Schrijvers, S. Paramithiosis, B. Hoste, M. Vancanneyt, J. Swings, G. Kalantzopoulos, E. Tsakalidou, W. Messens (2002). The biodiversity of lactic acid bacteria in Greek traditional wheat sourdoughs is reflected in both composition and metabolite formation. *App. Environ. Microbiol.*, 68, 6059-6069.
- J.T.M. Wouters, E.H.E. Ayad, J. Hugenholtz, G. Smit. (2002). Microbes from raw milk for fermented dairy products. *Int. Dairy J.*, 12, 91-109.
- T.P. Beresford, B.H. Bester, J.F. Mostert (2001). Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, 11, 259-274.
- M. De Angelis, A. Corsetti, N. Tosti, J. Rossi, M.R. Corbo, M. Gobbetti (2001). Characterization of non-starter lactic acid bacteria from Italian ewe cheeses based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *App. Environ. Microbiol.*, 67, 2011-2020.
- S. Mallia, E. Fernandez-Garcia, J. Olivier Bosset (2005). Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses, *Int. Dairy J.*, 15, 741-758.
- R.P. Adams (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadruple Mass Spectroscopy, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.
- G. Smit, B.A. Smit, W.J.M. Engels (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products, *FEMS Microbiol. Rev.*, 29, 591-610.
- E.H.E. Ayad, A. Verheul, C. de Jong, J.T.M. Wouters, G. Smitt (1999). Flavour forming abilities and amino acid requirements of *Lactococcus lactis* strains isolated from artisanal and non-dairy origin, *Int. Dairy J.*, 9, 725-735.

Ricevuto il 10 ottobre 2007