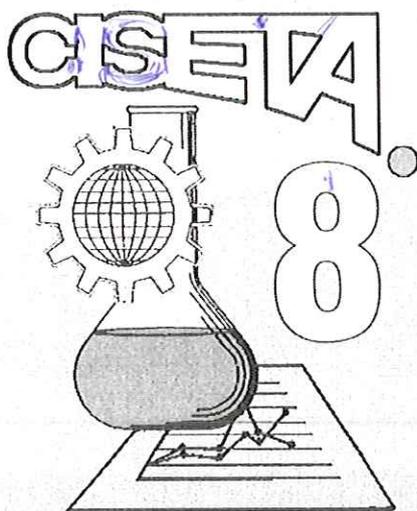


Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare

volume VIII



a cura di
Sebastiano Porretta



Consiglio Nazionale delle Ricerche

CHIARIOTTI EDITORI



RICERCHE E INNOVAZIONI NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

Volume VIII

A CURA DI
SEBASTIANO PORRETTA

ATTI DELL'8° CONGRESSO ITALIANO DI SCIENZA
E TECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI (8° CISETA)

FIERA MILANO, RHO (MI), 7-8 MAGGIO 2007

CHIRIOTTI EDITORI
Pinerolo - Italia

© Copyright 2008

Chiriotti Editori S.a.s. - Pinerolo - Italy

I diritti di riproduzione, anche parziale, del testo sono strettamente riservati
per tutti i Paesi

ISBN-13: 978-88-96027-00-4

EVIDENZA DELLA CAPACITÀ DEI BATTERI LATTICI DI PRODURRE TERPENI

Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali (DiVaPRA) - Università di Torino - Grugliasco (TO)

INTRODUZIONE

Le numerose sostanze, fra cui alcoli, chetoni, acidi, aldeidi, idrocarburi, lattoni, esteri, composti solforati, che entrano a far parte della componente volatile dei prodotti lattiero-caseari e ne caratterizzano il flavour sono in larga parte ascrivibili al metabolismo dei batteri lattici, i principali rappresentanti della microflora dei prodotti stessi (Gerrit *et al.*, 2005). Nel caso dei terpeni invece la loro presenza è stata attribuita alla composizione vegetale del pascolo (Cornu *et al.*, 2005; Zeppa *et al.*, 2005) od al metabolismo di funghi del genere *Penicillium* utilizzati nella produzione di alcuni formaggi quali il Brie e il Camembert (Larsen, 1998). Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di valutare se i batteri lattici sono in grado di produrre *ex novo* sostanze di natura terpenica e definire l'effetto che il mezzo di coltura può svolgere su questa attività.

MATERIALI E METODI

Campioni

Sono stati utilizzati cinque ceppi di batteri lattici appartenenti alla collezione del Di.VA.P.R.A. (Università di Torino): un *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, un *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, uno *Streptococcus thermophilus*, uno *Streptococcus macedonicus* ed un *Lactobacillus paracasei*. I ceppi, crioconservati in M17 (Merck, Darmstadt, Germania) sono stati rivitalizzati con due trapianti successivi in M17 a 37°C per 24 ore (2% di inoculo). Ogni ceppo è stato inoculato al 2% in vials da 40 ml contenenti due mezzi di coltura differenti, M17 (Merck, Darmstadt, Germania) e Skim Milk Medium (SKM, Oxoid, Germania), successivamente incubati a 37°C per 2 giorni. La crescita dei ceppi è stata monitorata attraverso la misura del pH. I campioni sono stati analizzati dopo 6, 24 e 48 ore di crescita mediante tecnica HS-SPME-GC/MS. Come campioni di controllo sono stati utilizzati vials contenenti i terreni di coltura sterili.

Analisi HS-SPME-GC/MS.

I vials contenenti i campioni sono stati posti in un blocco di alluminio termostato a 53°C. Dopo 10' di equilibrio, sono stati estratti per 1 h con una fibra trifasica StableFlex 2 cm-50/30

μm divinilbenzene/carboxen/polidimetilsilossano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco). I campioni sono stati quindi analizzati con un gascromatografo Shimadzu GC-17A accoppiato a uno spettrometro di massa a quadrupolo Shimadzu QP-5000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dotato di una colonna capillare DB-WAX, 30 m \times 0.2 mm i.d., 0.25 mm spessore del film (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, USA) e iniettore split/splitless. Il gas carrier è stato elio con un flusso di 1 ml/min. È stata usata la seguente programmata di temperatura: 35°C per 5', 2°C/min fino a 135°C, 135°C per 1 minuto, 15°C/min fino a 210°C, 210°C per 5'. Gli spettri di massa sono stati registrati tra 33 e 300 uma con una energia di ionizzazione a impatto elettronico di 70 eV. La sorgente e l'interfaccia sono stati mantenuti a 230°C e la velocità di scansione è risultata essere di 500 amu/sec. L'acquisizione è stata impostata a partire da 1 minuto dallo start up. L'identificazione dei composti è stata effettuata paragonando gli spettri di massa con quelli presenti nei database NIST 12, NIST 62 ed Adams, e con quelli di standard autentici.

Quantificazione

La concentrazione del geraniolo è stata determinata mediante una calibrazione esterna utilizzando l'area del picco corrispondente allo ione caratteristico (m/z 69) individuato in TIC. Per la calibrazione sono state utilizzate soluzioni a concentrazione nota di geraniolo in M17 ed in SKM analizzate con la stessa procedura utilizzata per i campioni.

Per entrambi i mezzi di coltura sono stati determinati il limite di rilevazione (LOD) ed il limite di quantificazione (LOQ) del geraniolo (Clifton, 1996).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i ceppi esaminati hanno evidenziato la capacità di biosintetizzare il geraniolo in concentrazioni dipendenti dalla specie, dal tempo di incubazione e dal mezzo colturale utilizzato. In SMK non è stato possibile rilevare il geraniolo (LOD=2 ppb) con l'eccezione del *L. paracasei* in cui la produzione è risultata essere inferiore al limite di quantificazione (LOQ) ossia ad 7.5 ppb.

Tabella 1. Produzione di geraniolo in mezzo colturale M17 (ppb).

Ceppo	6 h	24 h	48 h
<i>L. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<LOD	2	<LOQ
<i>S. macedonicus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<i>S. thermophilus</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<i>L. lactis</i> ssp. <i>cremoris</i>	<LOQ	<LOQ	<LOQ
<i>L. paracasei</i>	<LOQ	4,02	4,36

Una situazione migliore si è avuta con il mezzo colturale M17 dove si è osservato che solo i ceppi *S. macedonicus*, *S. thermophilus* e *L. lactis* ssp. *cremoris* hanno prodotto quantità di geraniolo inferiori al LOQ fissato a 1.90 ppb. Invece i ceppi *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. paracasei* hanno biosintetizzato geraniolo in quantità superiori al LOQ. In particolare *L. paracasei* ne ha prodotto la maggior quantità, pari a 4.36 ppb, a 48 h (Tabella 1).

Benché preliminari i risultati di questo lavoro hanno numerose ed interessanti conseguenze. Innanzi tutto si è evidenziato che anche i batteri lattici sono in grado di sintetizzare composti terpenici.

Questo ha importanti ricadute biotecnologiche e sono quindi necessari nuovi studi per definire sia le differenze esistenti a livello di ceppi sia l'effetto che il mezzo colturale e le condizioni di coltura possono avere su questa biosintesi. Inoltre la possibilità da parte dei batteri lattici di produrre per biosintesi dei composti terpenici può essere preso in considerazione negli studi di tracciabilità delle produzioni lattiero-casearie basati proprio sulle molecole terpeniche ritenute sinora provenienti esclusivamente dall'erba consumata dagli animali.

BIBLIOGRAFIA

S. Gerrit, G. Smit, B.A Smit, W.J.M. Engels, M. Batenburg. "Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products". FEMS Microbiology Reviews, 29, 591-610, 2005.

A. Cornu, N. Kondjoyan, B. Martin, I. Vedier-Metz, P. Pradel, J.L. Berdague, J. B. Coulon "Terpene profiles in Cantal and Saint-Nectaire-type cheese made from raw or pasteurized milk". J. Sci. Food Agric. 85, 2040-2046, 2005.

T.O. Larsen "Volatile flavour production by *Penicillium caseifulvum*". Int. Dairy Journal 8 883-887, 1998.

E.M. Clifton. "Pesticide laboratory training manual", AOAC International, Gaithersburgh, Maryland, USA, pp. 70-72, 162, 373-375, 1996.

G. Zeppa, M. Giordano, M. Bertolino, V. Gerbi "Application of artificial neural network on mono- and sesquiterpenes compounds determined by headspace solid-phase microextraction – gas chromatography-mass spectrometry for the Piedmont ricotta cheese traceability" J. of Chrom. A, 1-2, 247-253, 1071.

RIASSUNTO

I batteri lattici sono responsabili della produzione di numerosi composti organici (alcoli, acidi, chetoni, aldeidi, lattoni, idrocarburi, esteri, composti solforati) determinanti il flavour e quindi la qualità dei prodotti lattiero-caseari. La presenza di terpeni nei formaggi è stata invece sinora attribuita essenzialmente alla alimentazione a base di vegetali verdi da parte degli animali od al metabolismo di alcuni funghi, quali *Penicillium*. In questo lavoro è stata valutata la capacità di cinque ceppi di batteri lattici di produrre terpeni *ex novo* in differenti mezzi di

coltura (M17 e Skim Milk Medium). Molti dei ceppi esaminati hanno evidenziato la capacità di biosintetizzare il geraniolo nei due mezzi di coltura utilizzati in concentrazioni dipendenti oltrechè dal mezzo colturale dal tempo di incubazione e dal ceppo considerato. In particolare un ceppo di *Lactobacillus paracasei* ha evidenziato le maggiori capacità di biosintesi in M17 dopo 48 ore di incubazione.

SUMMARY

PRELIMINARY EVIDENCE OF TERPENE BIOSYNTHESIS BY LACTIC ACID BACTERIA STRAINS

Lactic Acid Bacteria are responsible for the production of many volatile components (alcohols, aldehydes, ketones, lactones, hydrocarbons, esters, sulphur compounds) that contribute to the flavour of dairy products. Instead the presence of terpenes, especially in cheese, was mainly attributed to the vegetative composition of the pasture or to the metabolism of cheese-associated fungi belonging to Penicillium species. The present work is a preliminary study on the capability of some LAB strains to produce terpenes ex novo on different culture media (M17 and Skim Milk Medium). Results showed that most of the tested strains biosynthesized geraniol ex novo on both culture media. Lactobacillus paracasei strain produced the highest amount of geraniol.