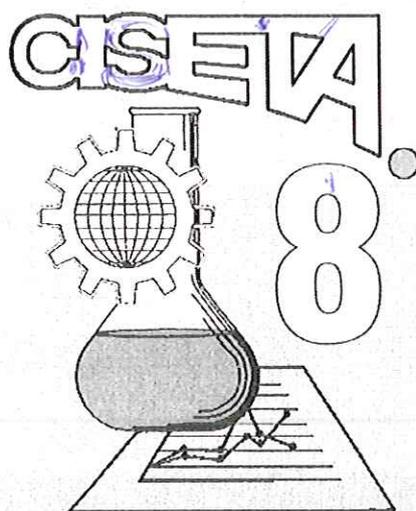


# Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare

volume VIII

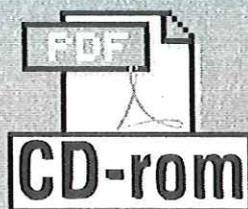


a cura di  
**Sebastiano Porretta**



Consiglio Nazionale delle Ricerche

CHIROTTI 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

## STUDIO DEI COMPOSTI VOLATILI PRODOTTI DA BATTERI LATTICI AUTOCTONI IN LATTOINNESTI

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

### INTRODUZIONE

Molti formaggi DOP della realtà italiana vengono prodotti utilizzando colture naturali ottenute incubando, in particolari condizioni, il latte crudo od il siero ottenuto da lavorazioni precedenti. L'inoculo è caratterizzato da una presenza bilanciata di batteri lattici, ma richiede lunghi tempi di preparazione e può risultare variabile nel tempo.

Al fine di ottenere prodotti più standardizzati, ovviando ai limiti dei lattoinnesti e dei sieroinnesti, si è quindi passati all'impiego di colture starter liofilizzate o congelate caratterizzate da una significativa semplicità d'uso e da costi limitati, ma che determinano un impoverimento organolettico del prodotto finito. Pertanto, negli ultimi anni, numerosi lavori hanno concentrato la loro attenzione sulla selezione e la successiva caratterizzazione genotipica e fenotipica di nuovi ceppi batterici autoctoni isolati da formaggi artigianali, da utilizzarsi quali starter in caseificazione (Cogan *et al.*, 1997; Ayad *et al.*, 2000; Wouters *et al.*, 2002).

Sebbene in Italia le colture starter autoctone siano già da tempo utilizzate per la produzione di importanti formaggi DOP quali l'Asiago, il Bitto, la Fontina ed il Pecorino toscano nessuno dei formaggi piemontesi DOP utilizza questo tipo di colture. Lo scopo di questo lavoro è stato quindi quello di studiare dal punto di vista aromatico 35 ceppi di batteri lattici autoctoni, isolati da cagliate e formaggi stagionati di Toma Piemontese DOP, il principale formaggio dell'arco alpino nord-occidentale, al fine di definirne la potenzialità aromatica in vista di un loro possibile utilizzo quali colture starter.

### MATERIALI E METODI

#### *Campioni*

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*) utilizzati in questo studio 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 (Merek, Darmstadt, Germania) con 2 trapianti successivi a 37°C per 24 ore (1% di inoculo).

#### ***Produzione dei lattoinnessi***

I lattoinnessi (3 per ogni ceppo in esame) sono stati preparati con due trapianti in condizioni sterili: il primo effettuato su 10 mL di latte pastorizzato commerciale a partire da brodocultura e il secondo su 30 mL di latte a partire dalla lattocultura precedentemente ottenuta (per entrambi i trapianti: 2% di inoculo e incubazione a 37° 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'analisi è stata effettuata mediante la tecnica SPME su 3 g di lattoinnesso posti in un vial da 10 mL con 0,84 g (28% w/w) di NaCl, 10 µL di standard interno (1-eptanolo, conc. 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 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. 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 integrando in TIC l'area (unità arbitraria) dei singoli composti e rapportando questa a quella dello standard interno.

## **RISULTATI E DISCUSSIONE**

Le analisi hanno permesso l'identificazione e la quantificazione, nei lattoinnessi prodotti utilizzando i 35 ceppi di batteri lattici in studio, di 41 composti volatili.

La Cluster Analysis effettuata sui valori mediani delle concentrazioni dei 41 composti calcolati nelle 3 repliche, ha permesso di differenziare i ceppi in 6 gruppi (Figura 1).

Tra le differenti classi di composti volatili prodotti dai batteri lattici in esame, la predominante è risultata essere quella degli acidi e all'interno di essa il composto più abbondante è stato l'acido acetico prodotto, in particolare, dal gruppo F costituito dal solo ceppo *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* TB 2.4 (Tabella 1).

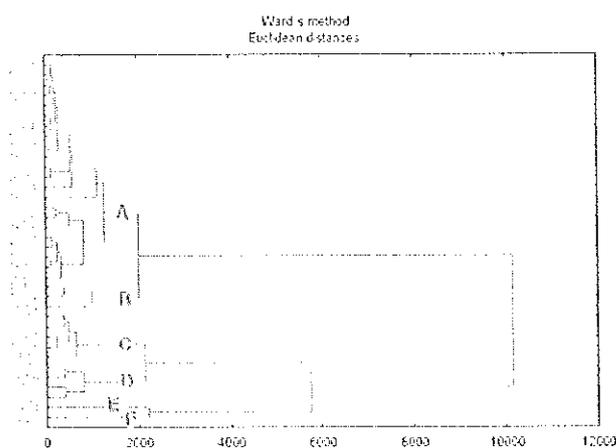


Figura 1 - Dendrogramma ottenuto dall'Analisi Cluster eseguita sui valori mediani calcolati per ciascun composto volatile prodotto dai ceppi batterici in studio.

Il gruppo E, costituito anch'esso da un solo ceppo di *Lactococcus 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 ed in particolare di 2-metil- e 3-metil-butanale. Il gruppo B, costituito da 3 ceppi di *Streptococcus macedonicus*, ha prodotto invece le minori quantità di alcoli, ma, al contrario, le più elevate quantità di  $\alpha$ -chetoli (acetoino e 3-idrossi-2-pentanone), di  $\alpha$ -dichetoni (diacetile) e di esteri di forte impatto aromatico. Il gruppo A è risultato il meno caratterizzato aromaticamente in quanto presenta un profilo simile a quello del latte di partenza a cui viene per altro accomunato dalla Cluster Analysis.

Tabella 1 - Composti identificati e quantificati (valori mediani 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 <sub>3</sub> -						
Propanale+Acetone	0	0	0	0	335,6	240,2
Acetone	75,6	172,0	88,8	120,3	0	0
Etil acetato	4,4	11,1	0	6,7	8,4	0
2-Butanone	34,4	50,5	30,9	33,3	51,3	26,8
2-CH <sub>3</sub> -Butanale	0	0	21,1	47,5	178,4	320,5
3-CH <sub>3</sub> -Butanale	0	0	33,6	29,3	705,7	0
Etanolo	31,9	53,8	36,6	89,6	343,5	27,9
2-Pentanone	0	8,3	0	0	0	0
2,3-Butandione	29,6	101,9	25,6	14,7	18,5	37,1
2,3-Pentandione	7,5	61,7	0	0,8	0	0
Butil acetato	0	2,9	0	0	0	0
Esanale	0,2	0	0	0	0	0
Isobutanolo	0	0	19,4	37,8	101,6	125,8

Pentilacetato	0	0	0	0	0	3,7
2-Eptanone	6,7	21,7	8,8	10,6	20,9	15,7
2-Pentenale	0	0	0	0	0	16,4
Isopentanolo	8,6	5,7	678,8	1.332,9	3.747,8	2.329,1
3-CH <sub>3</sub> -3-Buten-1-olo	2,6	9,3	1,8	0	0	0
1-Pentanolo	3,1	5,5	2,3	1,0	0	4,6
Acetoino	170,9	482,2	28,6	36,2	14,5	409,4
3-CH <sub>3</sub> -2-Buten-1-olo	2,1	0	1,9	1,0	0	0
3-OH-2-Pentanone	23,9	122,4	13,2	32,1	0	25,7
Alcol (non identificato)	15,2	81,5	12,5	14,8	132,8	17,3
1-Esanolo	1,7	6,6	0	0,4	0	2,8
2-Nonanone	0,4	0	0,6	0	0	4,4
2-Butossietanolo	5,1	7,5	2,1	4	0	14,8
1-Etossi-2-eptene	0	0	7,0	0	0	0
Ac. acetico	177,7	313,4	284,4	435,9	806,7	1761,7
Metil estere dell'ac. 2-OH-4-CH <sub>3</sub> -pentanoico	0	0	60,1	22,7	989,3	137,6
Ac. formico	0	0	4,5	7,0	24,6	19,2
2CH <sub>3</sub> -Tetraidrotiofen-3-one	0	0	0	8,5	0	10,0
2,3-Butandiolo <i>d,l</i>	0	0	0	9,5	19,3	63,9
2,3-Butandiolo <i>meso</i>	0	0	0	5,1	0	335,6
Ac butanoico	176,9	362,4	229,5	299,7	426,3	171,3
Ac. isovalerico	0	0	0	0	13,5	0
Ac. esanoico	332,8	623,7	385,6	552,5	879,9	384,6
DiCH <sub>3</sub> -sulfone	0	2,9	0	0	6,48	0
2-Feniletanolo	0	0	15,2	33,1	42,8	105,7
Ac. ottanoico	116,7	261,4	134,9	226,0	352,3	166,0
Ac. decanoico	24,1	55,7	31,3	56,4	76,8	40,5
Ac. benzoico	12,1	14,4	6,5	35,0	46,8	31,1

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo studio, oltre a confermare le potenzialità della tecnica HS-SPME-GC/MS, hanno evidenziato le 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 starter da utilizzarsi nella produzione della Toma Piemontese DOP che costituiranno il primo esempio di innesto autoctono in Piemonte.

## BIBLIOGRAFIA

R.P. Adams (2001). Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Quadruple Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA.

EHE Ayad, A Verheul, JTM Wouters, G Smit. "Application of wild starter cultures for flavour development in pilot plant cheese making". International Dairy Journal, 10, 169-179, 2000.

T. M. Cogan, M. Barbosa, E. Beuvier, B. Bianchi-Salvadori, P.S. Cocconcelli, I. Fernandes, J. Gomez, R. Gomez, G. Kalantzopoulous, A. Ledda, M. Medina, M.C. Rea, E. Rodriguez. "Characterisation of lactic acid bacteria in artisanal dairy products". Journal of Dairy Research, 64, 409-421, 1997.

S. Mallia, E.Fernandez-Garcia, J.Olivier Bosset. " Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses" . 15,741-758, 2005.

JTM Wouters, EHE Ayad, J. Hugenholtz, G. Smit. "Microbes from raw milk for fermented dairy products". International Dairy Journal, 12, 91-109,2002.

## RIASSUNTO

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di studiare dal punto di vista aromatico 35 ceppi di batteri lattici, isolati da cagliata o 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.

## SUMMARY

### *STUDY OF VOLATILE COMPOUNDS PRODUCED BY WILD LACTIC ACID BACTERIA IN MILK CULTURES*

*The aim of this work was to study 35 strains of wild lactic acid bacteria, isolated from Toma Piemontese cheeses, for their volatile compounds production capability related to their use as starter. 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.*