AROMI ADDITIVI SEMILAVORATI

# INGREDIENTI ALIMENTARI

Gennaio/Febbraio 2009
anno 8 - numero 42

UNIGLAD INGREDIENTI
Confezioniamo e distribuiamo ingredienti e servizi per l'industria alimentare e dolciaria

LA QUALITÀ È LA NOSTRA MATERIA PRIMA

PRODOTTI CONVENZIONALI

**Sciroppi**
Glucosio ad alto destrosio
Glucosio ad alto maltosio
Glucosio con fruttosio
Fruttosio liquido
Sorbitolo liquido
Maltitolo liquido

**Amidi**
Frumento
Mais

**Zuccheri**
Fondente
Invertito

**Altri prodotti**
Maltodestrine
Maltodestrine agglomerate
Sciroppo di glucosio disidratato
Glutine di frumento
Proteine vegetali di frumento
Fecola di patate
Destrosio monoidrato e anidro
Fruttosio cristallino
Maltitolo cristallino
Sorbitolo cristallino
Polidestrosio
Miele

PRODOTTI BIOLOGICI

**Sciroppi**
Fruttosio
Frumento
Manioca
Mais
Riso
Farro
Kamut

**Sciroppi disidratati**
Frumento
Riso
Malto orzo
Malto mais
Tapioca

**Malti**
Riso
Mais
Orzo

**Amidi**
Frumento
Tapioca

**Zuccheri**
Canna
Invertito

**Succhi frutta concentrati**
Fico
Dattero
Prugna

**Altri prodotti**
Glutine di frumento
Succo uva concentrato

**Uniglad Ingredienti s.r.l.**
Via dell'Artigianato, 13 - 12060 Grinzane Cavour (Cn) I
T. 0173 262744 - F. 0173 262745
info@unigladingredienti.com

SEDAMYL sipal partners Galam SYRAL

www.unigladingredienti.com

10064 PINEROLO - ITALIA - TEL.0121393127 - FAX 0121794480
e-mail: info@chiriottieditori.it

CHIRIOTTI EDITORI

Poste Italiane spa • Sped. in A.P. - D.L.353/2003 (Conv. in L. 27/02/2004 nº 46) art. 1, comma 1, DCB TO - N. 1/2009

MANUELA GIORDANO* - SIMONA BELVISO - GIUSEPPE ZEPPA
Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali (Di.Va.P.R.A.) - Università di Torino - Via L. Da Vinci 44 - 10095 Grugliasco - TO - Italia
*e-mail: manuela.giordano@unito.it

# PRODUZIONE DI COMPOSTI TERPENICI VOLATILI DA PARTE DI BATTERI LATTICI

Production of terpenic volatile compounds by lactic acid bacteria strains

Parole chiave: terpeni, batteri lattici, SPME
Key words: terpenes, lactic acid bacteria, SPME

**SUMMARY**

*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.

**SOMMARIO**

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 all'alimentazione a base di vegetali verdi da parte degli animali o 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.

## INTRODUZIONE

La componente volatile dei prodotti lattiero-caseari, che ne caratterizza il flavour, è in larga parte ascrivibile al metabolismo dei batteri lattici, i principali rappresentanti della microflora di questi prodotti, ed è caratterizzata da numerose classi di composti, quali principalmente alcoli, chetoni, acidi, aldeidi, idrocarburi, lattoni, esteri e composti solforati (Gerrit *et al.*, 2005). I terpeni rappresentano una classe di componenti volatili. rilevati da vari Autori in tracce nel latte e nei suoi derivati. La loro presenza sembrerebbe essere prevalentemente legata all'alimentazione degli animali a base di foraggi verdi ed in particolare di dicotiledoni, più ricche in terpeni rispetto alle monocotiledoni (Bosset *et al.*, 1999; Cornu *et al.*, 2005; Zeppa *et al.*, 2005). La produzione dei terpeni viene anche attribuita al metabolismo di funghi del genere *Penicillium* utilizzati nella produzione di alcuni formaggi quali il Brie e il Camembert. Per esempio è stato osservato che il *P. caseifulvum* è in grado di produrre terpeni quali il limonene e l'α-cariofillene su un mezzo colturale liquido (Larsen, 1998).

A differenza di altri composti volatili che danno origine al flavour dei prodotti lattiero-caseari, i terpeni non sono stati studiati come possibili metaboliti volatili dei batteri lattici (LAB). In particolare non ci sono informazioni riguardanti la capacità dei LAB di biosintetizzare molecole di natura terpenica. Lo scopo di questa indagine è stato quello di valutare la capacità di alcuni ceppi di batteri lattici, scelti fra i maggiormente rappresentativi per i prodotti lattiero-caseari, di produrre *ex novo* sostanze terpeniche in differenti mezzi di coltura sintetici.

## 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 mezzo di coltura liquido 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 liquidi differenti, M17 (Merck, Darmstadt, Germania) e Skim Milk Medium (SKM, Oxoid, Germania), successivamente incubati a 37°C per 2 giorni (**fig. 1**). 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 i terreni di coltura sterili.

### Analisi HS-SPME-GC/MS

I singoli campioni sono stati posti in un blocco di alluminio termostatato a 53°C. Dopo 10 min di equilibrio, si è esposta la fibra (StableFlex 2 cm-50/30 $\mu$m divinilbenzene/carboxen/polidimetilsilossano (DVB/CAR/PDMS)) (Supelco) per 1 h. Quando il processo è stato completato, la fibra è stata inserita nell'iniettore di un gascromatografo Shimadzu GC-17A, per il desorbimento degli analiti a 270°C per 4 min. in

Fig. 1 - Campioni inoculati nei due mezzi di coltura liquidi M17 e Skim Milk.

condizioni splitless, accoppiato ad uno spettrometro di massa a quadrupolo Shimadzu QP-5000 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) dotato di una colonna capillare DB-WAX, 30 m×0,25 mm i.d., 0,25 $\mu$m spessore del film (J&W Scientific Inc., Folsom, CA, Usa). Si è utilizzato elio come carrier con flusso di 1 mL/min. È stata impostata 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 amu 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 era 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 acquisiti 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 calibrazione esterna, integrando l'area del picco corrispondente allo ione caratteristico (69 m/z) estratto in TIC. Per la calibrazione sono state utilizzate soluzioni a concentrazione nota di geraniolo in M17 analizzate con la stessa procedura utilizzata per i campioni (**fig. 2**). Per entrambi i mezzi di coltura sono stati determinati il limite di rilevazione (LOD) ed il limite di quantifica-

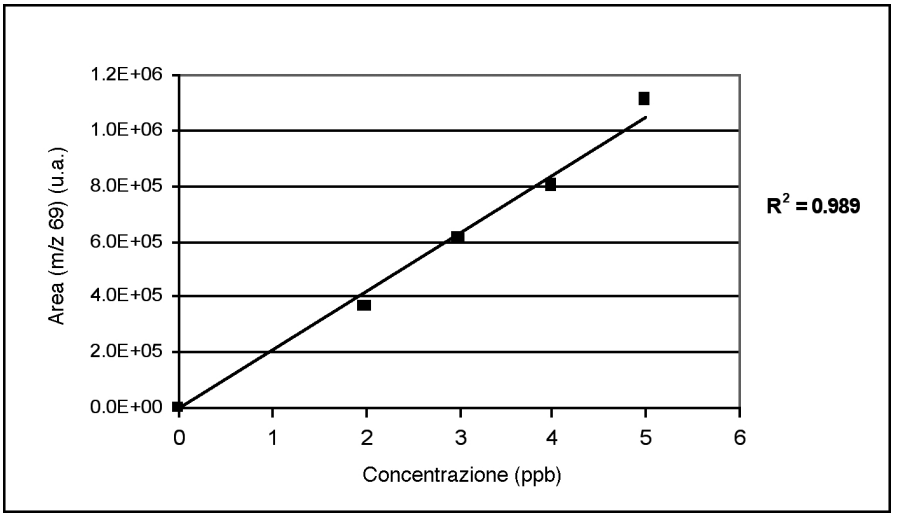


Fig. 2 - Calibrazione del geraniolo in M17.

zione (LOQ) del geraniolo (Clifton, 1996).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Tutti i ceppi esaminati hanno evidenziato una variabilità interspecifica nella capacità di biosintetizzare un alcool monoterpenico, il geraniolo, in concentrazioni dipendenti dalla specie, dal tempo di incubazione e dal mezzo colturale utilizzato.
Nel mezzo liquido SKM non è stato possibile rilevare il geraniolo in alcun campione durante la crescita (LOD=2 ppb), eccetto che per il ceppo *L. paracasei* la cui produzione era compresa tra il LOD ed il LOQ (LOQ=7,5 ppb).
Una situazione differente si è osservata con il mezzo colturale M17 dove è stato messo in evidenza che i ceppi *S. macedonicus*, *S. thermophilus* e *L. lactis* ssp. *cremoris* hanno prodotto quantità di geraniolo inferiori al LOQ, che in questo mezzo di coltura era 1,9 ppb. Invece i ceppi *L. lactis* ssp. *lactis* e *L. paracasei* hanno biosintetizzato geraniolo in quantità al di sopra del LOQ. In particolare, il ceppo *L. lactis* ssp. *lactis* ha prodotto in M17 una quantità di geraniolo pari a 2 ppb in corrispondenza delle 24 ore mentre alle 6 e 48 ore non è stato possibile effettuare una quantificazione (< LOQ) (**tab. 1**). *L. paracasei* invece ne ha prodotto tra le 6 e le 24 ore una quantità pari a 4,02 ppb (**fig. 3**) raggiungendo alle 48 ore la massima concentrazione corrispondente a 4,36 ppb (tab. 1).

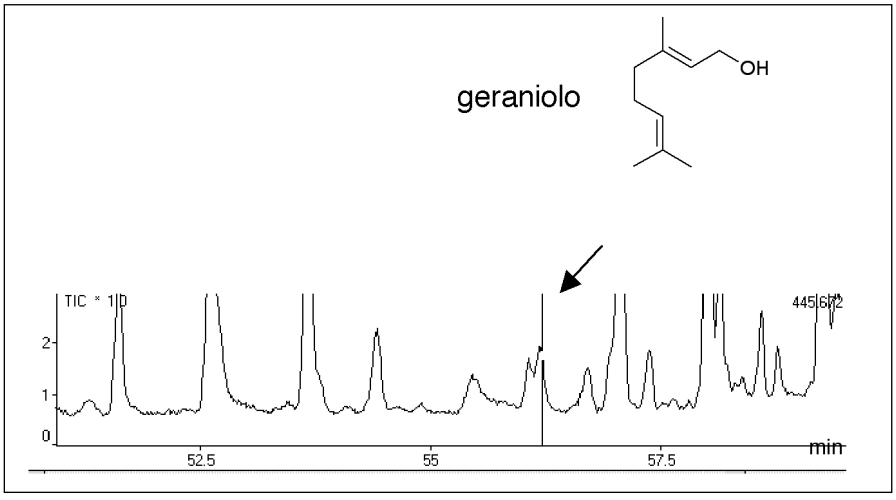


Fig. 3 - Profilo GC-MS in TIC di un campione (*L. paracasei*) in M17 in cui si evidenzia la presenza della molecola del geraniolo.

## CONCLUSIONI

Nel loro insieme i risultati ottenuti sembrano promettenti in quanto evidenziano che anche i batteri lattici sono in grado di sintetizzare composti di natura terpenica. Le informazioni sulla conoscenza di questo processo metabolico secondario potrebbero costituire la base per avviare nuovi studi al fine sia di definire differenze quali-quantitative esistenti a livello di ceppo, sia per la scelta del miglior mezzo colturale e delle condizioni di coltura ottimali per la biosintesi del geraniolo. Questo processo ottimizzato potrebbe avere delle interessanti applicazioni sia nell'industria degli aromi che nell'industria lattiero-casearia in quanto tale sostanza, come il linalolo, il nerolo e il citronellolo, possiede una bassa soglia olfattiva.
Infine la possibilità da parte dei batteri lattici di produrre per biosintesi dei composti terpenici potrebbe influenzare gli studi di tracciabilità geografica di alcune produzioni lattiero-casearie di alpeggio. Queste infatti si basano sulla presenza di molecole terpeniche ritenute sinora provenienti esclusivamente dall'erba consumata dagli animali, ma che potrebbero essere prodotte anche dalla microflora autoctona valorizzando così la tipicità dei prodotti.

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

| Ceppo | 6 h | 24 h | 48 h |
|---|---|---|---|
| *L. lactis* ssp. *lactis* (1C7II) | <LOD | 2 | <LOQ |
| *S. macedonicus* (TA3.1) | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| *S. thermophilus* (10a7III) | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| *L. lactis* ssp. *cremoris* (1C7I) | <LOQ | <LOQ | <LOQ |
| *L. paracasei* (TO1.1) | <LOQ | 4,02 | 4,36 |

## BIBLIOGRAFIA

S. Gerrit, 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.

J. Bosset, B. Jeangros, T. Berger, U. Butikofer, M. Collomb, R. Gauch, P. Lavanchy, J. Scehovic, J. Troxler, E.R. Sieber (1999). Comparaison de fromages à pâte dure de type Gruyère produits en régions de montagne et de plaine. Rev. Suisse Agric., 31, 17-22.

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

G. Zeppa, M. Giordano, M. Bertolino, V. Gerbi (2005). 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. Chrom. A, 1071, 247-253.

T.O. Larsen (1998). Volatile flavour production by Penicillium caseifulvum. Int. Dairy J., 8, 883-887.

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

Ricevuto il 20 ottobre 2007