

# VALUTAZIONE DELLA PROTEOLISI E DELLA PRODUZIONE DI AMMINE BIOGENE IN MICROCASEIFICAZIONI MODELLO OTTENUTE CON CEPPI PRODUTTORI DI BATTERIOCINE

Jean Daniel COISSON<sup>1</sup>, Fabiano TRAVAGLIA<sup>1</sup>, Monica LOCATELLI<sup>1</sup>,  
Giuseppe ZEPPA<sup>2</sup>, Marta BERTOLINO<sup>2</sup>, Marco ARLORIO<sup>1</sup>

**RIASSUNTO** - Nove microcaseificazioni sono state realizzate secondo uno schema di produzione modificato su quello del Toma piemontese, con l'uso di ceppi lattici autoctoni scelti in base alla capacità di produrre batteriocine. Sui formaggi sono stati studiati i fenomeni proteolitici primari (con la valutazione dei pattern elettroforetici) e parzialmente quelli secondari (determinando alcuni amminoacidi liberi). Si sono evidenziate significative differenze nella proteolisi primaria dei formaggi prodotti con *L. plantarum* e *L. paracasei*, rispetto a quelli ottenuti con *Lactococcus* spp. Infine è stato valutato il contenuto in ammine biogene, riscontrando in un solo caso un valore superiore a 100 mg/kg. Da questo studio si è evidenziato come 4 ceppi presentino una ridotta attività decarbossilasica e interessanti proprietà per una loro applicazione in caseificazioni su larga scala.

Parole chiave: ammine biogene, proteolisi, microcaseificazioni

**SUMMARY** - Proteolysis evaluation and biogenic amines production in miniature cheeses obtained with bacteriocin producer strains - Nine different miniature cheeses were produced following the cheese-making process of Toma piemontese, using natural lactic strains, selected for their ability to produce bacteriocins. The primary proteolysis was evaluated by electrophoretic analysis and the secondary proteolysis determining some free amino acids. The principal differences evidenced in primary proteolysis are due to the action of *L. plantarum* and *L. paracasei*, respect to the pattern of *Lactococcus* spp. The biogenic amines content was also evaluated, showing the presence of histamine and tyramine, but only in one cheese reaching concentration >100 mg/kg. This study permits to identify 4 strains with a reduced decarboxylating activity and properties interesting for an application in large-scale cheesemaking processes.

Keywords: biogenic amines, proteolysis, miniature cheeses

---

\* Corrispondenza ed estratti: coisson@pharm.unipmn.it

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Chimiche, Alimentari, Farmaceutiche e Farmacologiche. Università degli Studi del Piemonte Orientale "A. Avogadro". Via Bovio 6, 28100 Novara.

<sup>2</sup> Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali. Università degli Studi di Torino. Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

## INTRODUZIONE

L'industria casearia predilige, in fase di caseificazione, l'addizione controllata di starter lattici che permettono di ottenere un formaggio con caratteristiche costanti nel tempo. L'uso di starter industriali, però, non sempre si adatta alle esigenze della produzione di formaggi tipici, anzi in alcuni disciplinari il loro uso non è consentito, preferendosi lo sviluppo di lattici "spontanei". La combinazione di queste diverse esigenze ha portato alla selezione e allo studio di ceppi "autoctoni", ascrivibili alla flora batterica "locale", in quanto isolati da produzioni che non fanno uso di starter industriali [1].

Un'interessante caratteristica da considerare nella selezione di batteri starter è la possibilità che producano batteriocine, in grado di limitare lo sviluppo di ceppi patogeni o alteranti [2].

Utilizzando quindi in produzione ceppi autoctoni, tipizzati e in grado di produrre batteriocine, sarebbe possibile apportare caratteristiche positive e di tipicità al prodotto sia da un punto di vista organolettico, sia per la sua sicurezza microbiologica.

Scopo di questo lavoro è stata la valutazione, preliminare all'applicazione in produzione casearia, di alcuni ceppi autoctoni, isolati da prodotti tipici della regione Piemonte e selezionati in base alla loro capacità di produrre batteriocine (con attività inibitoria nei confronti di *Listeria monocytogenes*).

## MATERIALI E METODI

a) Campioni analizzati - Sono state effettuate 9 diverse microcaseificazioni, utilizzando un singolo ceppo lattico e caseificate secondo la tecnologia di produzione del Toma piemontese, opportunamente modificata [3]. I ceppi valutati sono 4 *Lactobacillus plantarum* (A95, A96, B94 e B95), 1 *Lactobacillus paracasei* (C93), 1 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (IC71) e 3 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (IFIII, TC1, BF1).

b) Analisi di composizione - Sono state eseguite le determinazioni di pH, proteine

( $N_{tot} \times 6,38$ ) e indice di maturazione ( $N_{tot} \times 100/N_{tot}$ ), secondo metodiche standard [4].

c) Estrazione delle proteine e condizioni elettroforetiche - La frazione proteica è stata estratta in soluzione di *tris*-glicina 0,01 M pH 8,3 contenente urea 6 M (0,5 g di formaggio in 10 mL di soluzione). Il gel (SDS-PAGE) al 12% di poliaccrilammide (24:1 acrilammide: N,N'-metilenebisacrilammide) è stato colorato con Coomassie Brilliant Blue. L'analisi di immagine è stata condotta tramite FluorS Multimager e software Quantity One (Bio-Rad).

d) Determinazione di ammine biogene e amminoacidi precursori - tiramina, istamina, triptamina e 2-feniletilamina e i loro amminoacidi precursori sono stati determinati per cromatografia ion-pair [5] con sistema HPLC Shimadzu Class VP 10Av, dotato di controllo della temperatura (Column Oven CTO-10AS), sistema di rilevamento UV-VIS (SPD-10A) e colonna ODS 2 (4,6 ID, 250 mm lung., Waters).

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Per una valutazione dei ceppi, selezionati in produzione casearia, è stato studiato il loro effetto in un processo di microcaseificazione, in condizioni sterili, secondo un protocollo sperimentale ben descritto in letteratura [6]. I formaggi prodotti (del peso di circa 50 g) sono stati analizzati al termine di un periodo di 60 giorni di maturazione e ne sono stati determinati i parametri più significativi per una descrizione dei fenomeni proteolitici (Tab. 1), scelti in base a quanto evidenziato in un precedente lavoro sul Toma piemontese [7]. Per quanto riguarda il pH si sono ottenuti valori compresi tra 4,55 e 5,53; tra i parametri di proteolisi, il valore dell'indice di maturazione ha presentato dati molto variabili, compresi tra il 27,8 e il 91,9%. Indici di maturazione di tale entità sono nettamente superiori a quelli riscontrati in caseificazioni su scala industriale, che per il Toma piemontese sono riportati nell'ordine del 20-35% [7]. Tale differenza potrebbe essere imputabile, oltre che alla presenza e all'attività

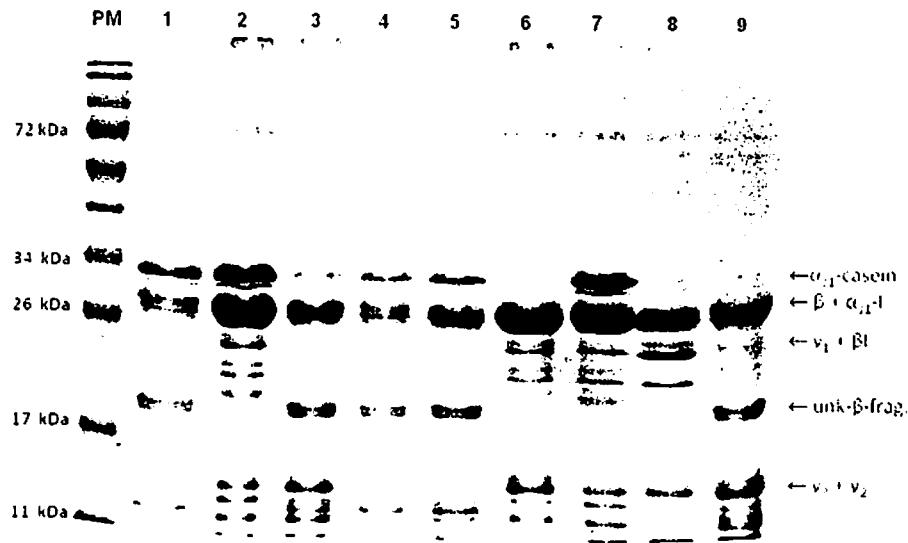
**Tabella 1 - Valori medi e deviazioni standard dei parametri relativi alle microcaseificazioni**  
**Table 1 - Mean values and standard deviations of proteolysis parameters obtained analysing the miniature cheeses**

Campioni Samples	pH	Proteine totali (g/100 g) Total proteins (g/100 g)	Azoto totale (g/100 g) Total nitrogen (g/100 g)	Azoto solubile (g/100 g) Soluble nitrogen (g/100 g)	Indice di maturazione (%) Ripening index (%)
A95	5,22	16,8±0,97	2,63±0,15	2,42±0,04	91,9±0,02
A96	5,41	15,7±0,38	2,46±0,06	1,30±0,07	52,7±0,03
B94	4,72	17,7±0,10	2,77±0,02	1,20±0,01	43,5±0,01
B95	4,75	17,3±0,62	2,71±0,10	1,50±0,04	55,3±0,02
C93	4,55	17,7±0,55	2,77±0,09	1,42±0,01	51,2±0,01
IC71	4,73	23,4±0,13	3,66±0,02	1,02±0,01	27,8±0,01
IFIII	5,53	18,4±0,24	2,88±0,04	1,40±0,01	48,5±0,01
IC1	4,93	21,2±1,19	3,33±0,19	0,99±0,01	29,7±0,01
BF1	5,47	20,8±0,08	3,26±0,01	2,25±0,09	69,0±0,03

propria dei ceppi, anche alle particolari condizioni di produzione e maturazione applicate. Il livello di proteolisi non è risultato però correlabile alla specie di lattico, né al pH misurato dopo stufatura o al termine della maturazione.

L'elettroforesi delle caseine ha permesso di evidenziare una netta incidenza dei ceppi sulla proteolisi primaria, correlabile ai 2 generi presi in considerazione, poiché sono stati riscontrati pattern elettroforetici specifici (Fig. 1). Sicuramente si nota una impor-

**Figura 1 - Separazione in elettroforesi SDS-PAGE delle proteine estratte dai campioni di formaggio.**  
**PM: pesi molecolari, 1: C93; 2: TC1, 3: B95; 4: A96; 5: B94; 6: BF1; 7: IC71; 8: IFIII; 9: A95**  
**Figure 1 - Electrophoretic patterns (SDS-PAGE) of proteins extracted from miniature cheeses. PM:**  
**molecular weights, 1: C93; 2: TC1, 3: B95; 4: A96; 5: B94; 6: BF1; 7: IC71; 8: IFIII; 9: A95**



tante idrolisi a carico della alfa- $\kappa$ -caseina per tutti i ceppi, mentre è minore l'impatto sulla beta-caseina. Si noti però la presenza di una banda a circa 18 kDa riscontrata solo nei formaggi caseificati con *L. plantarum* o *L. paracasei*. Tale banda, da analisi di conferma condotte in elettroforesi urea-PAGE e in elettroforesi 2D (urea-PAGE/SDS-PAGE), è risultata provenire dall'idrolisi della beta-caseina. Non si tratta però di un'idrolisi imputabile alle azioni note della plasmina (che determina la formazione delle gamma-caseine) o della chimosina (formazione di beta-I- e beta-II-caseine). Il frammento in questione può invece essere attribuito ad una idrolisi a valle dell'amminoacido 44 (Glu) della beta-caseina.

Per i pattern elettroforetici sono stati rilevati anche dati numerici (come percentuali relative all'interno di ogni singolo campione) che sono stati valutati statisticamente mediante PCA. La clusterizzazione che si è riscontrata tra i campioni ha correlato i pattern ottenuti con i differenti lattici utilizzati per la caseificazione (dato non mostrato), con una netta separazione sulla PC1 dei formaggi prodotti con un *Lactobacillus*, rispetto a quelli prodotti con un *Lactococcus*.

Dai dati ottenuti per gli amminoacidi liberi (per la valutazione della proteolisi secondaria) (Tab. 2) è stato invece possibile

evidenziare una correlazione tra indice di maturazione e valore di fenilalanina (un amminoacido meno soggetto a reazioni di decarbossilazione), a valori di concentrazione però inferiori rispetto a quelli di formaggi Toma piemontese riportati in letteratura [7].

Infine per una valutazione della sicurezza d'uso dei ceppi è stato determinato il contenuto in ammine biogene, da cui risulta che alcuni ceppi sono in grado di produrre ammine biogene. In particolare si sono riscontrate tiramina e istamina (Tab. 2), ma solo in un caso il totale supera i 100 mg/kg, valore spesso indicato in letteratura come limite di qualità, se non di sicurezza [8].

#### CONCLUSIONI

Con i dati ottenuti in questo studio si è individuato, tra i ceppi valutati, un diverso impatto sulla proteolisi, in particolare quella primaria, con presenza di bande caratteristiche, da confermare su scala produttiva.

Complessivamente quattro ceppi (2 *L. plantarum* -B94 e A95- e 2 *L. lactis* subsp. *lactis* -1FIII e TC1) presentano una ridotta attività decarbossilasica e interessanti proprietà tecnologiche da valutare in caseificazioni su scala reale, eventualmente anche in presenza di *L. monocytogenes* per confermare la loro azione protettiva.

Tabella 2 - Valori medi e deviazioni standard delle concentrazioni di amminoacidi liberi e ammine biogene dei campioni analizzati (Tr. = < LOQ; N.D. = <LOD)

Table 2 - Mean values and standard deviations of free amino acids and biogenic amines concentration in the samples analyzed (Tr. = < LOQ; N.D. = <LOD)

Campioni Samples	Tirosina (mg kg) Tyrosine (mg kg)	Istidina (mg kg) Histidine (mg kg)	Fenilalanina (mg kg) Phenylalanine (mg kg)	Triptofano (mg kg) Tryptophan (mg kg)	Tiramina (mg kg) Tyramine (mg kg)	Istamina (mg kg) Histamine (mg kg)
A95	125,5 ± 1,60	42,9 ± 1,42	279,8 ± 0,69	11,5 ± 0,12	9,1 ± 0,09	8,9 ± 0,83
A96	13,1 ± 0,08	16,6 ± 0,38	153,1 ± 4,98	50,0 ± 1,37	103,4 ± 2,08	18,9 ± 0,92
B94	Tr	14,5 ± 0,13	64,4 ± 0,33	50,9 ± 0,84	Tr	Tr
B95	20,8 ± 0,33	17,4 ± 1,21	196,8 ± 0,82	42,7 ± 1,35	41,7 ± 1,35	37,8 ± 2,44
C93	52,6 ± 0,41	17,6 ± 0,23	163,9 ± 1,82	28,6 ± 0,43	10,7 ± 1,61	36,5 ± 0,71
1C71	63,3 ± 0,13	27,6 ± 0,34	88,5 ± 1,57	23,3 ± 0,08	17,7 ± 0,60	47,8 ± 1,24
11 III	45,1 ± 0,15	13,1 ± 1,07	170,9 ± 0,16	4,5 ± 0,04	N.D.	N.D.
1C4	42,3 ± 0,15	13,2 ± 0,31	116,2 ± 0,75	18,6 ± 0,09	10,9 ± 0,65	18,4 ± 0,20
B11	14,1 ± 0,31	5,2 ± 0,31	161,9 ± 0,59	1,5 ± 0,08	73,4 ± 0,94	10,7 ± 1,89

*Ringraziamenti:*

Lavoro finanziato dalla Regione Piemonte  
(Bando CIPE 2004)

Poster presentato al 2° Congresso Lattiero-Caseario AlTeL-Regione Piemonte, Torino  
21-09-2010 "La ricerca scientifica e la valorizzazione del latte e dei derivati".

---

BIBLIOGRAFIA

- 1) Fortina MG, Ricci G, Acquati A, Zeppa G, Gandini A, Manachini PL (2003) Genetic characterization of some lactic acid bacteria occurring in an artisanal protected denomination origin (PDO) Italian cheese, the Toma piemontese. *Food Microbiol* 20 397-404
- 2) Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol* 71 1-20
- 3) Bertolino M, Zeppa G, Gerbi V, McSweeney PLH (2008) Study of proteolysis in miniature Toma Piemontese cheese made using wild bacteria. *Ital J Food Sci* 20 57-73
- 4) Herlich K (1990) Official Methods of Analysis. Ass. Off. Anal. Chem. Publ., Arlington, VA
- 5) Arlorio M, Coisson JD, Martelli A (1998) Ion pair HPLC determination of biogenic amines and precursor aminoacids. Application of a method based on simultaneous use of heptanesulphonate and octylamine to some foods. *Chromatographia* 48 763-769
- 6) Shakeel-Ur-Rehman, Fox PF, Mc Sweeney PLH, Madkor SA, Farkye NY (2001) Alternatives to pilot plant experiments in cheese-ripening studies. *Int J Dairy Technol* 54 121-126
- 7) Arlorio M, Coisson JD, Travaglia F, Capasso M, Rinaldi M, Martelli A (2003) Proteolysis and production of biogenic amines in Toma piemontese PDO cheese during ripening. *Ital J Food Sci* 15 395-404
- 8) Stratton SS, Hutkins RW, Taylor SL (1991) Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *J Food Prot* 54 460-470