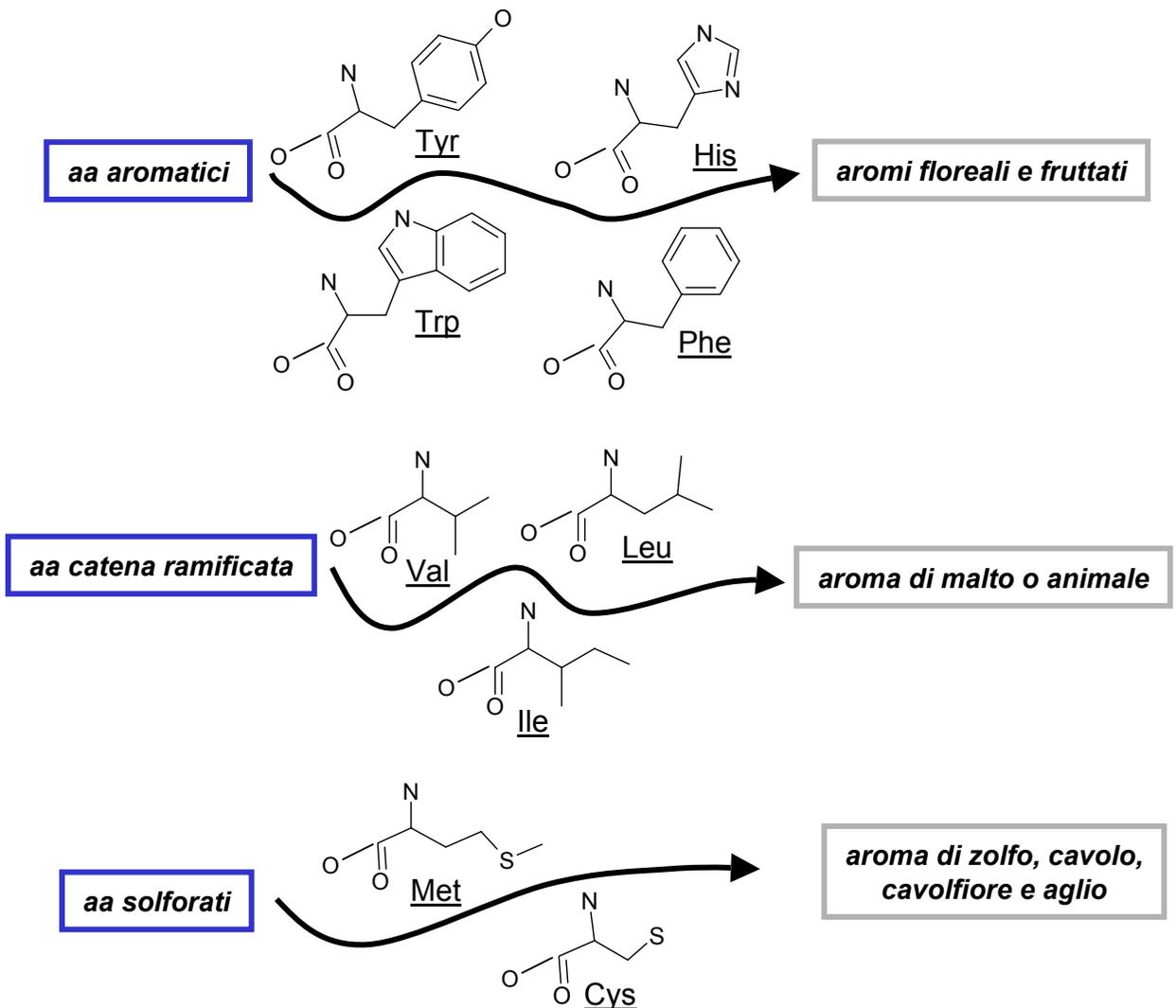
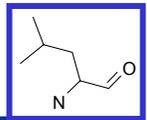


Metabolismo microbico e produzione di aromi

La formazione di aromi nei prodotti alimentari fermentati è la risultante di un complesso processo metabolico che coinvolge la **glicolisi**, la **lipolisi** e la **proteolisi**. Si suppone che la proteolisi rappresenti lo step limitante nel processo di maturazione di diversi formaggi tuttavia l'aggiunta di amminoacidi liberi e/o l'incremento delle attività peptidolitiche non porta sempre a migliori e più veloci processi di maturazione. Di conseguenza si ipotizza che il passaggio chiave sia rappresentato dai processi catabolici degli amminoacidi. Le molecole che compongono l'aroma nei prodotti fermentati sono principalmente aldeidi, alcoli, acidi organici e composti solforati.



La scoperta delle relazioni esistenti tra alcune attività enzimatiche batteriche e la sintesi delle specie molecolari responsabili di particolari aromi consente: i) la selezione di ceppi batterici adatti a migliorare le caratteristiche organolettiche del prodotto fermentato; ii) di accelerare, ove esiste, il processo finale di maturazione (formaggi).



Major odorants of Cheddar, Camembert and Emmenthal cheeses. Compounds are listed in the order of their importance in odour and compounds resulting from amino acid degradation appear in bold characters

Cheddar cheese ^a	Camembert cheese ^b	Emmenthal cheese ^c
Butyric acid	Butyric acid	Propionic acid
Ethyl butyrate	Isovaleric acid	Methional
3-Methylbutanal	3-Methylbutanal	Furaneol ^d
Propionic acid	Methional	Homofuraneol ^e
Ethyl caproate	2,3-Butanedione	Diacetyl
Isovaleric acid	1-Octen-3-ol	3-Methylbutanal
Acetic acid	1-Octen-3-one	Ethyl butyrate
Methional	Phenethyl acetate	
1-Octen-3-one	2-Undecanone	
Methanethiol	γ -Decalactone	
DMDS	Methanethiol	
DMTS	DMTS	
Diacetyl	DMS	
Furaneol/homofuraneol	Phenylacetaldehyde	

Methional (Met):

boiled potato-like aroma

DMDS e DMTS:

desiderable garlic note

3-methylbutanal (Leu):

green malty odour (aroma pungente che diventa gradevole in quantità maggiori di 200 ppm)

Isovaleric acid (Leu):

rancid, cheesy, sweaty and putrid odour (Camembert, Emmenthal)

Name and chemical nature of the major aroma compounds derived from branched-chain and aromatic amino acids and methionine

Amino acids	Aldehydes	Alcohols	Carboxylic acids	Thiol/divers
Leucine	3-Methylbutanal or isovaleraldehyde	3-Methylbutanol	3-Methylbutanoic acid or isovaleric acid	
Isoleucine	2-Methylbutanal	2-Methylbutanol	2-Methylbutanoic acid	
Valine	2-Methylpropanal or isobutyraldehyde	2-Methylpropanol	2-Methylpropanoic acid or isobutyric acid	
Phenylalanine	Phenylacetaldehyde, benzaldehyde (-2C)	Phenylethanol	Phenylacetic acid	
Tyrosine	OH-Phenylacetaldehyde, OH-benzaldehyde (-2C)	OH-Phenylethanol	OH-Phenylacetic acid	<i>p</i> -Cresol, phenol
Tryptophane	Indol-3-acetaldehyde, indol-3-aldehyde	Tryptophol	Indol-3-acetic acid	Skatole, indole
Methionine	3-Methylthiopropional, or methional	3-Methylthiopropional	3-Methylthiopropionic acid	Methanethiol

Acido butirrico (lipolisi):

cheesy, sweaty and sour odour (Cheddar)

Acido isobutirrico (Val):

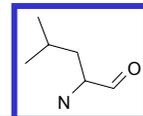
cheesy, sweaty and sour odour (Cheddar)

Fenil acetaleide, 2-fenil etanolo (Phe):

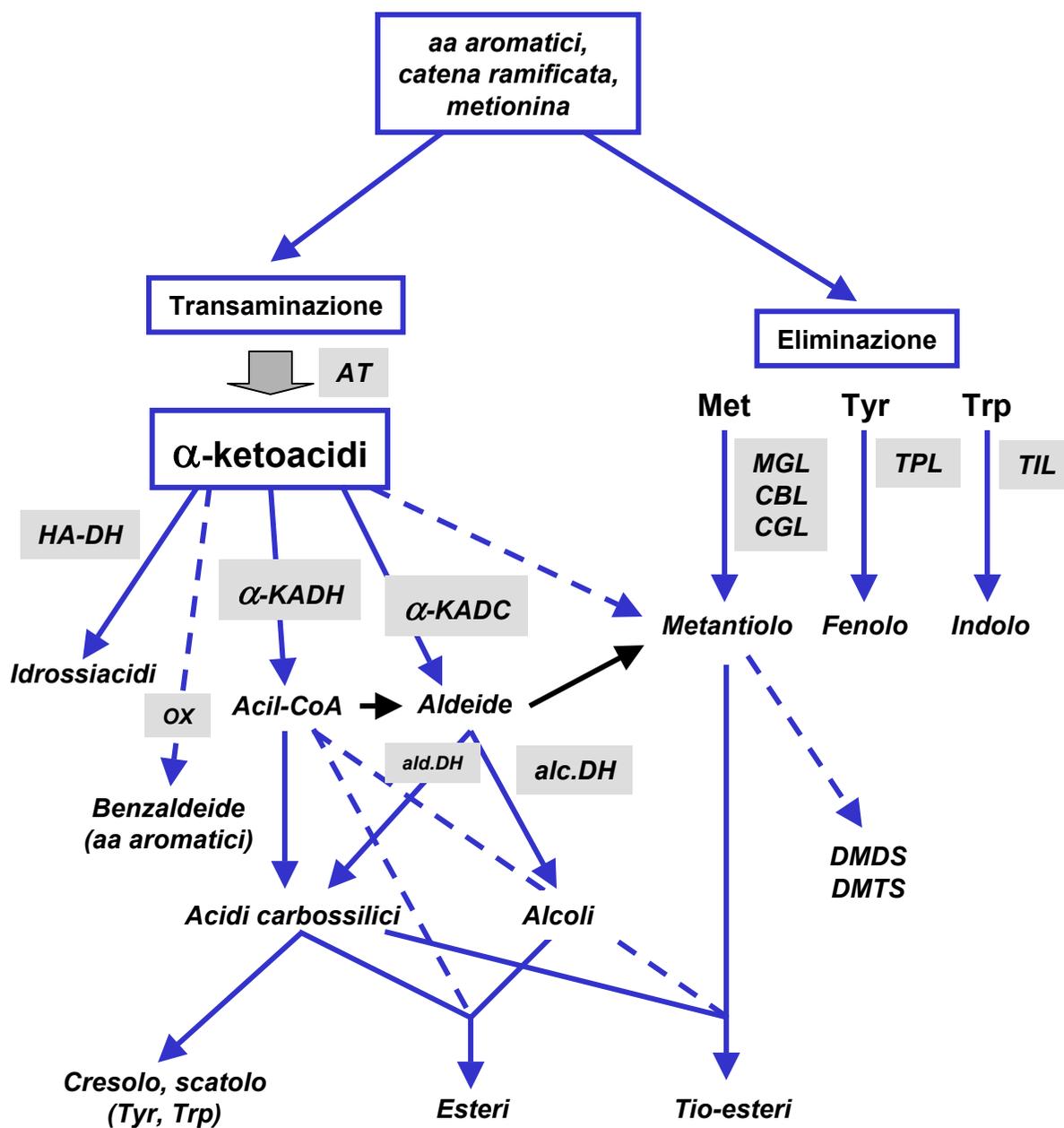
floral rose-like aroma (Camembert)

p-cresolo, scatolo, indolo (Trp):

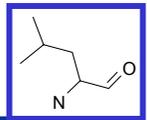
rose-like aroma (Cheddar)



Le reazioni enzimatiche direttamente o indirettamente coinvolte nella produzione di specie molecolari aromatiche sono le seguenti:



DMDS: dimetilsulfide; **DMTS:** dimetiltrisulfide; **AT:** amminotransferase; **HA-DH:** idrossiacido deidrogenasi; **α-KADH:** α-ketoacido deidrogenasi; **α-KADC:** α-ketoacido decarbossilasi; **alc. DH:** alcool deidrogenasi; **ald. DH:** aldeide deidrogenasi; **MGL:** metionina γ-liasi; **CGL:** cistationina γ-liasi; **CBI:** cistationina β-liasi; **TPL:** tirosina-phenol liasi; **TIL:** triptofano-indol liasi; **OX:** ossidazione.



Le **aminotransferasi** caratterizzate presenti in batteri di interesse caseario sono le seguenti:

L-aromatico aminotransferasi (AraT)

*Phe, Trp, Asp, Tyr per AraT
di Brevibacterium linens 47*

*Leu, Tyr, Phe, Trp, Met per AraT
di Lactococcus lactis subsp. cremoris NCDO763*

L-aspartato aminotransferasi (AspAT)

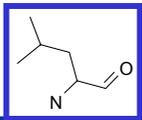
*Asp, Phe, Trp, Tyr per AspAT
di Brevibacterium linens 47*

L-branched-chain amino acid aminotransferasi (BcaT)

*Ile, Leu, Val, Met per BcaT
di Lactococcus lactis subsp. cremoris NCDO763*

La presenza di **aminotransferasi** è stata inoltre evidenziata in via preliminare anche in *Lactobacillus paracasei*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *S. thermophilus*, *L. helveticus*, *L. delbrueckii*.

Una volta ottenuto per transaminazione l' α -chetoacido questo può subire un'ulteriore degradazione a dare aldeidi e alcoli. Alcuni ceppi di *L. lactis* producono ad esempio una grande quantità di aldeidi a partire dagli aa a catena ramificata e per questa loro caratteristica vengono definiti "**maltigeni**" poiché le aldeidi generate hanno un caratteristico aroma di malto. In altri casi, gli α -chetoacidi che derivano da Met e Phe subiscono ossidazioni chimiche catalizzate da ioni bivalenti a dare metiltioacetaldeide e benzaldeide. Le aldeidi e gli acidi che si ottengono dalla degradazione della Met sono piuttosto instabili e possono andare incontro a degradazione spontanea generando metantiolo e DMDS.

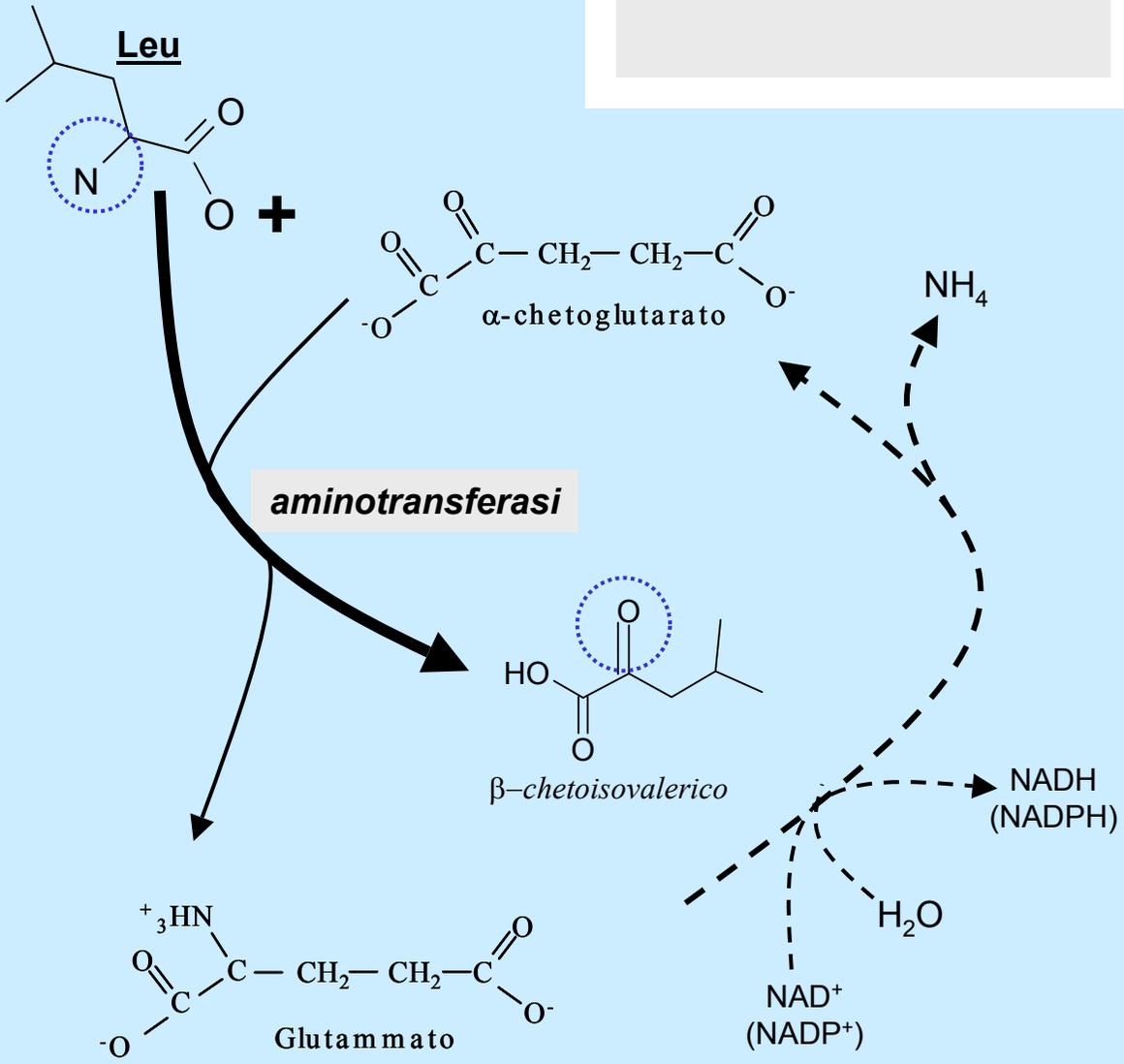


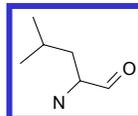
**aa aromatici,
catena ramificata,
metionina**

Transaminazione

Eliminazione

Questo pathway di degradazione è più utilizzato da Lieviti, micrococchi, e *Brevibacterium* che dai batteri lattici.





Composti solforati

Table 1. Detection thresholds and properties of some sulfur compounds found in cheese

Compound	Detection threshold (ppb)	Medium	Flavor/aroma description	Probable precursor
Hydrogen sulfide	0.18 ^a	air	rotten eggs	cysteine
Carbonyl sulfide				cysteine
Methanethiol	2 ^{a,b}	water	cooked cabbage	methionine
Methional	21 ^b	skim milk	boiled potato	methionine
Dimethyl sulfide	20 ^a	milk	cabbage	
Dimethyl disulfide	20 ^b	skim milk	cauliflower,	methanethiol
	1.2 ^a	water	garlic, very ripe cheese	
Dimethyl trisulfide	0.01	water		methanethiol
				methanethiol and formaldehyde
S-methyl thioacetate	5 ^a	liquid cheese	cooking cauliflower	methanethiol and acetic acid
S-methyl thiopropionate	100 ^a	liquid cheese	cheesy	methanethiol and propionic acid
S-methyl thiobutyrate	100 ^a	liquid cheese	chives	methanethiol and butyric acid

Detection by ^aodor or ^btaste.

I composti solforati aromatici sono principalmente originati dalla degradazione della Met.

Metantiolo

CH₃ - SH

Dimetilsulfide

CH₃ - S - CH₃

Dimetildisulfide

CH₃ - S - S - CH₃

Dimetiltrisulfide

CH₃ - S - S - S - CH₃

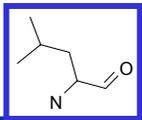
Metional

CH₃ - S - CH₂ - CH₂ - CHO

S-Metiltioesteri

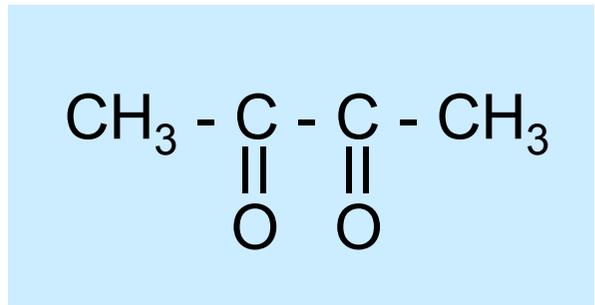
CH₃ - S - CO - R
MTA (metiltioacetato),
metiltiopropionato (tipico
odore di formaggio,
il suo utilizzo è brevettato)

La disponibilità di Cys e Met nei prodotti caseari è piuttosto limitata (4 Cys, 16 Met in caseine e poche altre nelle sieroproteine) ed è subordinata al livello di attività proteasica dei batteri coinvolti nel processo fermentativo.

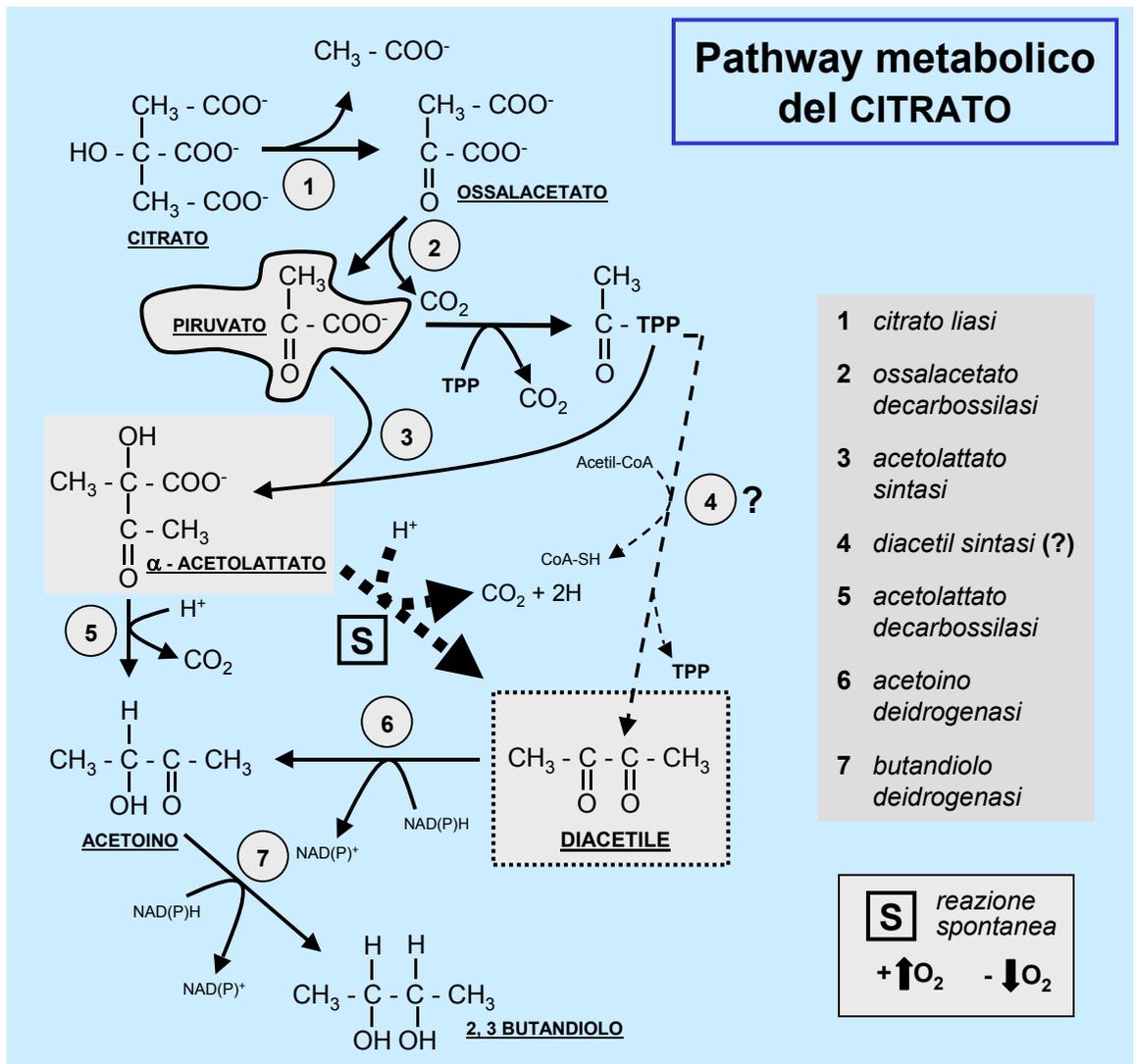


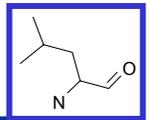
Diacetile

Il **diacetile** rappresenta un prodotto secondario del metabolismo dell'acido citrico ed è uno dei componenti aromatici principali di molti prodotti caseari principalmente burro e creme, ma anche formaggi di tipo Cheddar.



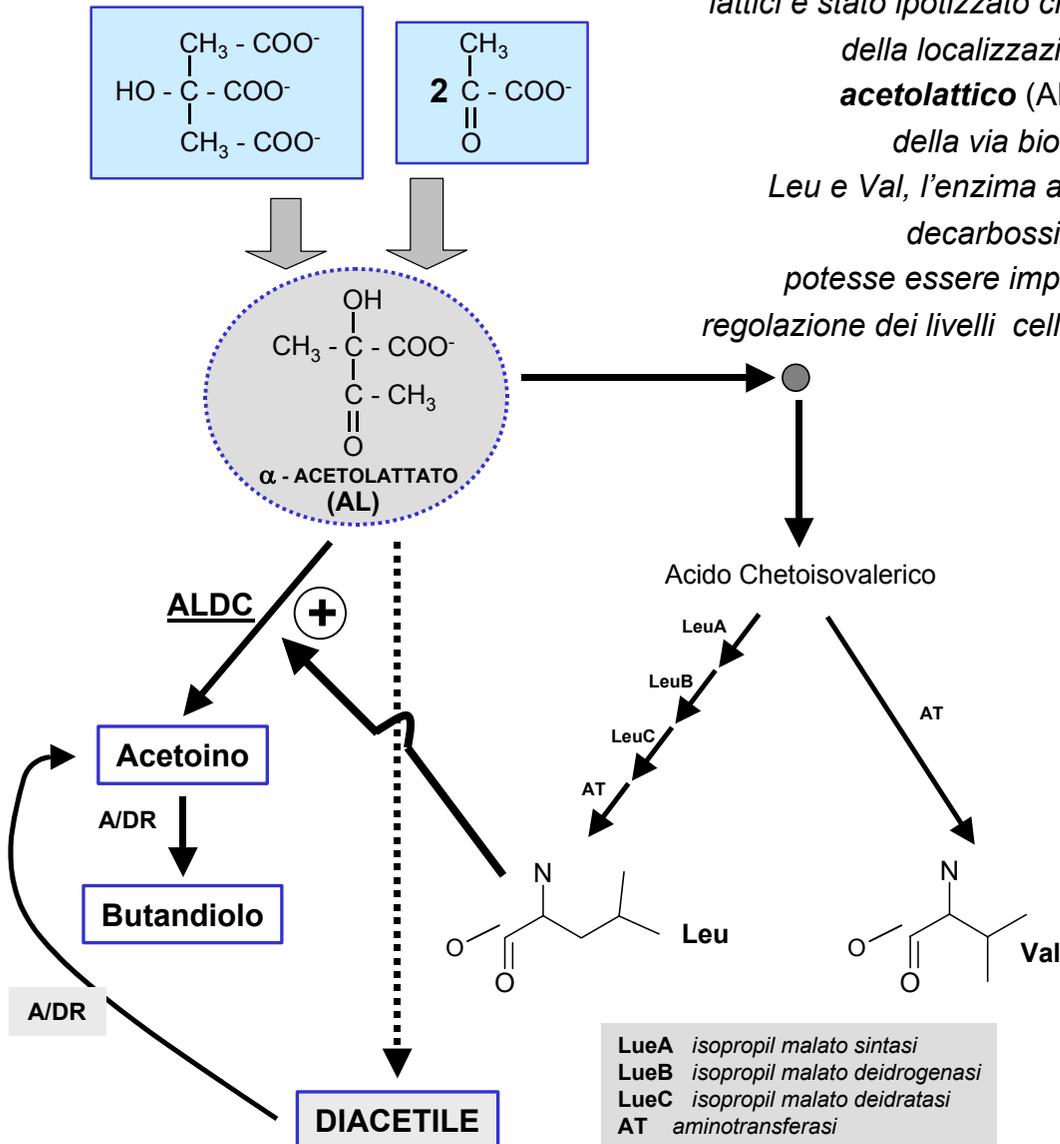
Lactococcus e *Leuconostoc* sono i principali generi batterici le cui specie sono caratterizzate da buone produzioni di **diacetile**. Questa molecola, prodotta anche da specie appartenenti al genere *Streptococcus* e *Oenococcus* può in alcuni casi rappresentare una caratteristica negativa alterando le caratteristiche organolettiche del prodotto di fermentazione come può ad esempio avvenire nel processo di vinificazione.



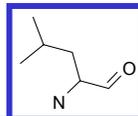


Nel processo di biosintesi di acetoino l'acido α -acetolattico rappresenta il precursore metabolico immediatamente precedente. Questa molecola è anche un importante intermedio metabolico della via biosintetica di alcuni aa a catena ramificata, **Leu** e **Val**.

In *Lactococcus lactis* e in altri batteri lattici è stato ipotizzato che a causa della localizzazione dell' α -acetolattico (AL) a monte della via biosintetica di Leu e Val, l'enzima acetolattato decarbossilasi ALDC, potesse essere implicato nella regolazione dei livelli cellulari di AL.

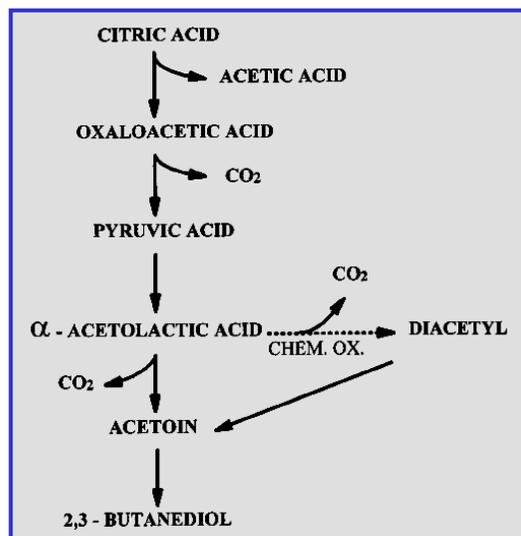


In particolare è stato osservato che **ALDC** possedeva proprietà allosteriche essendo attivato dalla presenza di **Leu** e **Val**. Questa caratteristica supportava l'ipotesi che **ALDC** potesse regolare il flusso di **AL** verso il catabolismo o l'anabolismo. A sostegno di questa ipotesi si osservava che ceppi prototrofi per gli aa a catena ramificata **NON** erano in grado di crescere in presenza di alte concentrazioni di **Leu** nel terreno di coltura a meno che fosse presente **Val**.



Il diacetile e le caratteristiche organolettiche del vino.

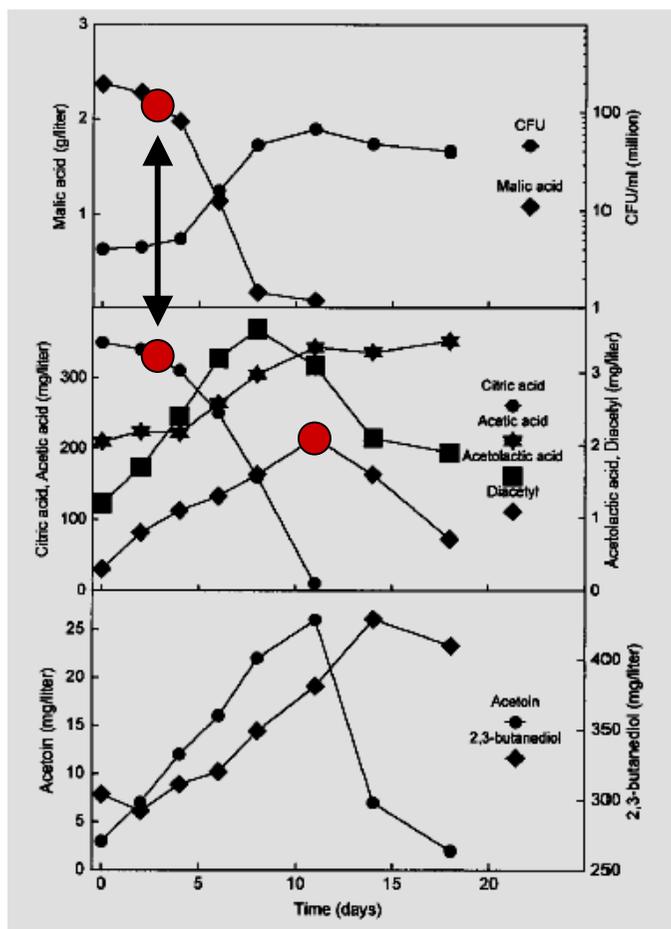
(Nielsen and Richelieu. 1999. Appl. Environ. Microbiol. 65:740-745)



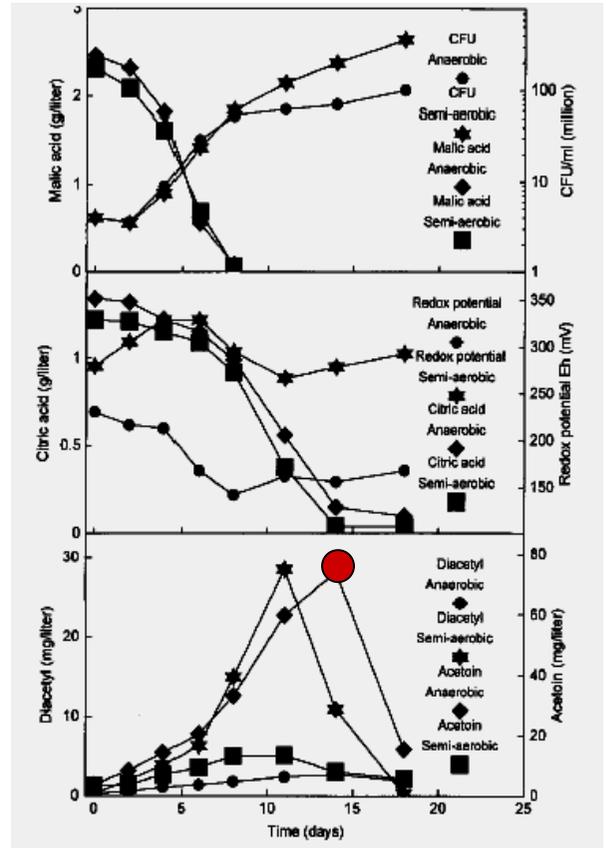
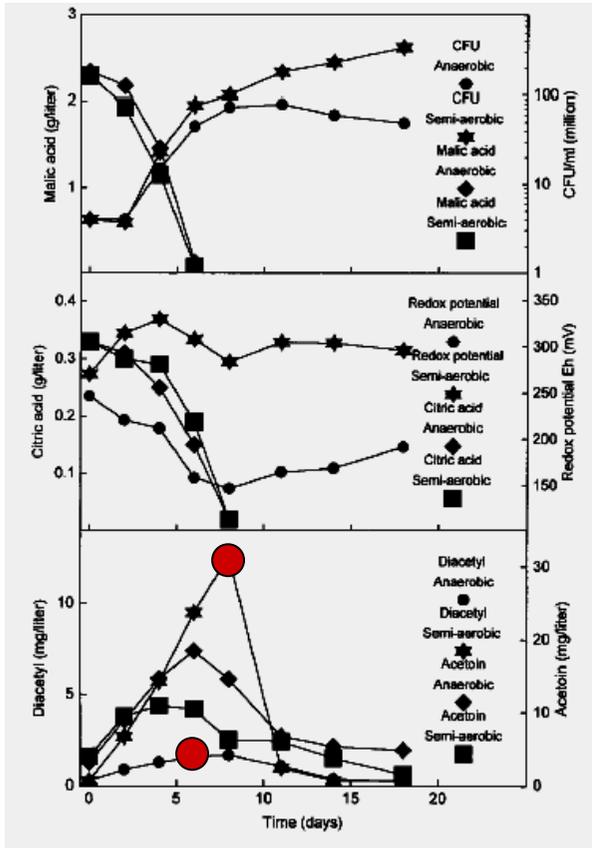
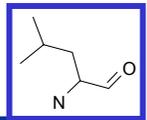
La fermentazione malolattica (MLF) si instaura generalmente alla termine della fermentazione alcolica per opera di *Oenococcus oeni* che converte l'acido malico (dicarbossilico) in acido lattico (monocarbossilico) riducendo il tenore di acidità del vino. Lo sviluppo di *Oenococcus* e quindi la MLF influenza anche le caratteristiche aromatiche finale del prodotto modificando gli aromi che derivano dall'acino d'uva e producendone di nuovi.

In specifico, *Oenococcus* metabolizza sia l'acido malico del vino che l'acido citrico determinando la formazione di **acetoino** e **diacetile**, uno degli aromi più importanti prodotti durante la MLF.

Il **diacetile** quando è presente nel vino a livelli superiori alla soglia sensoriale di rilevabilità conferisce un aroma di burro o di noce. La soglia sensoriale è differente a seconda delle tipologie di vino e varia tra i 0.2 mg/l per gli Chardonnay a 0.9 mg/l per il Pinot nero fino a 2.8 mg/l per i Cabernet Sauvignon.



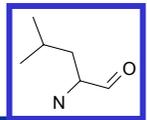
Andamento della MLF in un vino Chardonnay inoculato con uno starter di *Oenococcus oeni*



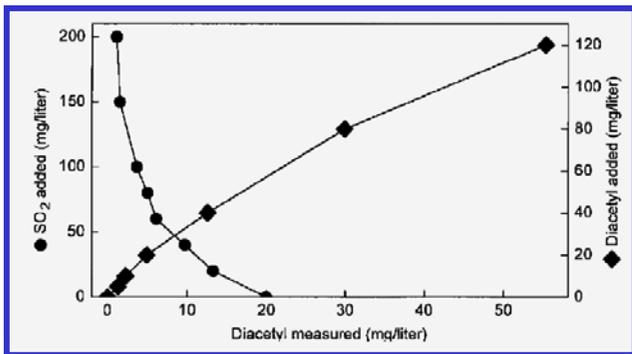
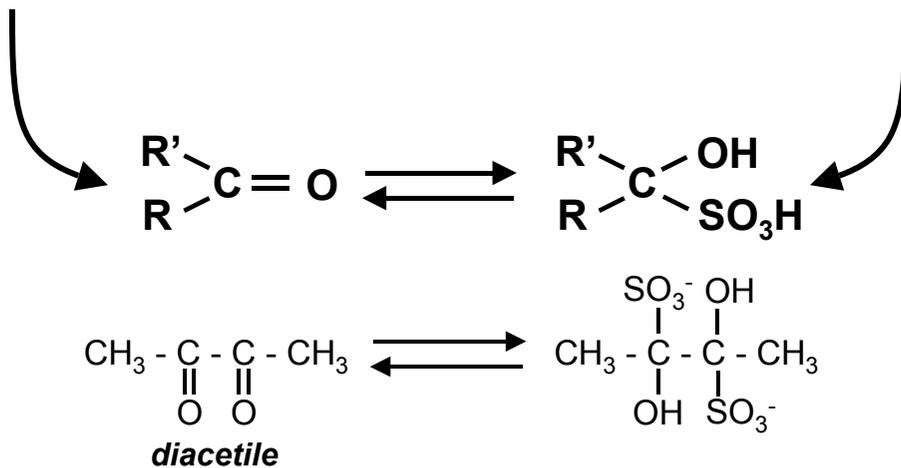
+ 1 g/l
di acido citrico

**Confronto tra
l'andamento
della MLF
in un vino
Chardonnay
in condizioni anaerobiche
e semiaerobiche
inoculato
con uno starter di
*Oenococcus oeni***

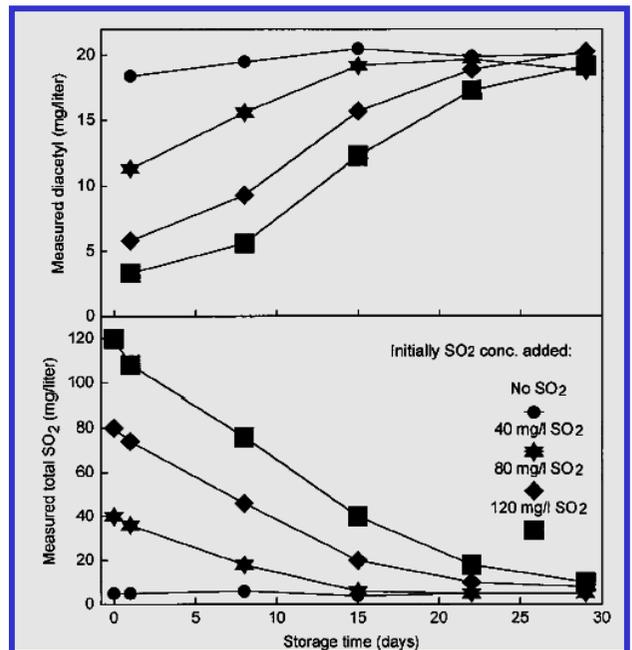
Le principali variazioni tra la MLF condotta in condizioni anaerobiche e semiaerobiche risiedono nella ridotta formazione di diacetile in condizioni di bassa concentrazione di ossigeno disciolto. L'aggiunta di acido citrico sembra invece influenzare principalmente solo i livelli di acetoino (da 20 a 75 mg/l in condizioni anaerobiche).

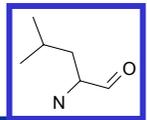


La concentrazione finale di diacetile di un vino è sicuramente influenzata dall'attività batterica ma un'importante contributo, soprattutto nei vini bianchi, è dato anche dalla concentrazione di SO₂. La fonte principale di SO₂ di un vino sono rappresentate: i) dall'aggiunta del mosto d'uva prima della fermentazione, ii) i lieviti vinari (producono quantità modeste di SO₂), iii) la solfitazione effettuata per bloccare la MLF. Quest'ultima aggiunta di SO₂ (quantitativamente la maggiore delle fonti di questo gas) blocca completamente ogni attività microbica ed è in grado di reagire con differenti composti del vino inclusi i composti carbonilici come il diacetile. Nel vino l' SO₂ esiste preferenzialmente come bisulfito.



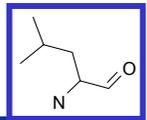
Mentre la **riduzione enzimatica del diacetile a acetoino e infine a 2, 3 butandiolo è irreversibile**, la **reazione del bisulfito con il diacetile è reversibile**.





In conclusione si può affermare che:

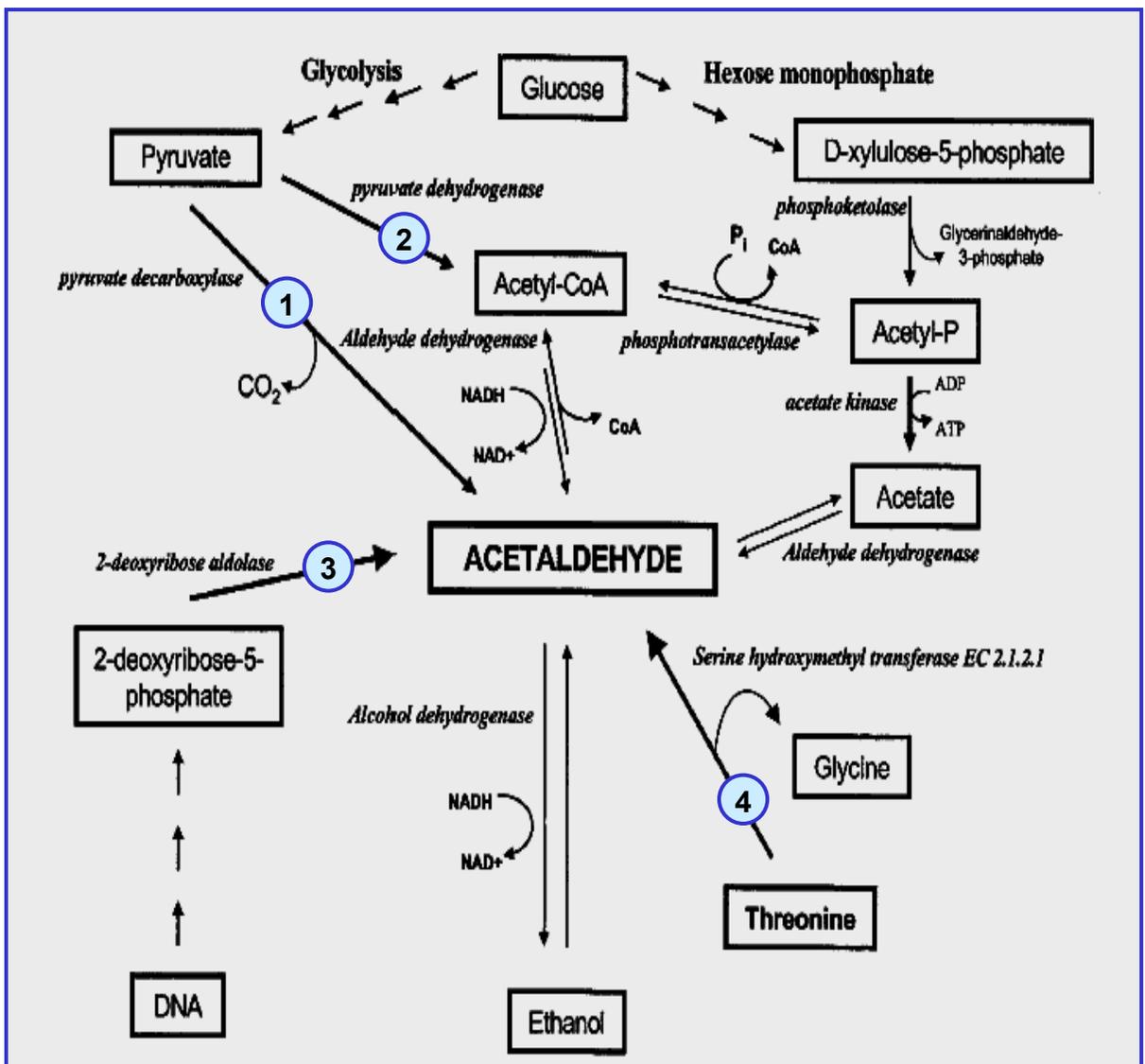
- ***L'acido malico inibisce il sistema di trasporto dell'acido citrico***
- ***La solfitazione può determinare una incompleta degradazione dell'acido citrico***
- ***La massima concentrazione di diacetile nel vino si ha al termine della fermentazione malolattica dopo di che si instaura una degradazione microbica della molecola a dare 2,3-butandiolo***
- ***La solfitazione può ridurre drasticamente la concentrazione di diacetile nel vino, tuttavia questa reazione è reversibile. Questo può rappresentare un problema quando il vino viene conservato in cisterne e solo successivamente sottoposto a imbottigliamento***

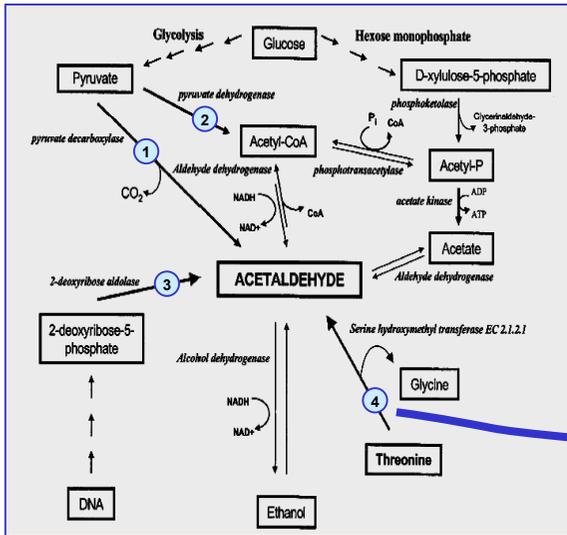
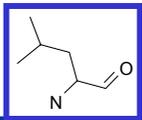


L'ACETALDEIDE è l'aroma dello yogurt.

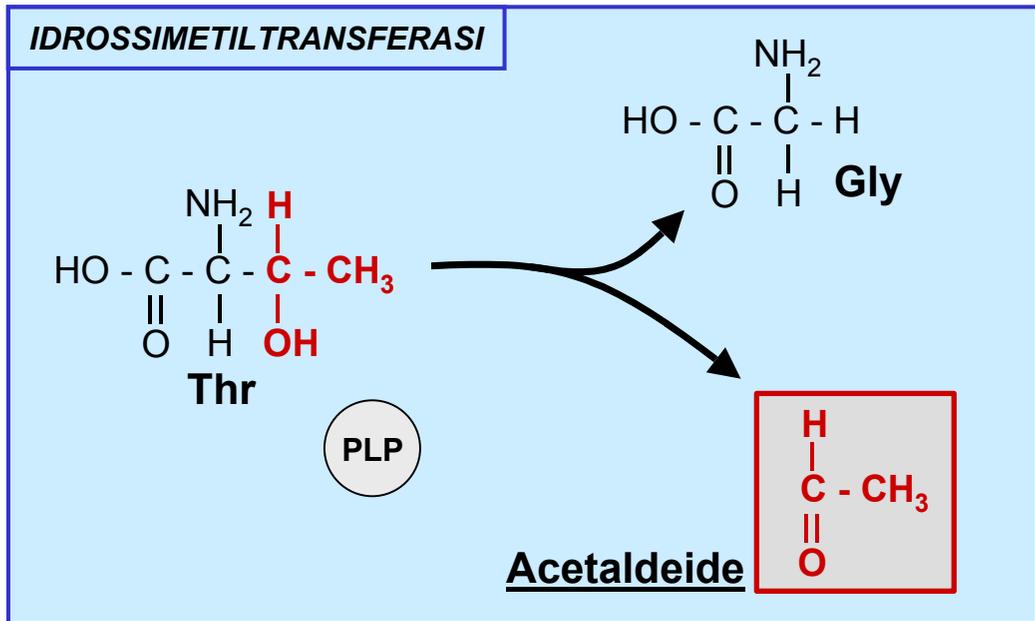
(Chaves et al., 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68: 5656-5662)

Il ruolo di *Streptococcus thermophilus* nella preparazione dello yogurt si può riassumere in: i) acidificazione attraverso la conversione del lattosio in acido lattico; ii) sviluppo di una idonea texture del coagulo a seguito della produzione di esopolisaccaridi; iii) sviluppo di aromi tipici. L'aroma tipico dello yogurt è originato principalmente dall'acido lattico che conferisce un tipico sapore di "fresco" e da una miscela di composti carbonilici come acetone, diacetile e **acetaldeide**. Quest'ultimo è considerato il componente principale dell'aroma di yogurt.





L'enzima coinvolto nella conversione della **treonina** a **acetaldeide** e **glicina** appartiene alla classe delle **idrossimetiltransferasi**. Questo enzima è presente in tutti gli organismi in quanto responsabile del turnover dell'acido folico (sintesi aminoacidi, trasporto di unità monocarbossio).



PLP piridossalfato