

ATTIVITÀ ESTERASICA DI ENTEROCOCCHI ISOLATI DA FORMAGGI PECORINI TRADIZIONALI

ESTERASIC ACTIVITY OF ENTEROCOCCHI ISOLATED FROM TRADITIONAL EWE'S MILK CHEESES

FRANCESCA PEDONESE ⁽¹⁾, ELENA INNOCENTI ⁽²⁾, ROBERTA NUVOLONI ⁽¹⁾,
CARLO D'ASCENZI ⁽¹⁾, SALVO RINDI ⁽¹⁾, DOMENICO CERRI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Gli enterococchi sono microrganismi lattici ampiamente diffusi nell'ambiente in virtù delle loro caratteristiche di resistenza ed adattabilità. Essi possono essere isolati da una vasta gamma di alimenti e fanno parte delle microflora autoctone di svariati formaggi, specialmente di tipo tradizionale, partecipando attivamente con le loro attività metaboliche al raggiungimento delle caratteristiche organolettiche finali dei singoli prodotti. In questo lavoro sono stati presi in esame 41 ceppi di enterococchi (28 *Enterococcus faecalis* e 13 *Enterococcus faecium*) precedentemente isolati da formaggi pecorini tradizionali toscani prodotti artigianalmente con latte crudo. Sono stati allestiti gli estratti acellulari dei singoli microrganismi e su questi è stata effettuata la valutazione dell'attività esterasica tramite metodica spettrofotometrica con lettura a 410 nm, utilizzando 4-nitrofenilbutirato come substrato. Sui singoli estratti è stata inoltre determinata la concentrazione proteica con un kit commerciale, utilizzando sieroalbumina bovina come standard. Sulla base dei risultati ottenuti i ceppi di *E. faecium* sono risultati generalmente più esterolitici dei ceppi di *E. faecalis*. In conclusione lo studio ha permesso di individuare, tra quelli saggiati, i microrganismi maggiormente dotati dell'attività enzimatica in esame, che deve essere considerata tra i parametri interessanti nella scelta di ceppi batterici da utilizzare come componente aggiuntiva di starter autoctoni per la tipologia di formaggi considerata.

Parole chiave: enterococchi, attività esterasica, formaggi tradizionali, latte crudo.

SUMMARY

Enterococci are widespread lactic micro-organisms, in consequence of their resistance and adaptability to different substrates and growth conditions. They can occur also in various foods and particularly in several cheeses, especially of traditional type, as autochthonous microfloras. In such products their presence is often related to the typical organoleptic characteristics, because of their metabolic properties. Particularly, their proteolytic, lipolytic and esterase activities can play an important role in flavour and texture formation. In this study 41 enterococcal strains (28 *Enterococcus faecalis* and 13 *Enterococcus faecium*) isolated in a previous research from traditional ewe's raw milk cheeses were analysed for their esterase activity by

⁽¹⁾ Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

⁽²⁾ Titolare di Assegno di Ricerca, Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

Il lavoro spetta in parti uguali agli Autori.

a spectrophotometric technique. The detection of esterase activity of the strains was executed on cell-free extracts of the strains, utilizing the substrate 4-nitrophenyl-butyrate. The esterase activity was finally determined spectrophotometrically at 410 nm. Moreover the protein concentration of the cell-free extracts was determined by a commercial kit, using bovine serum albumin as a standard. On the basis of our results, *E. faecium* strains generally resulted more esterolytic than *E. faecalis* strains. Finally, in this study the most interesting strains with regard to their esterolytic capability were determined, in order to select and utilize them as adjunct components in autochthonous starters.

Key words: enterococchi, esterase activity, traditional cheeses, raw milk.

INTRODUZIONE

Gli enterococchi sono microrganismi ubiquitari, dotati di caratteristiche di notevole resistenza ambientale, che si ritrovano in molti alimenti, specialmente di origine animale. In particolare enterococchi appartenenti alle specie *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus durans* sono stati isolati da molte produzioni casearie, sia a latte crudo che pastorizzato ed inoltre sono stati utilizzati come componenti di colture starter nella produzione di diverse tipologie di formaggi, specialmente tradizionali, in relazione alla loro capacità di partecipare, con le sostanze prodotte nel corso del loro metabolismo, alla determinazione del gusto e della struttura tipici di ogni formaggio (Andrighetto e coll., 2001). A questo proposito risultano fondamentali specialmente l'attività proteolitica e lipolitica, la presenza di esterasi, la capacità di produrre sostanze volatili (Lombardi, 2001). Riguardo in particolare alle attività esterasiche, queste sono in grado di attaccare le componenti lipidiche, giocando un ruolo importante nella formazione del *flavour* (Tsakalidou e coll., 1993).

Generalmente nei batteri lattici comunque l'attività esterasica è meno pronunciata dell'attività proteolitica ed è stata studiata diffusamente soprattutto nei lattobacilli (El Soda e coll., 1986; Gobbetti e coll., 1996; Williams & Banks, 1997; Choi e coll., 2004), ma anche in cocchi lattici (Vaughan e coll., 1994; Georgalaki e coll., 2000) ed in particolare in enterococchi (Sarantinopoulos e coll., 2001; El Din e coll., 2002; Katz e coll., 2002), oltre che in altri microrganismi non lattici di interesse caseario, come *Brevibacterium spp.* (Williams e coll., 2004) e micrococchi (Fernandez e coll., 2004).

Scopo del presente lavoro è la valutazione di tale attività enzimatica in ceppi di enterococchi provenienti da formaggi pecorini tradizionali prodotti in Toscana, che sono risultati caratterizzati dalla presenza di microflora lattiche tipicamente mesofile, costituite fondamentalmente da lattococchi, lattobacilli mesofili ed enterococchi (Pedonese e coll., 2002), in considerazione del fatto che il ciclo tecnologico di queste produzioni potrebbe avvalersi vantaggiosamente di starter lattici allestiti con batteri di provenienza locale dotati di attività metaboliche appropriate.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 41 ceppi di enterococchi (28 *E. faecalis* e 13 *E. faecium*),

conservati in collezione a -80°C presso il Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti di Pisa, precedentemente isolati da formaggi pecorini toscani prodotti artigianalmente a latte crudo senza aggiunta di starter commerciali, ed identificati secondo quanto indicato nell'indagine eseguita da Pedonese e coll. (2002). Per ciascun ceppo, opportunamente rivitalizzato, è stata effettuata la valutazione dell'attività esterasica su estratto acellulare mediante metodo spettrofotometrico (Georgalaki e coll., 2000). Allo scopo sono state allestite brodocolture di 24 ore in brodo MRS (Oxoid, England), con inoculo dell'1%. Le cellule batteriche sono state raccolte per centrifugazione (11.000 rpm per 10 minuti a 4°C), con successiva rimozione del surnatante, lavaggio in soluzione fisiologica sterile e risospensione delle cellule in tampone fosfato 50mM a pH 7, contenente 2 mg/ml di lisozima (Sigma, USA). È seguito un periodo di incubazione a 37°C per 2 ore, dopodiché è stato effettuato un nuovo ciclo di centrifugazione (13.000 rpm per 5 minuti a 4°C).

Il surnatante risultante, corrispondente all'estratto acellulare, è stato infine utilizzato per la determinazione dell'attività esterasica sul substrato 4-nitrofenilbutirrato (Sigma), previamente solubilizzato in metanolo alla concentrazione 20mM: 250 µl di estratto acellulare sono stati uniti ad una pari quantità di 4-nitrofenilbutirrato in 2 ml di tampone fosfato e posti ad incubare per 60 minuti a 30°C prima di effettuare la lettura spettrofotometrica a 410 nm (Spettrofotometro CGA CP2300) contro bianco. Per tutte le determinazioni sono state compiute due ripetizioni. Per ogni estratto acellulare saggiato è stata inoltre effettuata la determinazione del contenuto proteico con un kit commerciale (Protein Assay, BioRad, Germany), seguendo le indicazioni del produttore ed effettuando una lettura spettrofotometrica a 595 nm contro bianco, utilizzando sieralbumina bovina (BioRad) come standard.

RISULTATI

I risultati dell'attività esterasica sono mostrati in dettaglio nelle Tabelle I e II, rispettivamente per *E. faecalis* e *E. faecium*: i valori esprimono le densità ottiche riscontrate per i singoli campioni, sia in termini assoluti che per mg di proteina estratta dai singoli ceppi batterici.

Dall'osservazione dei dati ottenuti si evince che i 41 ceppi di enterococchi in esame hanno mostrato un'attività esterasica diversificata. I ceppi di *E. faecium* hanno espresso mediamente valori superiori a quelli di *E. faecalis*.

DISCUSSIONE

Sulla base del nostro studio è stata riscontrata, almeno limitatamente alla metodologia applicata ed al substrato utilizzato, una maggiore attività esterasica dei ceppi di *E. faecium* rispetto a quelli di *E. faecalis*, peraltro analogamente a quanto rilevato da Sarantinopoulos e coll. (2001). I ceppi che hanno presentato le attività

Tab. I. Attività esterasica dei ceppi di <i>Enterococcus faecalis</i> . <i>Esterasic activity of Enterococcus faecalis strains.</i>			
N°	Ceppo Strain	D.O. _{410nm}	D.O./mg prot.
1	3F7B	1,150	1,113
2	3F14B	1,080	1,314
3	3F14C	1,180	1,323
4	3F14D	1,170	1,133
5	3F14A	0,598	0,606
6	3F14F	0,558	0,849
7	3F28C	0,458	0,651
8	3F28D	0,668	1,074
9	3F28E	0,715	0,982
10	3F28F	0,535	0,760
11	3F42A	0,106	0,301
12	3F42B	0,044	0,121
13	3F42C	0,158	0,420
14	8F42D	0,188	0,780
15	8F42A	0,230	0,913
16	8F42C	0,255	1,085
17	8F7A44	0,220	0,961
18	8F14C	0,110	0,328
19	8F7B	0,140	0,341
20	8F7C	0,090	0,251
21	8F7F44	0,100	0,251
22	8F2D	0,140	0,351
23	3F42D	0,005	0,029
24	3F42E	0,004	0,023
25	3F42F	0,005	0,029
26	3F42G	0,005	0,031
27	3F2A44	0,013	0,071
28	3F2B44	0,003	0,015

Legenda: D.O._{410nm}: densità ottica registrata a 410 nm. *Optical density registered at 410 nm.* D.O./mg prot.: densità ottica per mg di proteina dell'estratto acellulare. *Optical density per mg of protein in the cell free extract.*

esterolitiche più interessanti potrebbero essere saggiati allo stesso modo anche su 4-nitrofenil derivati di altri acidi grassi coinvolti nella determinazione delle caratteristiche sensoriali dei formaggi (El Soda e coll., 1986; Katz e coll., 2002). Si deve inoltre sottolineare che la metodica applicata in questa sede saggia le attività esterasiche a livello di un estratto acellulare, tralasciando le frazioni intracellulari,

Tab. II. Attività esterasica dei ceppi di *Enterococcus faecium*. *Esterasic activity of Enterococcus faecium strains.*

N°	Ceppo Strain	D.O. _{410nm}	D.O./mg prot.
1	3F7A	1,380	1,433
2	3F42H	0,645	1,122
3	4F14A	0,378	0,977
4	4F14B	0,695	1,796
5	4F14C	1,025	2,000
6	4F14D	0,793	2,000
7	4F14E	0,805	1,805
8	4F14F	0,790	1,725
9	4F14G	0,770	1,990
10	4F14H	0,745	1,627
11	4F28A	0,180	0,714
12	4F28B	0,235	0,975
13	8F14D	0,090	0,207

Legenda: D.O._{410nm}: densità ottica registrata a 410 nm. *Optical density registered at 410 nm.* D.O./mg prot.: densità ottica per mg di proteina dell'estratto acellulare. *Optical density per mg of protein in the cell free extract.*

che invece rappresentano una componente importante, come riportato ad esempio da Gobbetti e coll. (1996). Ad un livello più approfondito di caratterizzazione, le attività delle differenti frazioni potrebbero essere misurate, così come effettuato dagli stessi Autori, attraverso l'utilizzo di metodiche quantitative sofisticate e richiedenti un tempo di esecuzione prolungato, quindi applicabili vantaggiosamente solo su ceppi già preliminarmente selezionati con metodiche di screening, come quella da noi applicata.

A questo proposito il presente lavoro ha fornito risultati interessanti in quanto, mediante uno screening dei ceppi in esame, ha permesso di compararne le attività esterasiche e di stilare quindi una graduatoria sulla base di questo parametro. L'inclusione in miscele starter autoctone, peraltro già in fase di sperimentazione (Innocenti e coll., 2004a; Innocenti e coll., 2004b), di ceppi di enterococchi dotati di capacità esterolitiche, proteolitiche e peptidasiche ben bilanciate potrebbe risultare di interesse pratico, in virtù del ruolo che tali microrganismi possono svolgere nei processi di caseificazione, contribuendo allo sviluppo del sapore e dell'aroma dei formaggi tradizionali da cui sono stati isolati o di altri di tipologia strettamente affine, anche applicando trattamenti termici del latte da destinare alla trasformazione.

BIBLIOGRAFIA

- ANDRIGHETTO C., KNIJFF E., LOMBARDI A., TORRIANI S., VANCANNEYT M., KERSTERS K., SWINGS J., DELLAGLIO F. (2001). Phenotypic and genetic diversity of enterococci isolated from Italian cheeses. *J. Dairy Res.*, 68: 303-316.
- CHOI Y.J., MIGUEZ C.B., LEE B.H. (2004). Characterization and heterologous gene expression of a novel esterase from *Lactobacillus casei* CL96. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70(6): 3213-3221.
- EL DIN B.B., EL SODA M., EZZAT N. (2002). Proteolytic, lipolytic and autolytic activities of enterococci strains isolated from Egyptian dairy products. *Lait*, 82(3): 289-304.
- EL SODA M., EL WAHAB H.A., EZZAT N., DESMAZEAUD M.J., ISMAIL A. (1986). The esterolytic and lipolytic activities of the lactobacilli. II. Detection of esterase system of *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis* and *Lactobacillus acidophilus*. *Lait*, 66: 431-443.
- FERNANDEZ J., MOHEDANO A., FERNANDEZ-GARCIA E., MEDINA M., NUNEZ M. (2004). Purification and characterization of an extracellular tributyrin esterase produced by a cheese isolate, *Micrococcus* sp. INIA 528. *Int. Dairy J.*, 14(2): 135-142.
- GEORGALAKI M.D., SARANTINOPOULOS P., FERREIRA E.S., DE VUYST L., KALANTZOPOULOS G., TSAKALIDOU E. (2000). Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasseri cheese. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 817-825.
- GOBBETTI M., FOX P.F., STEPANIAK L. (1996). Esterolytic and lipolytic activities of mesophilic and thermophilic lactobacilli. *Int. J. Food Sci.*, 2: 127-135.
- KATZ M., MEDINA R., GONZALEZ S., OLIVER G. (2002). Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *J. Food Prot.*, 65(12): 1997-2001.
- INNOCENTI E., PEDONESE F., NUVOLONI R., D'ASCENZI C., GIRAFFA G., RINDI S., CERRI D. (2004a). Allestimento di uno starter autoctono per la produzione del "Pecorino della Lunigiana". *Atti Conv. Naz. A.I.V.I., Santuario di Vicoforte (CN), 4-6 Giugno 2004*, XIV: 241-246.
- INNOCENTI E., RIZZO E., PEDONESE F., NUVOLONI R., RINDI S., CERRI D. (2004b). Impiego di uno starter autoctono nella produzione del Pecorino del Parco di Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli. *Atti Conv. Naz. S.I.P.A.O.C., Siena, 29 Settembre-2 Ottobre 2004*, XVI: 292.
- LOMBARDI A. (2001). Enterococchi ed altri microrganismi termodurici. In: *Atti Conferenza Nazionale "I rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare. La valutazione microbiologica degli alimenti risanati tramite il calore: tecnologia, biologia ed analisi microbiologiche"*. Bologna, 16 maggio 2001: 49-58.
- PEDONESE F., INNOCENTI E., NUVOLONI R., D'ASCENZI C., GIRAFFA G., NEVIANI E., RINDI S., CERRI D. (2002). Caratterizzazione delle microflora autoctone del formaggio tradizionale ovino prodotto nel "Parco Regionale Migliarino, San Rossore, Massaciuccoli". *Sci. Tec. Latt.-Cas.*, 53(3): 213-234.
- SARANTINOPOULOS P., ANDRIGHETTO C., GEORGALAKI M.D., REA M.C., LOMBARDI A., COGAN T.M., KALANTZOPOULOS G., TSAKALIDOU E. (2001). Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. *Int. Dairy J.*, 11: 621-647.
- TSAKALIDOU E., MANOLOPOULOU E., TSILIBARI V., GEORGALAKI M., KALANTZOPOULOS G. (1993). Esterolytic activities of *Enterococcus durans* and *E.*

- faecium* strains isolated from Greek cheese. Neth. Milk Dairy J., 47: 145-150.
- VAUGHAN L.C., HOLLAND R., GRAHAM G.P., COOLBEAR T. (1994). The diversity of potential cheese ripening characteristics of lactic acid starter bacteria: 2. The levels and subcellular distributions of peptidase and esterase activities. Int. Dairy J., 4: 723-742.
- WILLIAMS A.G., BANKS J.M. (1997). Proteolytic and other hydrolytic enzyme activities in non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) isolated from Cheddar cheese manufactured in the United Kingdom. Int. Dairy J., 7(12): 763-774.
- WILLIAMS A.G., BEATTIE S.H., BANKS J.M. (2004). Enzymes involved in flavour formation by bacteria isolated from the smear population of surface-ripened cheese. Int. J. Dairy Tech., 57: 7-13.