



UNIVERSA  
UNIVERSIS  
PATAVINA  
LIBERTAS

# Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

## Università degli Studi di Padova

Viale dell'Università 16, Agripolis 35020 Legnaro (PD) Italy - C.F. 80006480281- P.IVA 00742430283  
Direttore Prof. Roberto Busetto

Valerio Giaccone

Professore Ordinario di "Ispezione e Controllo dei Prodotti alimentari di Origine animale"  
Dipartimento di Medicina animale, Produzioni e Salute – Università degli Studi di Padova.  
Telefono fisso: 049/8272607. Telefono cellulare: 338/4671284. E-mail: [valerio.giaccone@unipd.it](mailto:valerio.giaccone@unipd.it).

### 1. Premesse e scopo delle indagini condotte

Questa relazione tecnica illustra i risultati ottenuti nel corso di una serie programmata di analisi microbiologiche svolte dal sottoscritto nel laboratorio di Microbiologia degli Alimenti di questo Dipartimento.

Le analisi erano mirate a valutare l'efficacia stabilizzante di uno specifico preparato a base di fermenti probiotici naturali sul siero di caseificazione non acido.

Lo scopo dichiarato del proponente (**la ditta Punto EM srl**) è di usare il suddetto preparato EM per aumentare la conservabilità del siero dolce di caseificazione, in modo da poter sfruttare al meglio il valore nutritivo quando viene somministrato agli animali in allevamento.

In premessa ritengo utile ricordare che cos'è il siero dolce di caseificazione e quali sono le sue normali caratteristiche microbiologiche. Il siero dolce è un **importante co-prodotto** della produzione del formaggio. Dopo avere fatto coagulare la più importante proteina del latte (la caseina), il coagulo che si forma viene rotto in pezzi più o meno grandi o piccoli, secondo il formaggio che si intende produrre.

Lasciando riposare il tutto per qualche minuto, i frammenti del coagulo (molto collosi) precipitano in fondo alla caldaia e si aggregano fra loro formando la massa caseosa che si trasformerà in formaggio.

La componente acquosa residua che si separa dai coaguli è il **siero**: contiene acqua, una quota residua di lattosio, molte delle proteine diverse dalla caseina (sieroproteine nobili), lipidi e i sali minerali del latte, a parte il calcio che confluisce nella massa caseosa.

Il siero dolce appena prodotto ha in genere una temperatura intorno ai 37°C, è ricco di proteine, acqua ed elementi nutritivi. Questo lo rende un terreno di sviluppo ottimale un po' per tutti i microrganismi e, quindi, è un prodotto microbiologicamente deperibile.

A seguito del processo di caseificazione presamica fatta con caglio, il siero dolce ha un pH medio di circa 5,7 – 5,8, ossia non troppo neutro ma nemmeno così acido da bloccare la crescita di microrganismi alteranti.

La microflora del siero di caseificazione è mediamente alta. I **batteri lattici** di regola costituiscono una frazione significativa di questa carica microbica, ma nel siero possono persistere anche parte dei **coliformi totali** e **fecali** che erano presenti nel latte, se il formaggio è prodotto con latte crudo, e nel corso del processo produttivo possono raccogliersi nel siero anche cariche consistenti di **micrococchi**,

stafilococchi non patogeni, *Pseudomonas*, lieviti e muffe che col loro metabolismo degradativo possono rapidamente fare "andare a male" il siero, impedendone un suo razionale utilizzo in zootecnia.

## 2. Programmazione e svolgimento delle analisi

Per valutare l'efficacia antimicrobica stabilizzante del prodotto EM, abbiamo condotto analisi microbiologiche su due differenti tipi di siero di caseificazione:

- (1) il siero contrassegnato con la lettera **A**, che era il nostro controllo negativo perché non sottoposto ad alcun tipo di trattamento,
- (2) il siero **B**, cui era stato aggiunto, appena prodotto, il preparato EM nelle concentrazioni volute dal proponente della ricerca.

Sottolineo che nel corso di tutta la prova le analisi microbiologiche sono state condotte sui campioni di siero A e B con le stesse modalità di procedura tecnica e che né il sottoscritto né i tecnici di laboratorio conoscevano la natura delle due serie di campioni che stavamo analizzando. Le analisi sono state, quindi, condotte con prove alla cieca e su campioni di siero fornitici già trattati dai proponenti della ricerca.

### 2.1. PROGRAMMAZIONE E SVOLGIMENTO DELLE ANALISI

I due lotti di siero (normale non trattato e con aggiunta di EM) sono stati mantenuti per tutta la durata delle prove in condizioni di temperatura uniforme, pari a 24-25 °C.

A intervalli di tempo regolari, dai campioni iniziali si prelevavano in sterilità 100 ml di siero che servivano per le analisi e il controllo.

Il controllo sensoriale era effettuato da un esperto inviato dalla stessa ditta proponente la ricerca, per cui i risultati di questa valutazione NON sono compresi in questa relazione, che si limita a riportare e commentare i risultati delle analisi microbiologiche.

In totale sono state eseguite **sette repliche** di analisi sui campioni conservati dal 1° al 60° giorno, con prove eseguite al 1°, 2°, 7°, 15°, 31°, 46° e 60° giorno.

L'esame microbiologico ha riguardato la determinazione quantitativa di:

- pH
- Carica Microbica Totale (CMT)
- Batteri lattici (*Lactobacillus* e cocchi lattici)
- Coliformi Totali
- *Pseudomonas* spp.
- *Micrococcus* spp.
- *Staphylococcus* spp.
- Muffe e lieviti.

## 2.2. METODI ANALITICI DI PRELIEVO ED ESECUZIONE DELLE PROVE

Agitare numerose volte il campione per rendere omogenea la distribuzione degli organismi. Cercare di limitare la formazione di schiuma o attendere la sua dissoluzione.

Prelevare 1 ml del campione con una pipetta sterile ed aggiungerlo a 9 ml di soluzione fisiologica sterile. Agitare, ottenendo così la diluizione 1:10 ( $10^{-1}$ ).

Effettuare le diluizioni decimali necessarie; trasferire con una pipetta sterile 1 ml dalla prima diluizione in 9 ml di soluzione fisiologica sterile. Mescolare con cura; si ottiene così la seconda diluizione 1:100 ( $10^{-2}$ ). Ripetere l'operazione, proseguendo nella scala di diluizioni seriali fino alla diluizione stimata utile per eseguire il conteggio delle varie cariche microbiche previste.

Erogare in sterilità 0,1 ml della diluizione nel terreno opportuno e spatolare; seminare 1 ml per i terreni ad inclusione.

Porre il tutto a incubare secondo le temperature ottimali di crescita dei vari microrganismi. Dopo incubazione, procedere con la lettura delle piastre e il conteggio delle colonie.

## 2.3. TERRENI DI CULTURA IMPIEGATI

Le analisi sono state condotte con i seguenti terreni:

- *Oxytetraciline-Glucose Yeast Extract Agar*: rileva la presenza di muffe e lieviti. Incubato per 24-48 ore a 20°-24°C,
- *GSP Agar*: permette di conteggiare la carica di *Pseudomonas* e *Aeromonas*. Incubato per 48 ore a 20°-24°C.
- *MRS Agar*: utilizzato per selezionare *Lactobacillus* spp.. Incubato per 24-48 ore a 37°C.
- *Baird-Parker Agar*: serve per conteggiare *Micrococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.. Incubato per 24-48 ore a 37°C.
- *Plate-Count-Agar*: Consente di determinare la Carica Microbica Totale. Incubato per 48-72 ore a 31°C.
- *VRBG Agar*: usato per conteggiare i coliformi totali e fecali; i coliformi totali vanno incubati per 24-48 ore a 37 °C.

## 3. Risultati ottenuti dalle analisi

I risultati delle determinazioni analitiche condotte sono riportati nelle **Tablelle 1 e 2** allegate a questa relazione. Sulla base dei risultati sono stati anche elaborati dei grafici che aiutano a comprendere meglio il quadro complessivo della ricerca.

Anche i grafici sopracitati sono riportati in allegato alla presente relazione.

#### 4. Considerazioni personali del Consulente sui risultati

La determinazione del pH sui due sieri mostra un andamento significativo: il siero B (trattato con EM) ha fatto segnare **valori di pH** di circa 3,0 U sin dal primo giorno d'analisi, mentre il siero A di controllo ha fatto registrare un calo progressivo di valori passando da 5,2 del 1° giorno a 3,8 e poi a 3,1 sul giro della prima settimana. La notevole acidità del siero trattato con EM fin dal 1° giorno gioca un ruolo determinante nella stabilizzazione delle caratteristiche sensoriali del prodotto.

La **CMT** ha fatto segnare un brusco aumento dei valori per il siero A di controllo e un incremento meno spiccato (ma pur sempre presente) in quello trattato con EM, nella prima settimana. Nel prosieguo delle prove le cariche dei due campioni si sono poi mantenute sui valori pressoché uguali.

Andamento quasi del tutto analogo hanno fatto registrare sia i *Lactobacillus* che i **fermenti coccici**, se pure con valori di carica differenti l'uno dall'altro. I *Lactobacillus*, in particolare, erano più abbondanti nel siero B trattato con EM, rispetto al siero A, mentre per i lattococchi il siero EM ha fatto segnare un andamento di carica più regolare, non così altalenante come il siero A di controllo.

Risultati molto interessanti sono stati ottenuti per quanto riguarda i due più importanti parametri di qualità igienica del siero: i **Coliformi Totali** e le **Pseudomonadacee**.

Per entrambi le voci dell'esame microbiologico abbiamo rilevato andamenti analoghi, se pure con differenti valori di carica: nel siero non trattato (A) si partiva da cariche alte che poi si riducevano dopo la prima settimana per poi tornare a salire alla 5<sup>a</sup> e all'8<sup>a</sup> settimana. È probabilmente questo movimento di crescita che ha giustificato il forte scadimento delle caratteristiche sensoriali del siero A.

Nel siero B trattato con EM, invece, sia i Coliformi Totali che le Pseudomonadacee si sono mantenuti su cariche molto basse, appena superiori a 10 ufc/ml. È questo che motiva, a mio avviso, la migliore conservazione del siero B trattato con EM rispetto al siero non trattato.

Per quanto riguarda i **lieviti** e le **muffe**, le due voci hanno fatto segnare un andamento pressoché analogo per i due sieri A e B. Tra lieviti e muffe, comunque, si apprezza una sorta di "staffetta" nella dinamica di crescita, con i lieviti che predominano nelle prime 3 – 4 settimane e le muffe che subentrano in questo predominio, a partire dalla 4<sup>a</sup> settimana di conservazione.

Siamo, verosimilmente, di fronte a quella che i microbiologi chiamano crescita bifasica in successione; i lieviti dominano nella prima metà della prova, con il loro metabolismo preparano il substrato per la successiva crescita delle muffe, che non crescono finché i lieviti si mantengono su cariche elevate.

#### 5. Conclusioni

Il rilevamento delle caratteristiche sensoriali dei due sieri (fatto da un esperto incaricato dalla ditta proponente il progetto) pone in evidenza un dato di fatto sostanziale: il siero B trattato con EM ha mantenuto praticamente invariate le sue caratteristiche di aroma, acidità e sapore per tutta la durata delle prove.

Il siero A non trattato, invece, ha iniziato a manifestare i primi segni di alterazione già dopo la prima settimana di conservazione e tali caratteristiche hanno continuato gradualmente a peggiorare nel corso delle settimane successive.

In base a quanto segnalato da chi ha valutato le caratteristiche sensoriali dei due sieri, dal mio punto di vista di esperto in igiene degli alimenti trovo pieno riscontro a tali affermazioni leggendo gli andamenti delle cariche microbiche valutate. Ciò vale, in particolare, per gli andamenti del pH, in particolare, dei coliformi totali e delle Pseudomonadacee.

In conclusione, posso affermare in scienza e coscienza che il siero trattato con il preparato EM ha fatto segnare, dal punto di vista microbiologico, esiti di stabilizzazione molto migliori rispetto al siero A di controllo, per tutta la durata delle prove.

Legnaro (PD), 19 febbraio 2013

(prof. Valerio Giaccone)

## Riferimenti bibliografici

1. Andrighetto C., Marcazzan G., Lombardi A. (2004). "Use of RAPD-PCR and TGGE for the evaluation of biodiversity of whey cultures for Grana Padano cheese". *Letters in Applied Microbiology* 38, 400-405.
2. Ercolini D., Frisso G., Mauriello G., Salvatore F., Coppola S. (2008). "Microbial diversity in natural whey cultures used for the production of Caciocavallo Silano PDO cheese". *International Journal of Food Microbiology*, 124, 164-170.
3. Gatti M., Lazzi C., Rossetti L., Mucchetti G., Neviani E. (2003). "Biodiversity in *Lactobacillus helveticus* strains present in natural whey starter used for Parmigiano-Reggiano cheese". *Journal of Applied Microbiology* 95, 463-470.
4. Hernández-Ledesma B., Ramos M., Gómez-Ruiz J.Á. (2011). "Bioactive components of ovine and caprine cheese whey". *Small Ruminant Research* 101, 196-204.
5. Lazzi C., Rossetti L., Zago M., Neviani E., Giraffa G. (2004). "Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR". *Journal of Applied Microbiology* 96, 481-490.
6. Prazeres A.R., Carvalho F., Rivas J. (2012). "Cheese whey management: A review". *Journal of Environmental Management* 110, 48-68.
7. Rossetti L., Fornasari M.E., Gatti M., Lazzi C., Neviani E., Giraffa G. (2008). "Grana Padano cheese whey starters: Microbial composition and strain distribution". *International Journal of Food Microbiology* 127, 168-171.
8. Santarelli M., Gatti M., Lazzi C., Bernini V., Zapparoli G.A., Neviani E. (2008). "Whey starter for Grana Padano cheese: effect of technological parameters on viability and composition of the microbial community". *Journal of Dairy Science* 91, 883-891.