

Lisa Vallone

PREGI E DIFETTI DEI FORMAGGI AMMUFFITI

Dip. VESPA – Università degli Studi di Milano



**GIORNATA STUDIO SULLE PROBLEMATICHE
ATTUALI DEL SETTORE LATTIERO-CASEARIO**



MUFFE TIPICHE
= pregi



MUFFE CRITICHE
= difetti



MUFFE CRITICHE

- Specie fungine che sono in grado di produrre cambiamenti delle caratteristiche sensoriali del prodotto (aspetto)
- Specie fungine potenzialmente tossinogene

MUFFE TIPICHE

- Specie fungine che contribuiscono a determinare la **QUALITA'** del prodotto
- Contaminazione spontanea ambientale
- Contaminazione volontaria: starter



Contaminazione spontanea ambientale: stanze di stagionatura.

La flora fungina spontanea dipende dalla localizzazione dell'azienda, dal luogo, dalla regione, spesso dalla stagione.

Flora autoctona (pregi):

Penicillium chrysogenum, *Penicillium nalgiovensis*,

Penicillium commune, *Penicillium solitum*, *Penicillium crustosum*

Geotrichum spp

Contaminazione volontaria: starter

La produzione è standardizzata,
«industriale», le fermentazioni sono guidate

In commercio:

- sospensioni liquide concentrate di spore
(durata da 6 settimane a 6 mesi a 0-5 °C)
- spore liofilizzate, in polvere
(durata fino a due anni a – 18 °C. Devono essere scongelate e sospese in acqua. La preparazione dura circa 1 gg)

Temperatura

Acidità

Aerazione

Sale (NaCl)

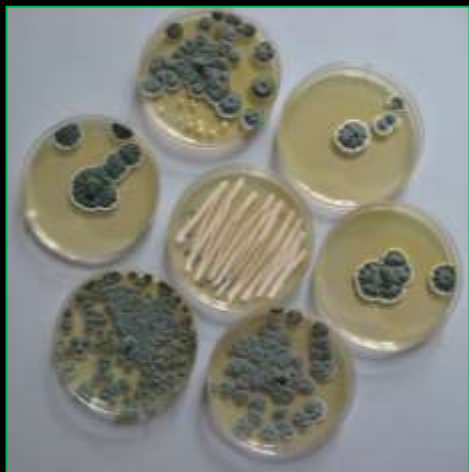
Tutte le condizioni di ambiente e di substrato favoriscono crescita fungina



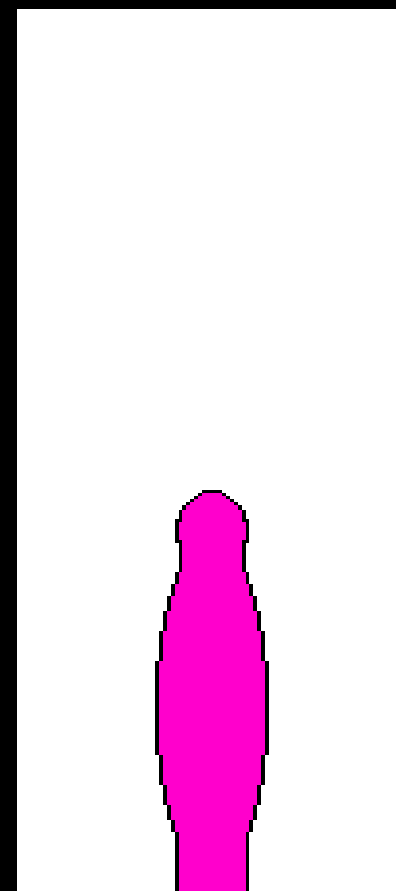
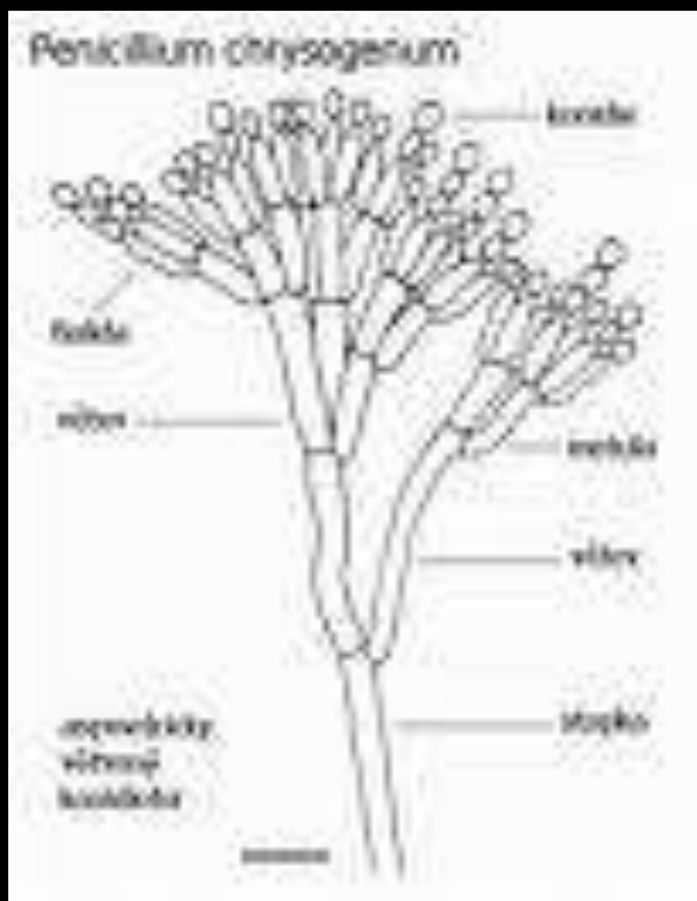
PREGI:

Penicillium spp

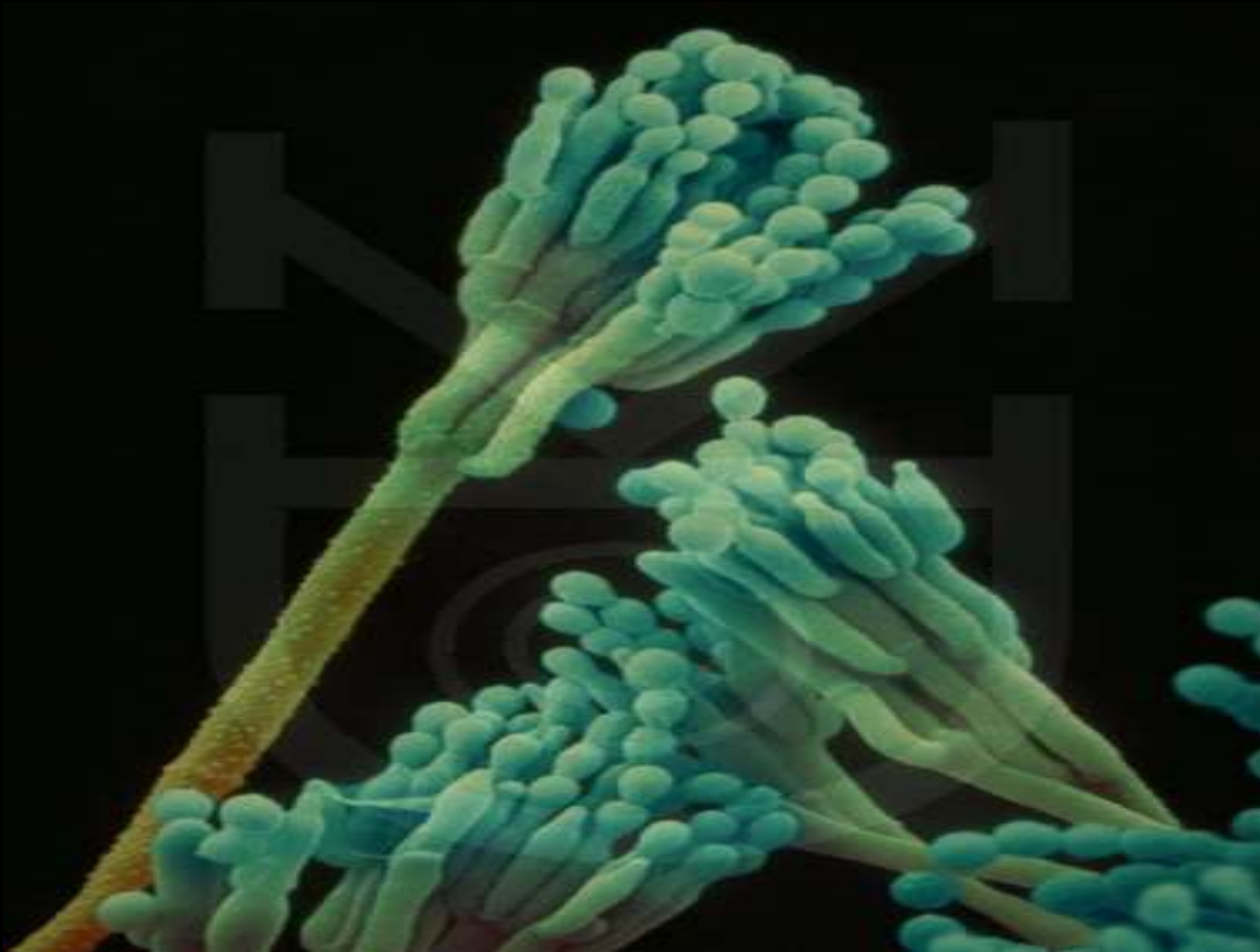
Geotrichum candidum



FLORA FUNGINA TIPICA



FLORA FUNGINA TIPICA



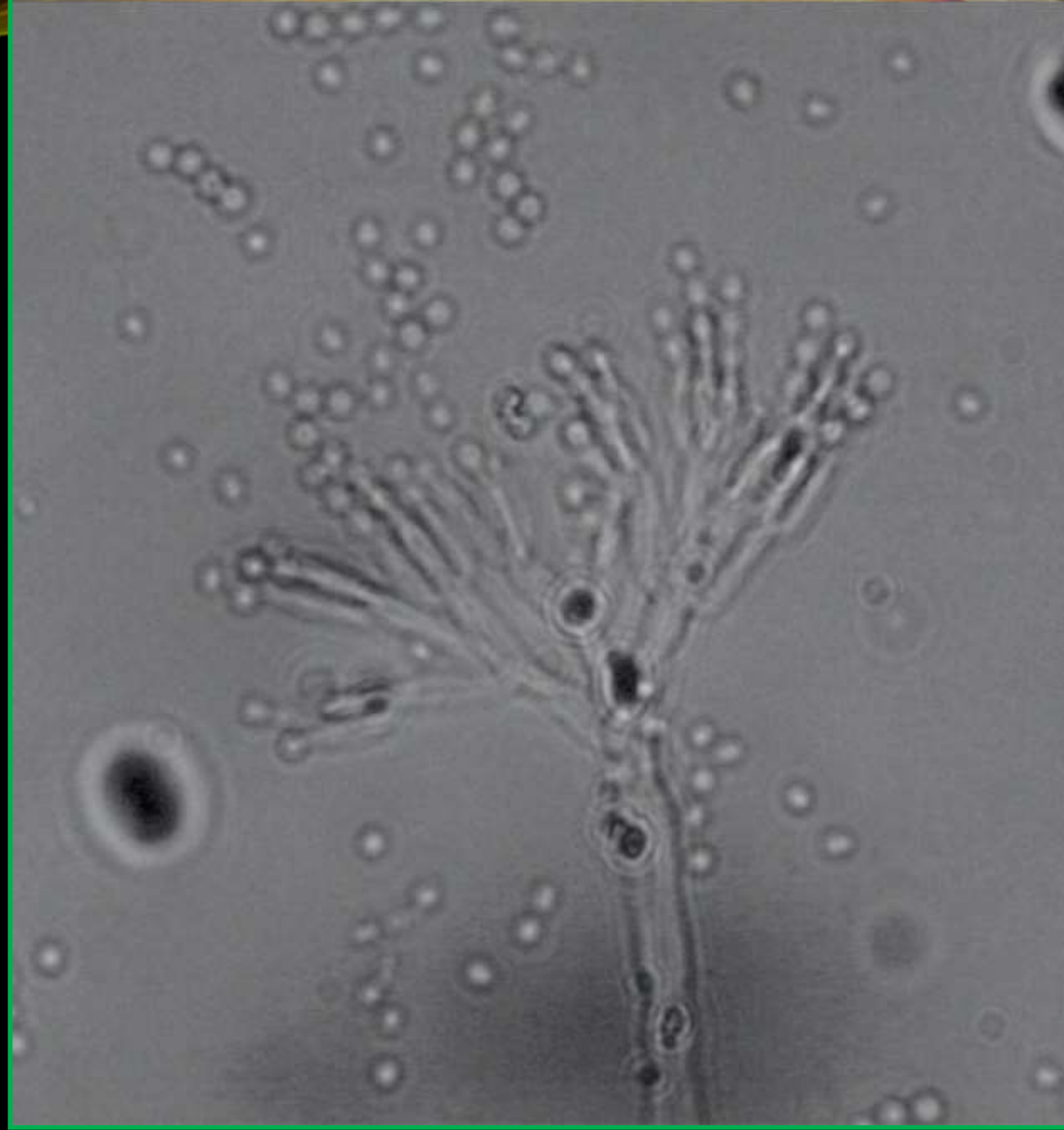
Penicillium spp

Penicillium roqueforti
Micelio verde



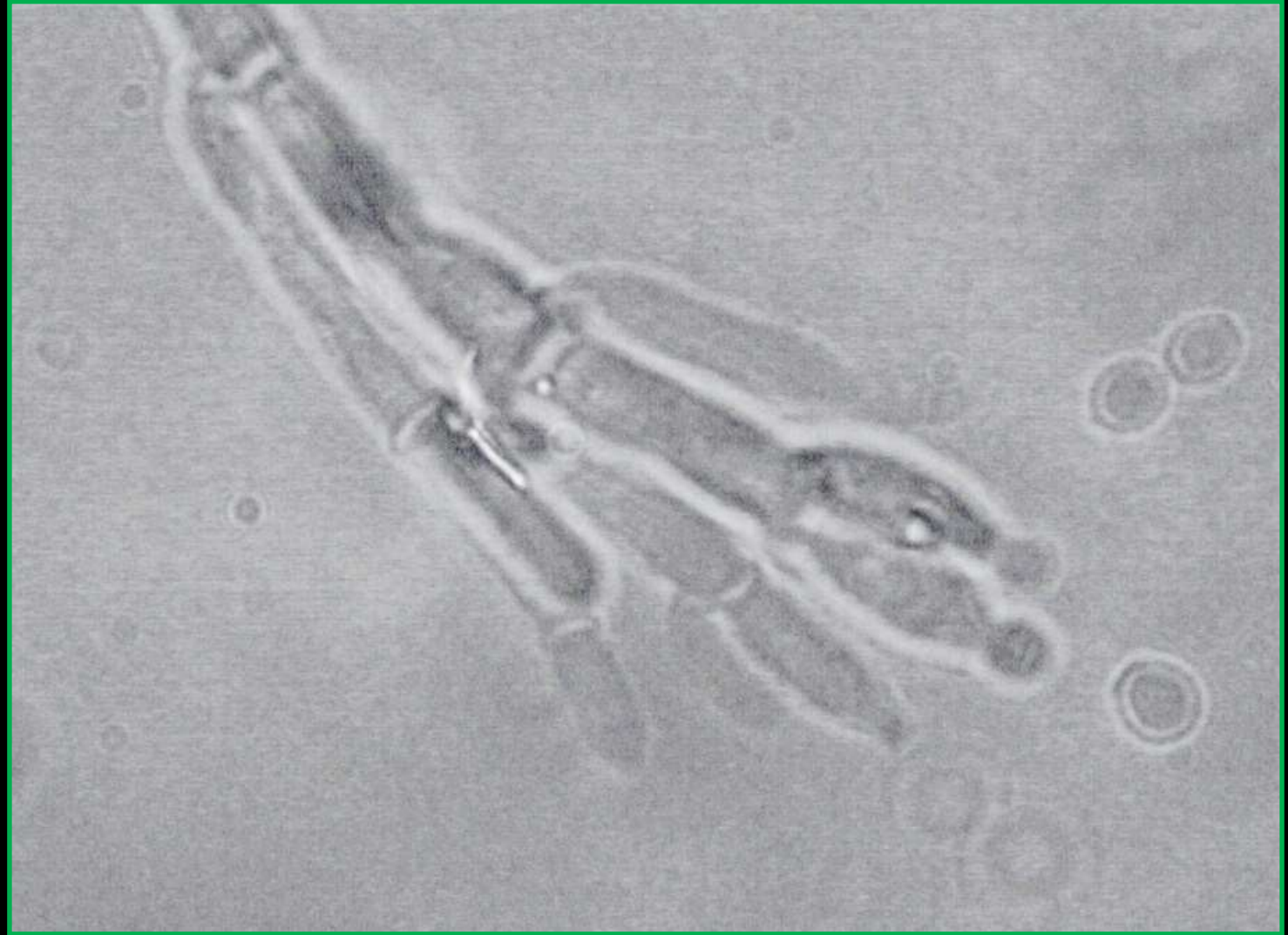
Penicillium chrysogenum
Micelio verde-azzurro pallido



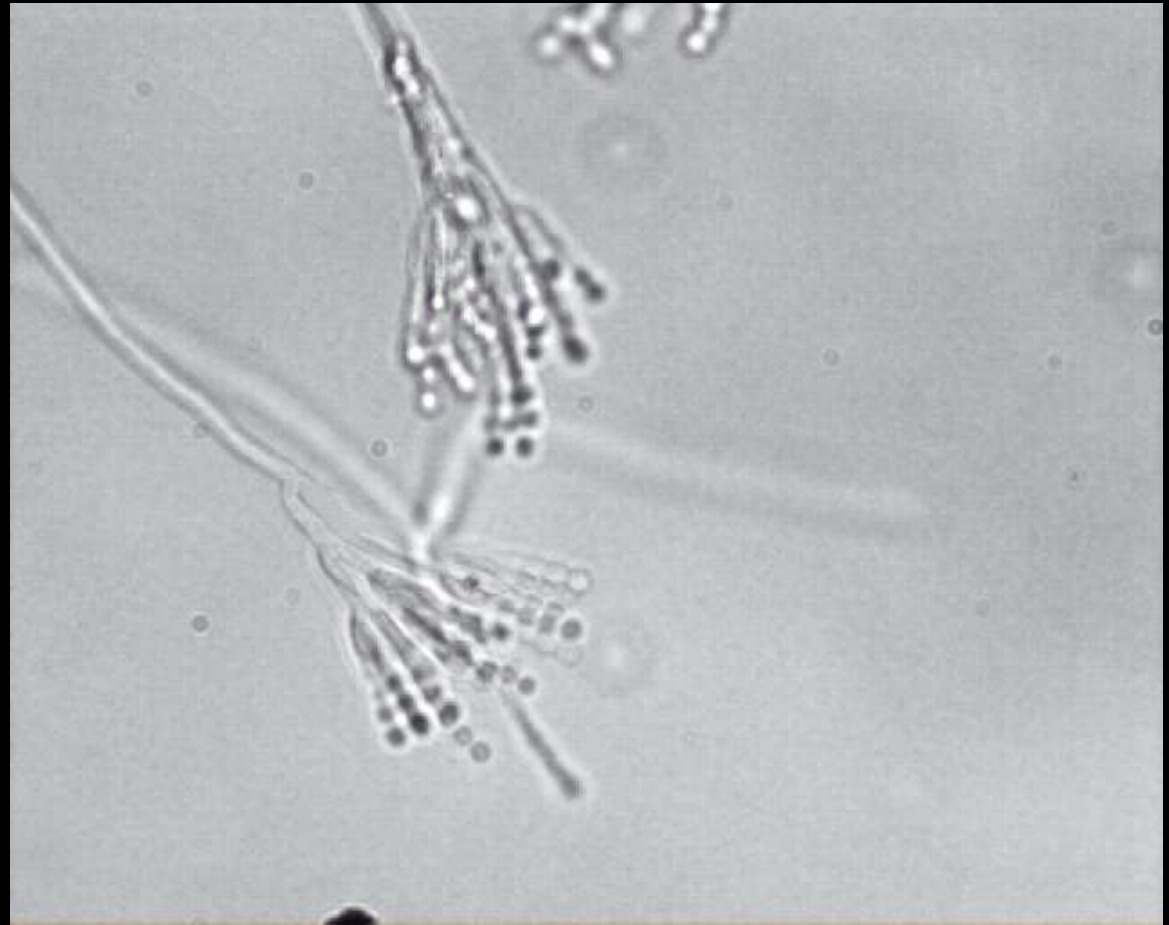








Penicillium camemberti
Micelio bianco



- Micelio bianco
- Rapidità di sviluppo

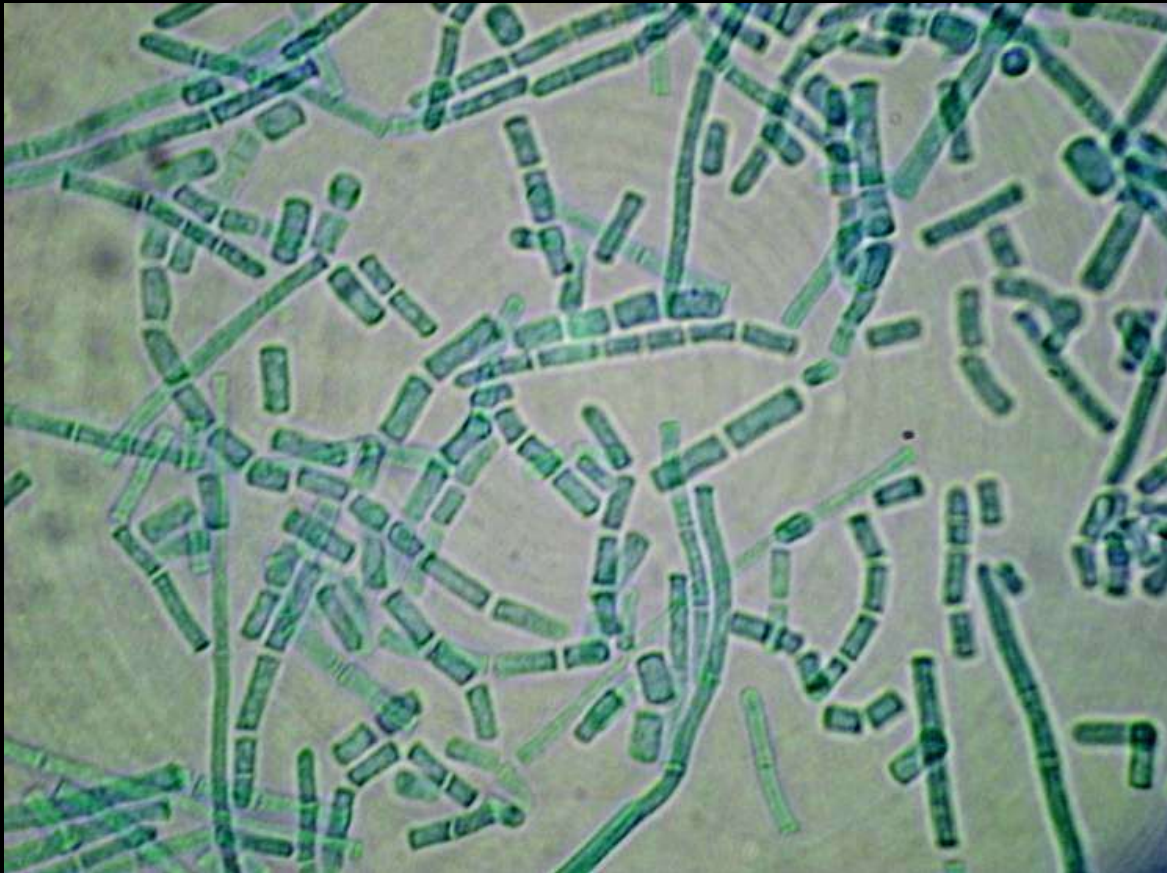


Penicillium nalgiovensis

Bianco grigio



Geotrichum candidum
Micelio bianco



PREGI:

Flora fungina instaura una forte competizione per i fattori nutritivi e per il substrato con le specie batteriche patogene, impedendone lo sviluppo.

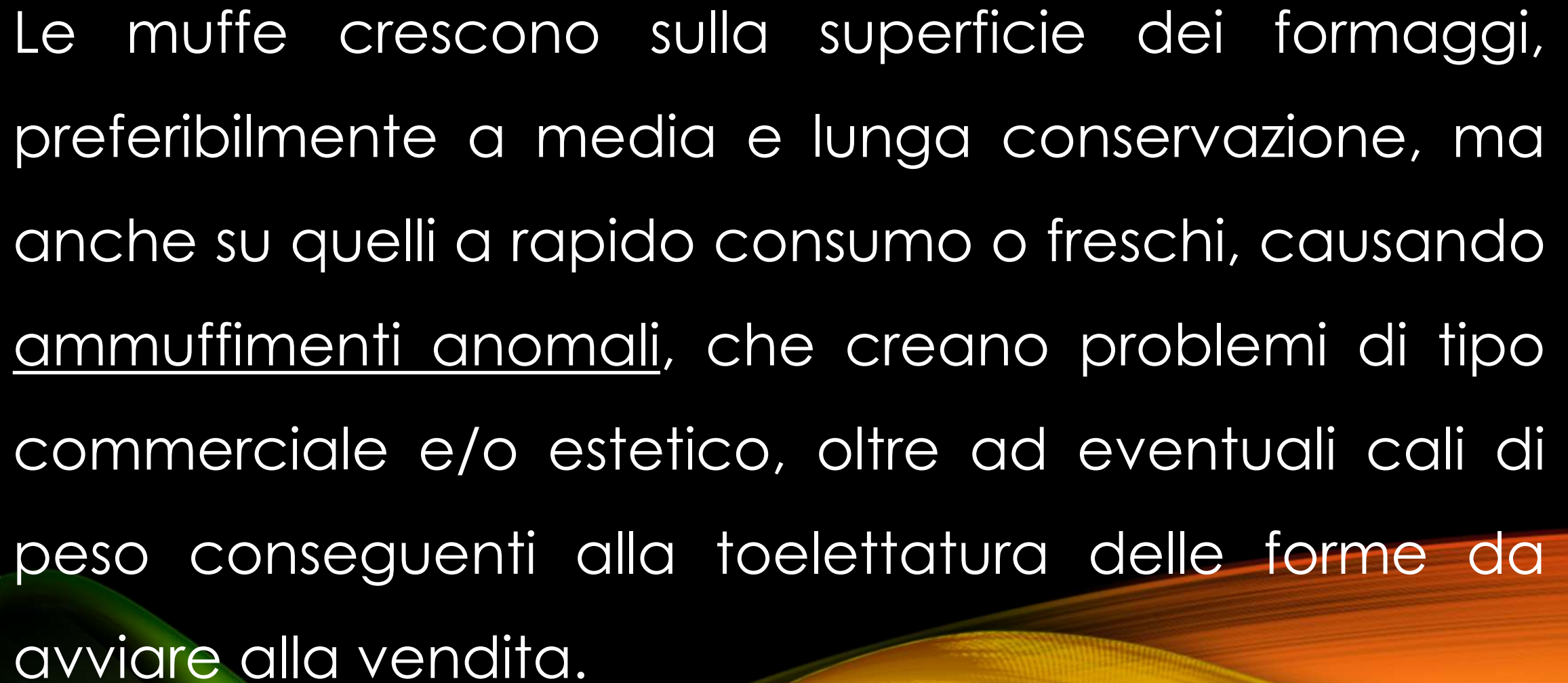


FLORA FUNGINA CRITICA

EFFETTI NEGATIVI

- sull'aspetto del prodotto, colori anomali
- sul gusto e aroma, indesiderati
- possono produrre metaboliti secondari
(micotossine, sostanze antibiotiche)

Le muffe crescono sulla superficie dei formaggi, preferibilmente a media e lunga conservazione, ma anche su quelli a rapido consumo o freschi, causando ammuffimenti anomali, che creano problemi di tipo commerciale e/o estetico, oltre ad eventuali cali di peso conseguenti alla toelettatura delle forme da avviare alla vendita.



DIFETTI:

Mucor e Rhizopus

Aspergillus spp (flavus)

Cladosporium e Alternaria

Botrytis spp

Fusarium spp

Scopulariopsis brevicaulis

FORMAGGI

- A BREVE STAGIONATURA (CAPRINI, CRESCENZA, MOZZARELLA)

MUFFE SEMPRE INDESIDERATE:

Penicillium, Aspergillus, Mucor

- STAGIONATI:

P. roqueforti, P. expansum

macchie bluastre

Scopulariopsis brevicaulis

macchie marroni-rosate

Mucor mucedo, racemosus

ammuff. cotonoso grigio

FORMAGGI

- STAGIONATI:

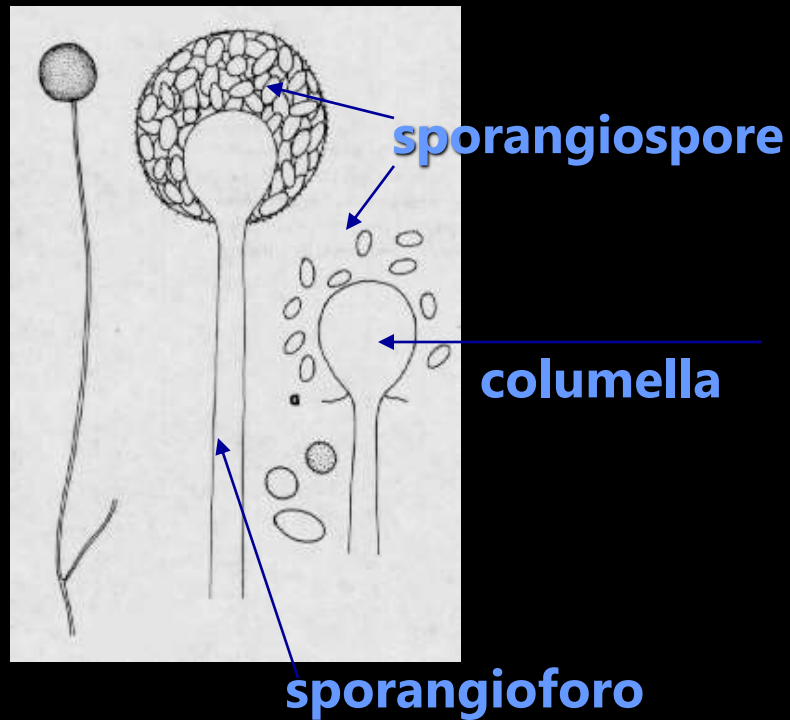
Mucor fuscus, plumbeus

ammuff. cotonoso nero

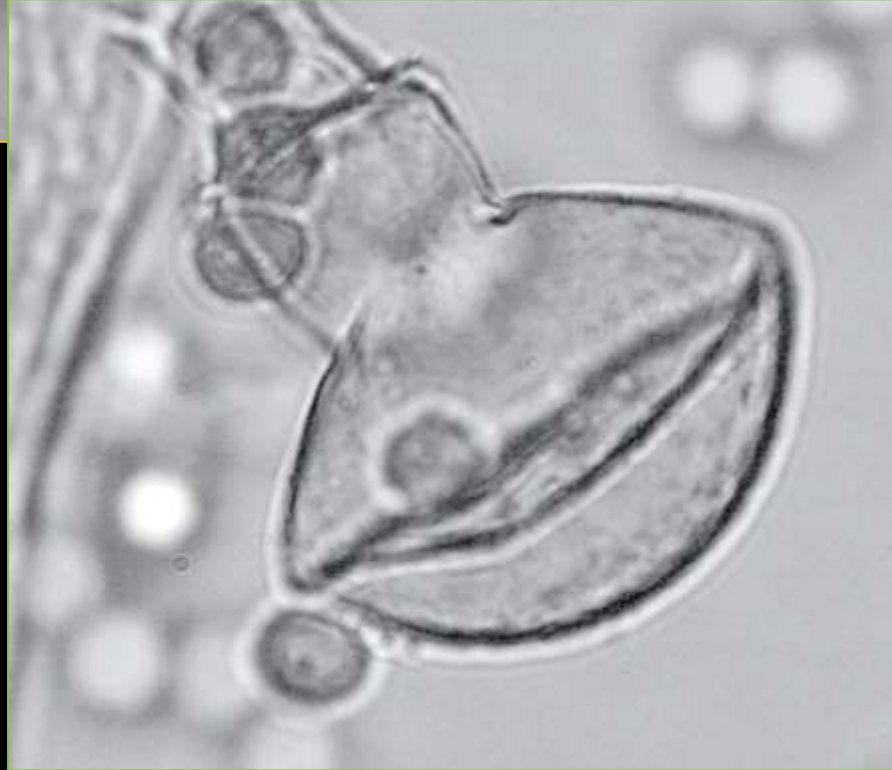
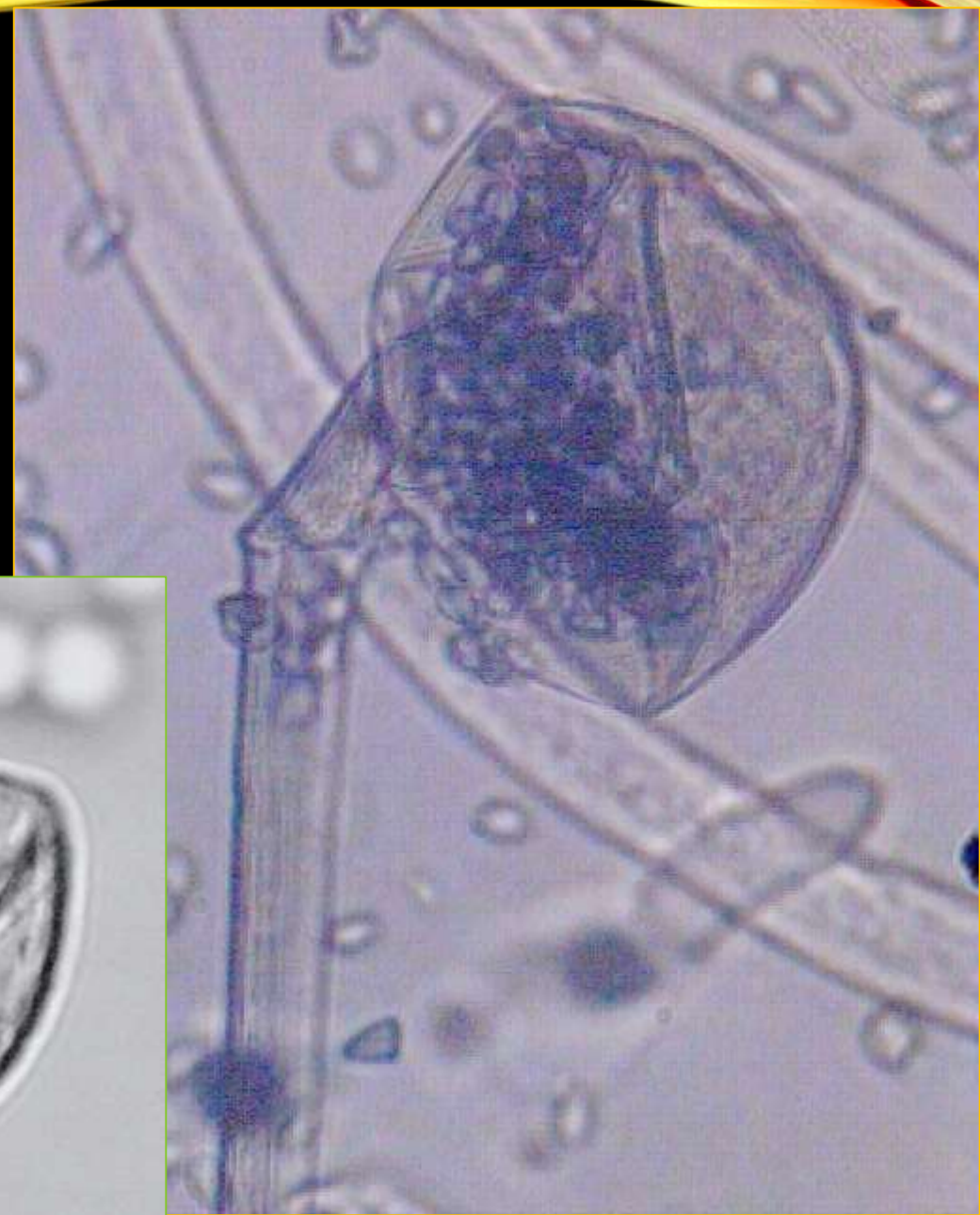
Cladosporium herbarum

macchie nere aderenti

Mucor spp



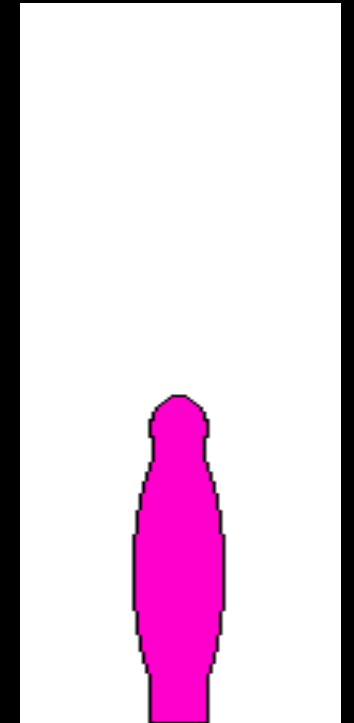
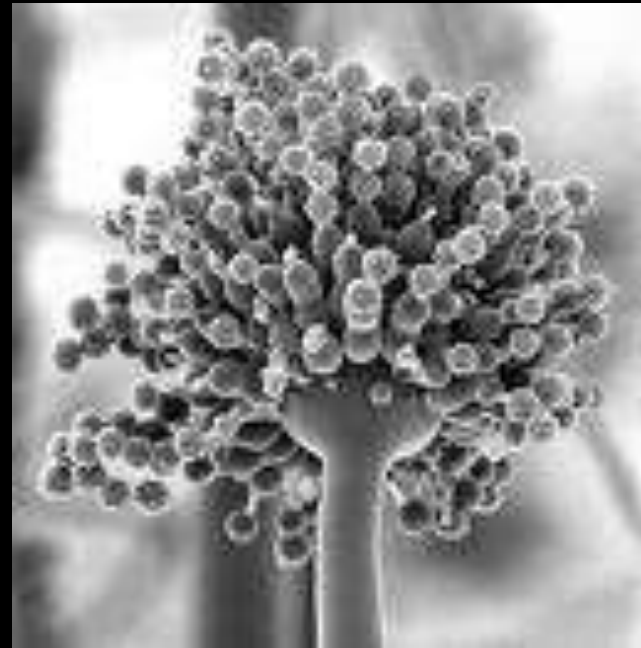
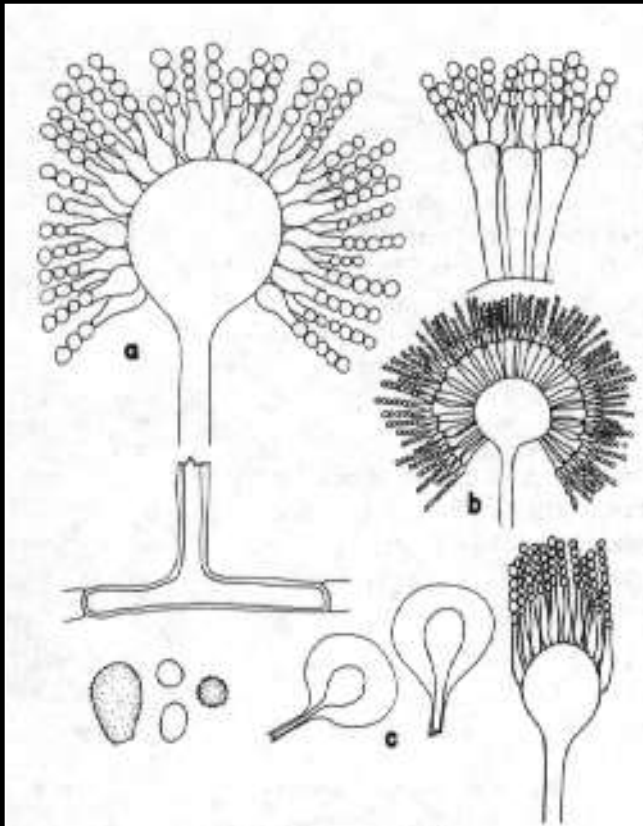
*Molto invasive,
crescono in tempi
molto brevi*





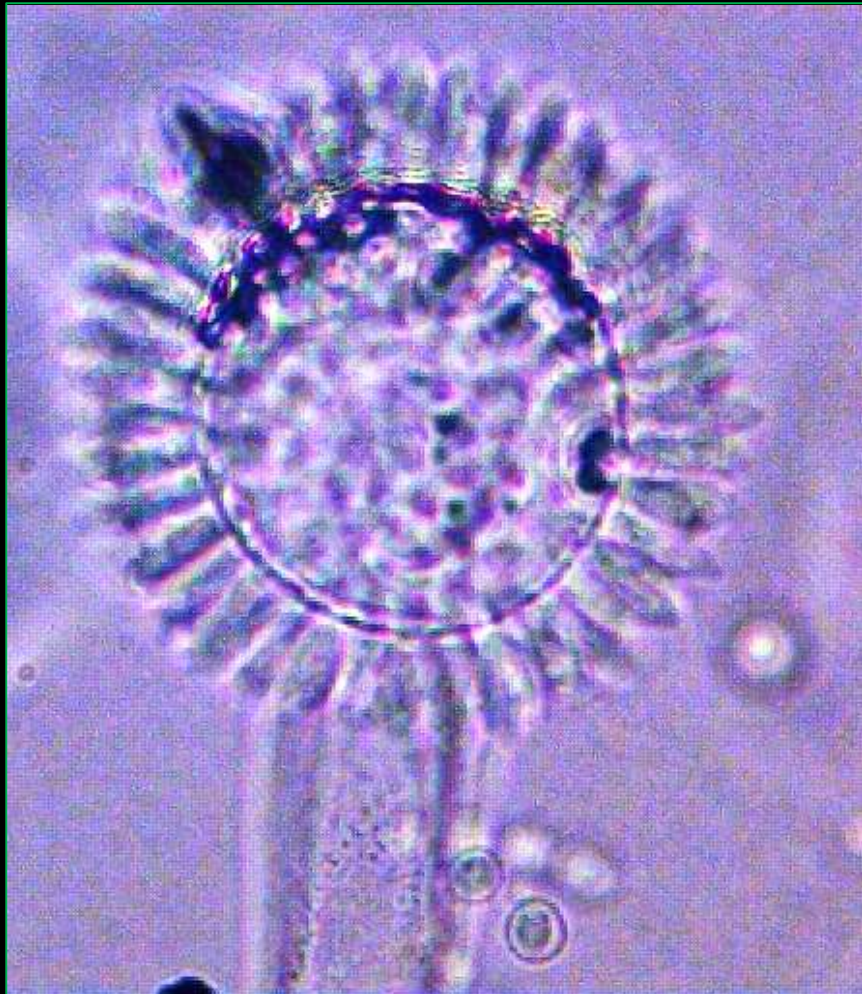


Aspergillus spp

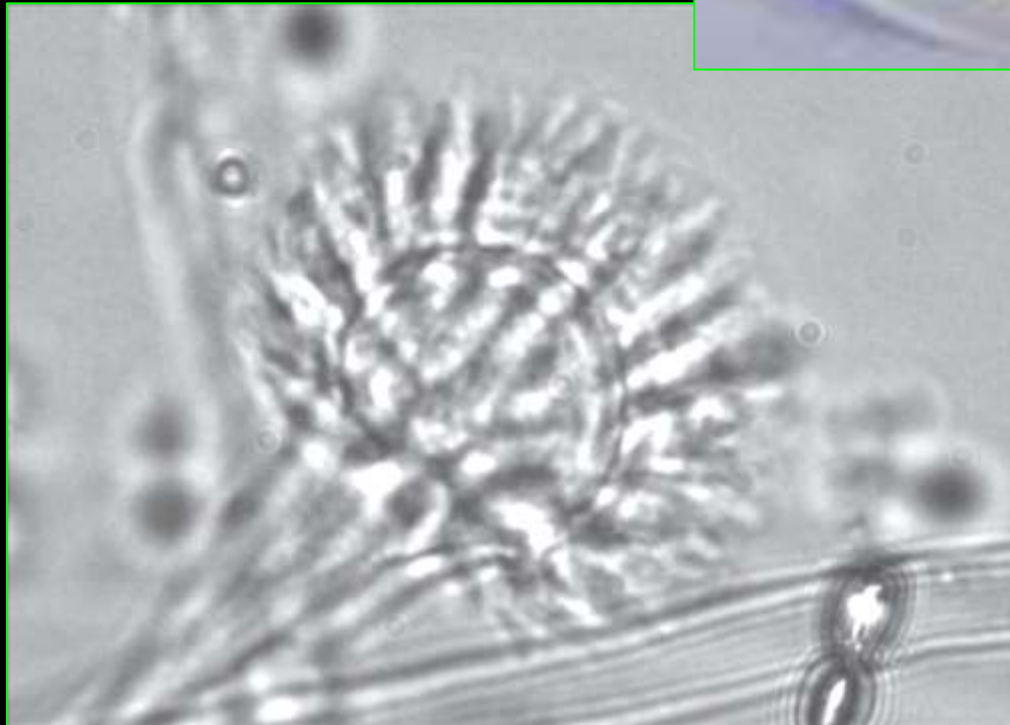


Aspergillus gr. *glaucus*

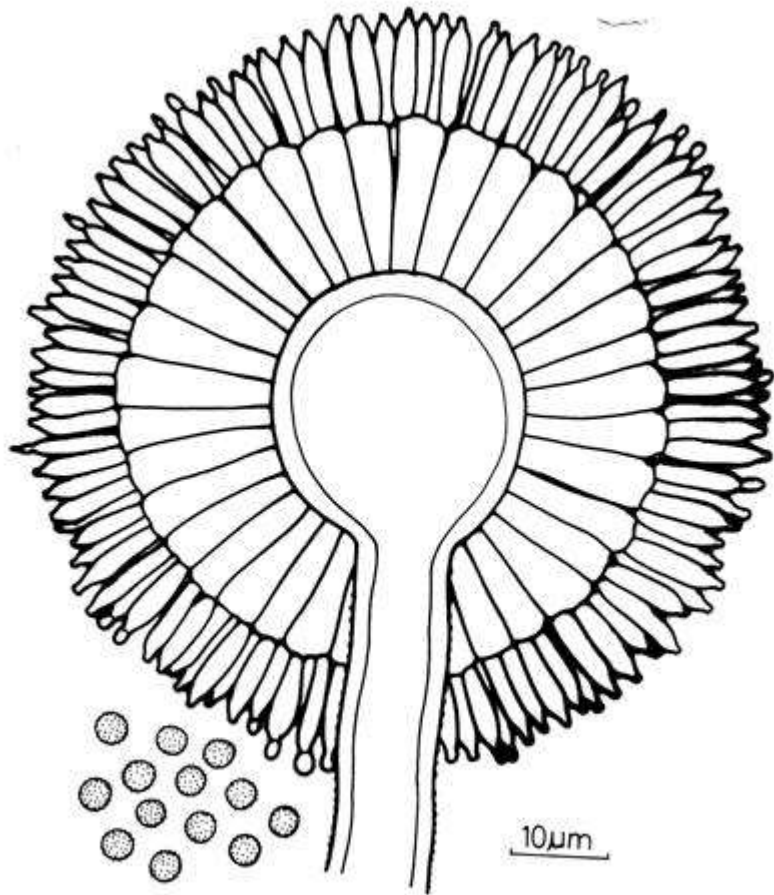
(*A. ruber*, *A. chevalieri*, *A. amstelodami*, *A. repens*)



Aspergillus flavus



Aspergillus ochraceus

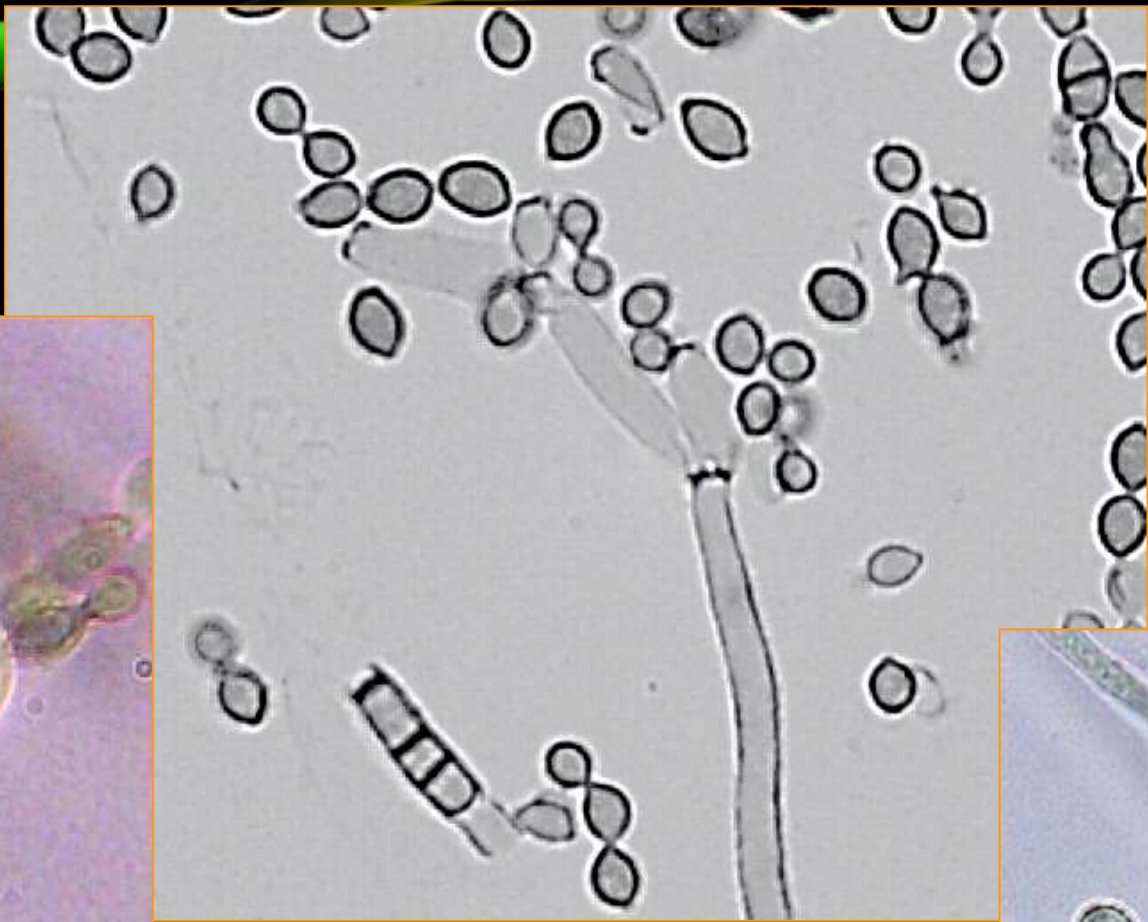
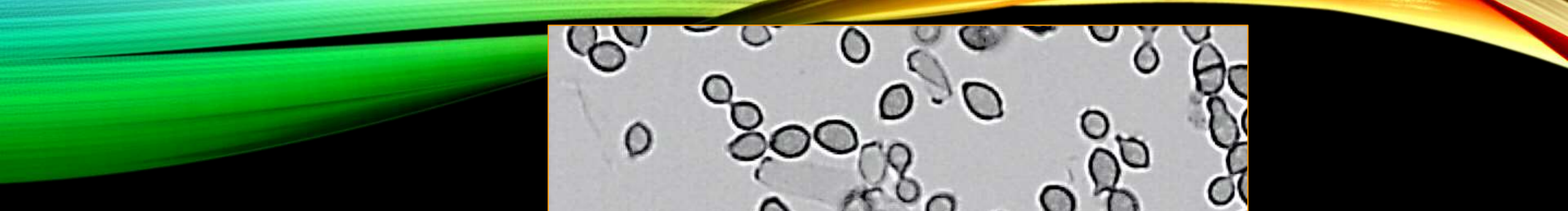


Cladosporium cladosporioides

Cladosporium herbarum



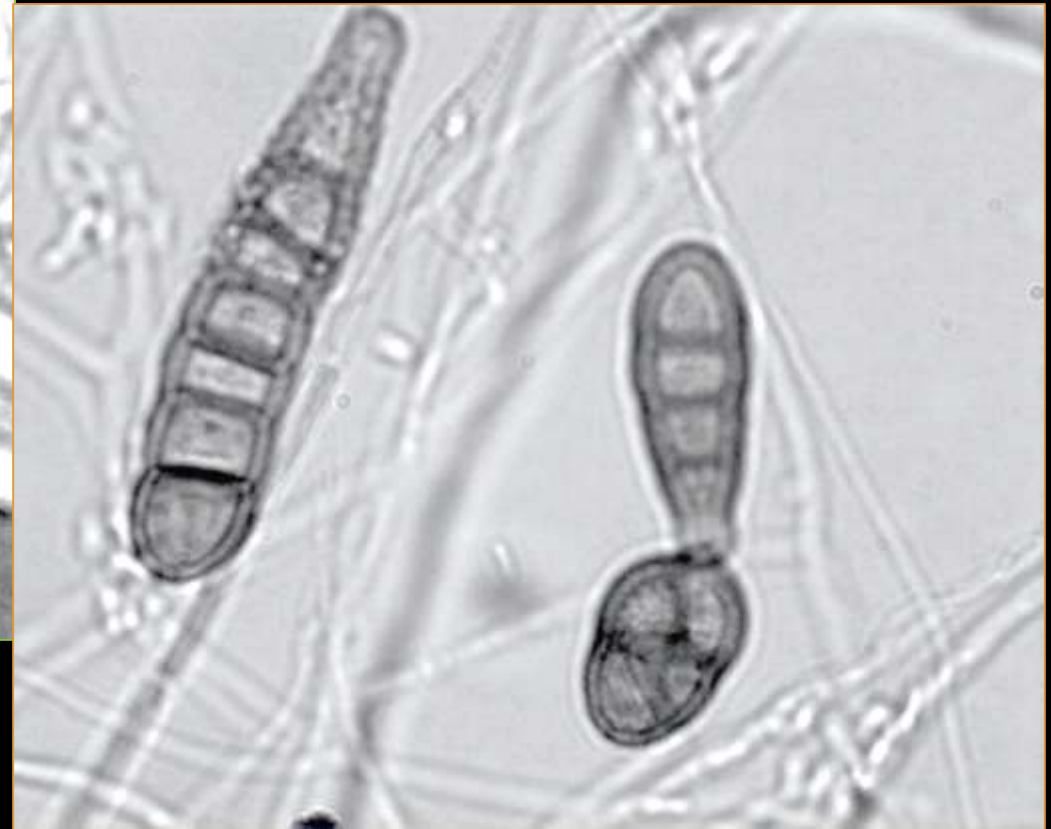
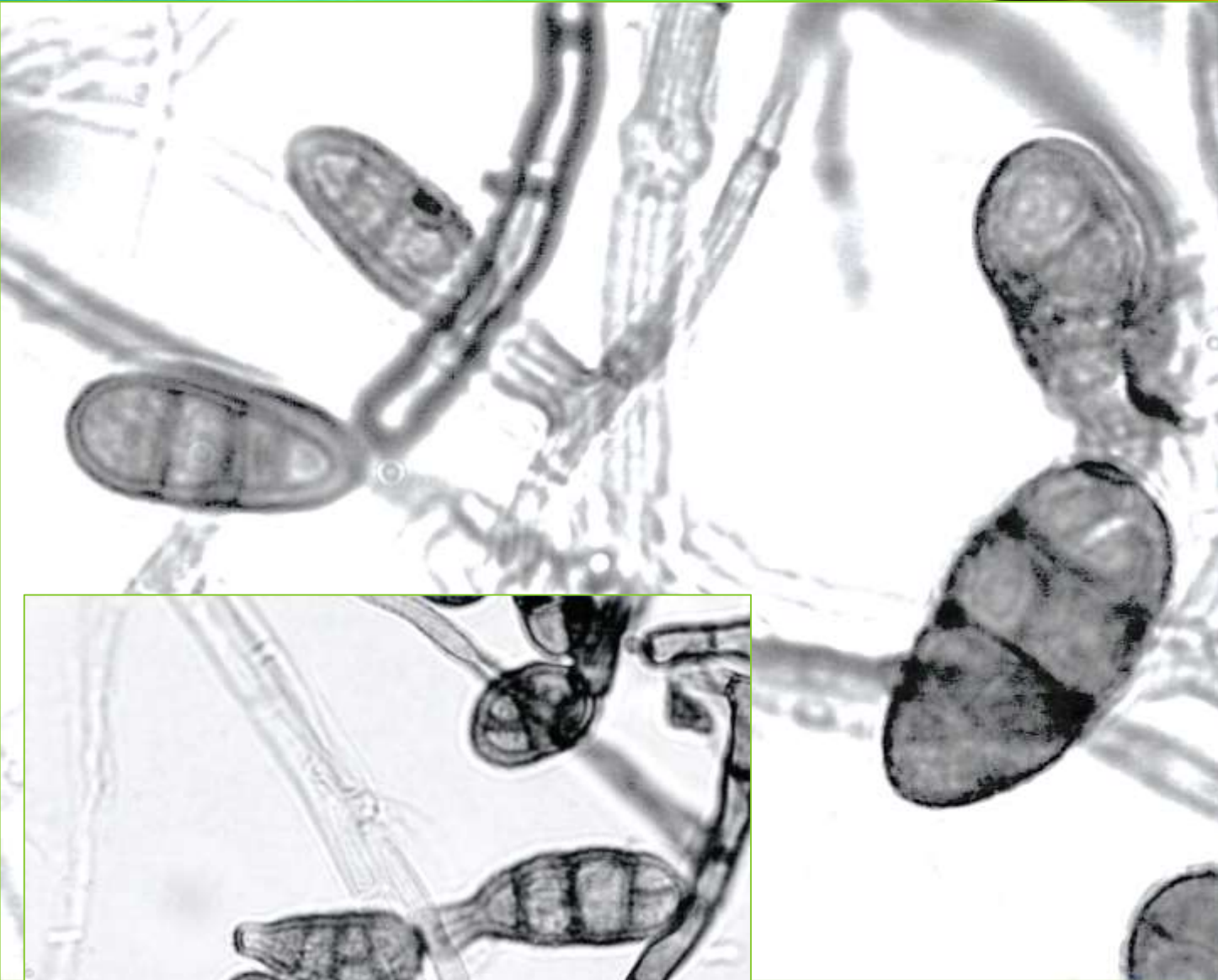
*Specie fungine parassita delle
piante*



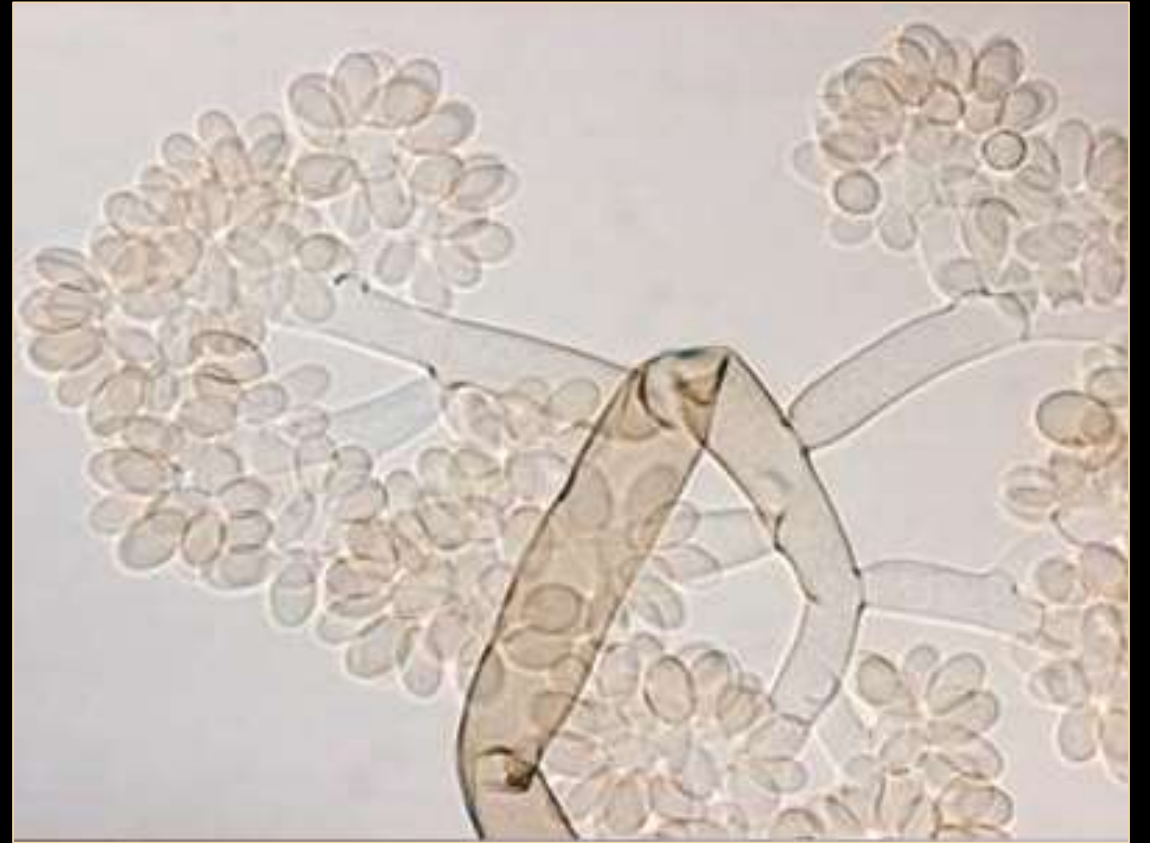


Alternaria spp

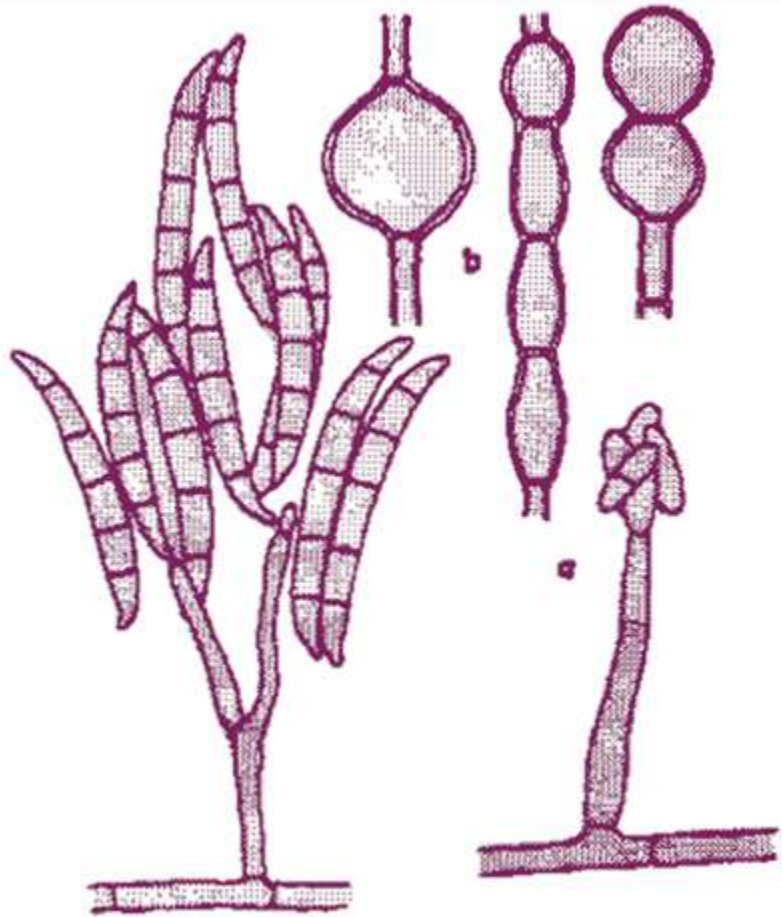
Micelio nero, rovescio nero.
Parassita delle piante



Botrytis spp



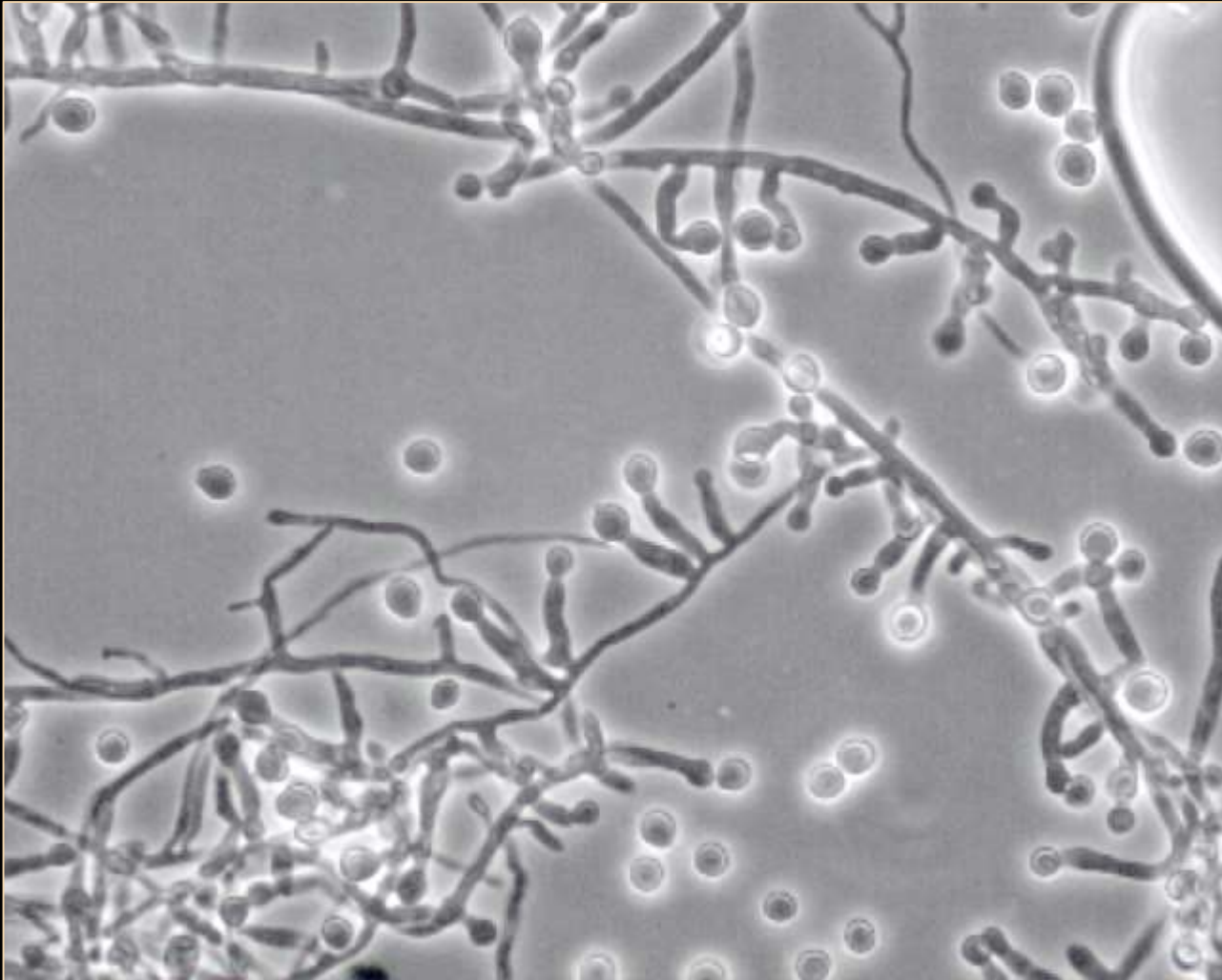
Fusarium spp



Fusarium



Scopulariopsis brevicaulis



Difetto: mancanza di sviluppo delle muffe.

Si verifica in formaggi che maturano troppo rapidamente o se presente una concentrazione di sale (NaCl) eccessiva oppure dovuto alla scarsità di spore di *Penicillium*.

L'attacco delle muffe sulla superficie esterna del formaggio avviene normalmente per inquinamento da spore di origine ambientale.

L'aria all'interno di un caseificio può arrivare a contenere in condizioni normali fino a 1.000 spore di muffe per metro cubo.

Quale l'origine?

Origine



Muffe di campo

INVASIONE STAGIONALE DI SPECIE CONTAMINANTI
PIANTE COLTIVATE, BOSCHI, PRATI

- Stagione
- Clima
- Zona geografica



Muffe di campo



Alternaria

Cladosporium

Fusarium



AMBIENTE ESTERNO

Mucor

Penicillium

Aspergillus



Muffe di stoccaggio

Presenti in ambienti di produzione,
stanze di stagionatura

Aspergillus

Cladosporium

Epicoccum

Scopulariopsis

Mucor, Rhizopus, Absidia

Paecilomyces

Trichoderma

VIE DI CONTAMINAZIONE FUNGINA DEI PRODOTTI ALIMENTARI NEGLI AMBIENTI DI TRASFORMAZIONE

Sistemi di filtrazione dell'aria

Ambiente interno (muri, soffitti,...)

Macchinari

Imballaggi

Personale

SISTEMI DI FILTRAZIONE DELL'ARIA



Possono accumulare miliardi di spore fungine
e disseminarle con il ricambio dell'aria

AMBIENTE INTERNO

- . Soffitti
- . Muri
- . Pareti
- . Piastrelle
- . Infrastrutture di legno o di altri materiali porosi

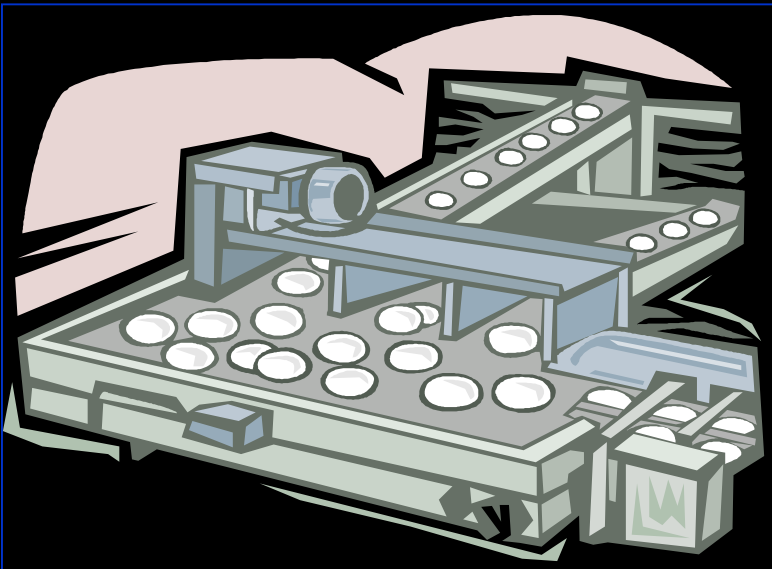


Cladosporium, Aspergillus, Mucor, Rhizopus

MACCHINARI

IMPIANTI DI CANALIZZAZIONE DELL'ACQUA, LATTE, YOGURT

Soprattutto a livelli di gomiti, bracci morti e congiunzioni diverse



Fusarium

Penicillium

Geotrichum

IMBALLAGGI

CARTA e CARTONE

ALLUMINIO

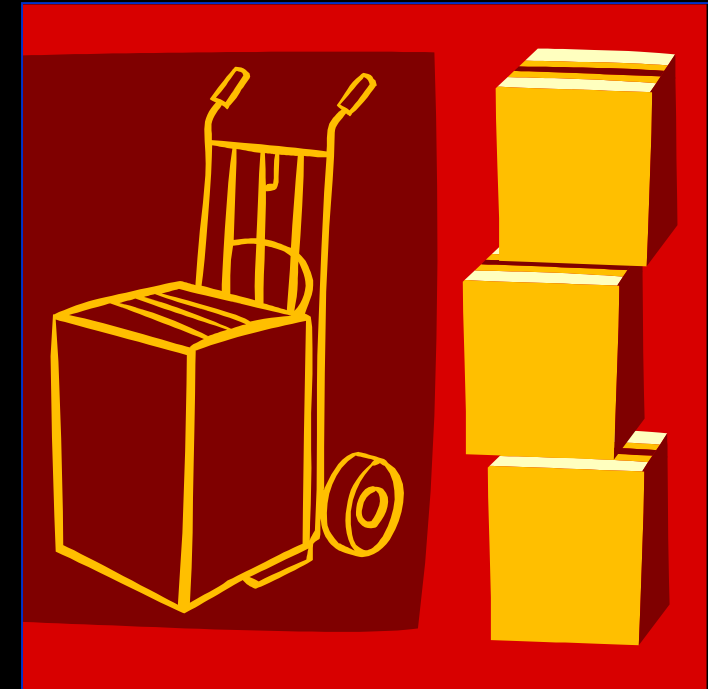
MATERIALE PLASTICO

TAPPI DI SUGHERO/PLASTICA

Cladosporium spp

Penicillium spp

Geotrichum spp



PERSONALE

Mani, abiti, scarpe,...





FORMAGGI ERBORINATI


FORMAGGI A CROSTA FIORITA E/O LAVATA

FORMAGGI ERBORINATI

«Erborin» prezzemolo

«Pâtes persillées» paste prezzemolate

Efflorescenze verdi bluastre, venate e diffuse nella pasta e/o in superficie

- 
- GORGONZOLA (ITALIA)
 - ROQUEFORT (FRANCIA)
 - BLUE STILTON (UK)
 - CABRALES (SPAGNA)
 - DANABLU (DANIMARCA)
 - BERGADER (GERMANIA)
 - ROKPOL (POLONIA)

Roquefort



Blue Stilton



Cabrales



Danablu



Bergader



Rokpol



FORMAGGI A CROSTA FIORITA E/O LAVATA

- CAMEMBERT
- BRIE
- THENAY
- TROYES
- VENDIME

Camemberti



Brie

Formaggio a crosta lavata

Taleggio



Penicillium nalgiovensis

Penicillium cyclopium W.

Geotrichum candidum

Mucor racemosus

Mucor hiemalis

Perché si utilizzano?

EFFETTI POSITIVI

- partecipano alla formazione del “fiore”,
se presenti sulla crosta
- contribuiscono all'aroma e al gusto
- producono sostanze antibiotiche

Formazione dell'aroma

Proteasi e lipasi fungine



ENZIMI PROTEOLITICI

Carbossipeptidasi: producono AA liberi, come citrullina e ornitina a partire dall'arginina.

Decarbossilasi: amine non volatili a partire da peptidi acidi amminobutirici a partire da acido glutammico

Ammoniaca

ENZIMI PROTEOLITICI

Produzione di acidi carbossilici a corta catena:
ac. acetico, butirrico, caprilico, caproico

Produzione di metilchetoni:

2-eptanone, 2-pentanone, 2 nonanone (derivati
dalla ossidazione enzimatica degli acidi carbossilici
di cui sopra)

ENZIMI PROTEOLITICI

Due differenti proteasi:

- acida, attiva sulla caseina con pH ottimale attorno a 5.0
- metalloproteasi con pH ottimale attorno a 6.0

ENZIMI LIPOLITICI

Promuovono una lipolisi molto intensa, a valori di pH tra 3,5 e 11,0, con attività elevata anche a temperature vicine allo 0°C.

Operano l'idrolisi di trigliceridi ad acidi grassi liberi e successiva formazione di β -chetoacidi e metilchetoni (2 eptanone, 2 nonanone, 2 undecanone).



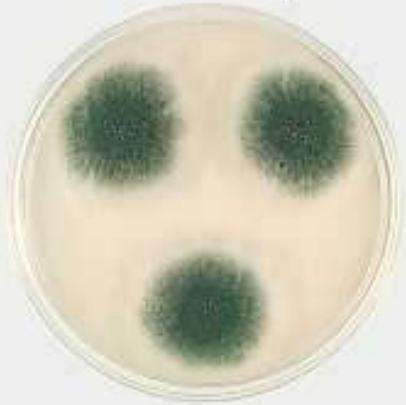
FORMAGGI ERBORINATI

Penicillium roqueforti

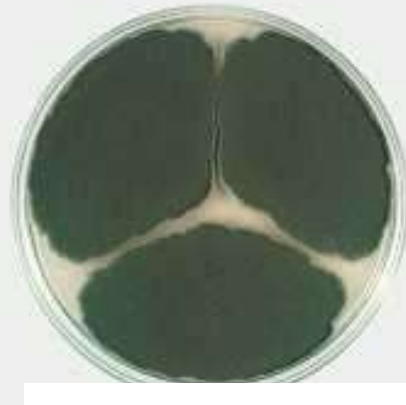
Penicillium roqueforti



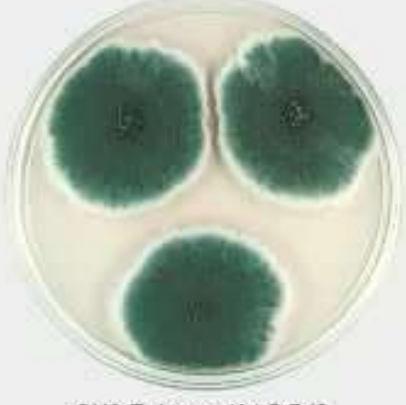
MA 7 days - CBS 221.30



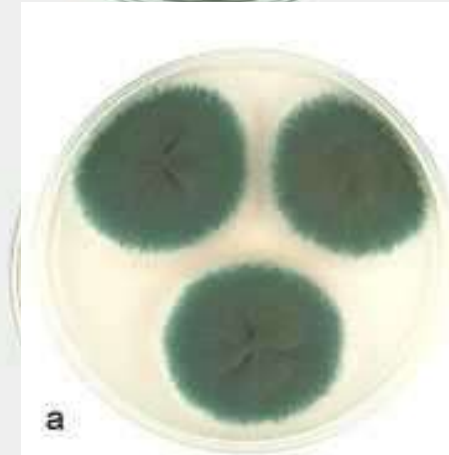
MA 7 days - KAS 540



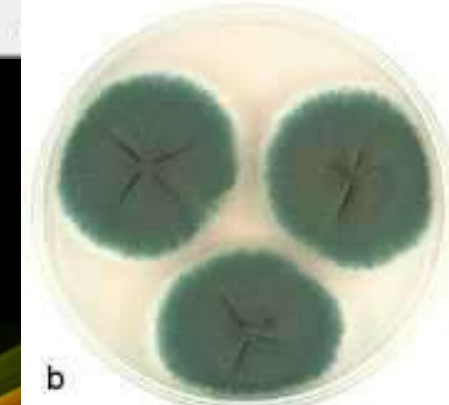
CYA 7 days - CBS 221.30



CYA 7 days - KAS 540

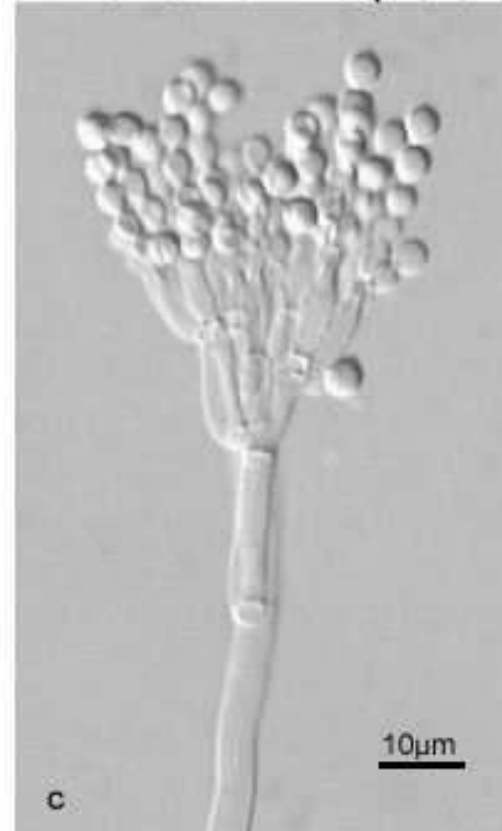


a

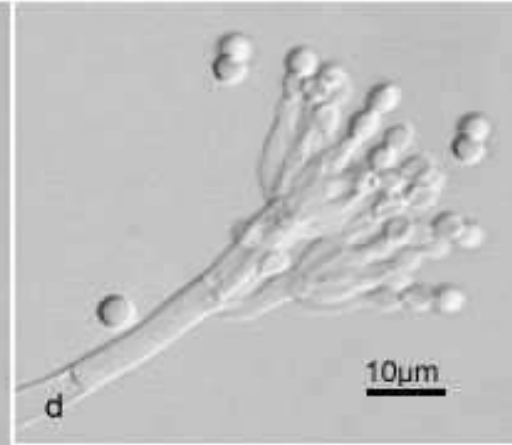


b

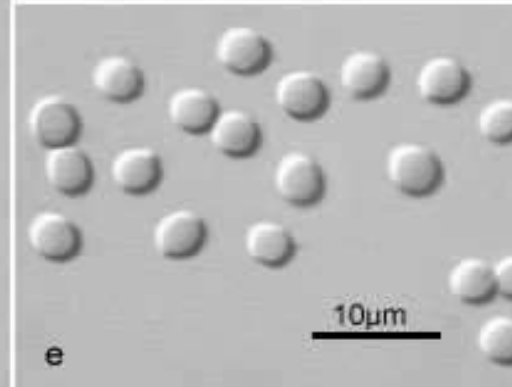
Penicillium roqueforti



c



d



e

(a) MA, 7 days; (b) CYA, 7 days; (c,d) conidiophore; (e) conidia. (a-e) CBS 221.30.

- ✓ Cresce in presenza del 5% di acido lattico
- ✓ Resiste al sale (NaCl) anche > 15%
- ✓ Si sviluppa anche con quantità modeste di ossigeno (75% di CO₂)
- ✓ Temperatura ottimale di crescita attorno ai 30°C ma anche < 10 °C
- ✓ pH ottimale vicino a 6,0 ma anche da 3 a 10,5

Molte delle attività sono ceppo-specifiche.

Le spore di *Penicillium roqueforti* vengono aggiunte al latte, con soluzioni di 1-2 miliardi di spore per hl latte.

Lo sviluppo fungino è condizionato strettamente dal grado di acidità della cagliata, dalla concentrazione del sale (NaCl), dalla temperatura e dall'umidità dell'ambiente.

Penicillium roqueforti si sviluppa a partire dal ventesimo giorno circa di maturazione (forature) e si intensifica sempre più fino a verso i 40-45 giorni di stagionatura.



Le spore fungine, all'interno della pasta, si sviluppano per:

- sviluppo di gas di origine batterica (fermenti lattici producono CO_2) che tengono la pasta «aperta» e aerata
- artificialmente e meccanicamente grazie alle forature con aghi

FORMAGGI A CROSTA FIORITA
E/O LAVATA

Penicillium camemberti

Formaggi bassi e piatti, a pasta molle, con elevata umidità, a maturazione centripeta, caratterizzati dall'insediamento ed esteso sviluppo superficiale di *Penicillium camemberti*

pH ottimale di crescita: tra 3,5 e 6,5

T° ottimale attorno ai 22°C

Alotollerante/alofilo


Intense attività enzimatiche

Le spore di *Pen. camemberti* vengono inoculate nel latte ed asperse sulla cagliata



Durante l'essiccazione l'acqua migra dall'interno del formaggio verso l'esterno.


Contemporaneamente, per effetto della lavorazione della pasta e dell'aerazione, lo strato superficiale si trasforma in crosta, riducendo la permeabilità.



La crosta è sede di attivi scambi idrici con l'ambiente esterno e rimane ricoperta da un velo liquido, sul quale facilmente le spore fungine si sviluppano.

Sviluppo microflora superficiale complesso:

- all'inizio della produzione, fermenti lattici mesofili (*S. lactis e cremoris*)
- all'inizio della maturazione, prima lieviti *Kluyveromyces*, *Saccaromyces*, *Debaryomices*
- Successivamente, *Geotrichum candidum*
- Dopo 6-7- gg, *Pen. camemberti*
- Dopo 15-20 gg, il Pen. ha consumato l'acido lattico e ha disacidificato la pasta, si sviluppa una flora aerobica di corinebatteri e micrococchi



Lo sviluppo di questa microflora e del *Penicillium* favorisce la neutralizzazione della pasta che si ammorbidisce in particolar modo nel sottocrosta, che diventa particolarmente morbido.

Infatti, si osserva una migrazione verso la superficie dei sali di Ca che favorisce un progressivo ammorbidimento della pasta.



DIFETTI

Ammuffimenti anomali
Macchie sulla crosta del
formaggio

CONTAMINAZIONE DELL'ARIA

QUANTE CE NE SONO?

Come le valuto?

INDICE GLOBALE DI CONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA
di un ambiente interno

IGCM =

UFC/batteri a 37°C + UFC/batteri a 20 °C + UFC/miceti a 20°C

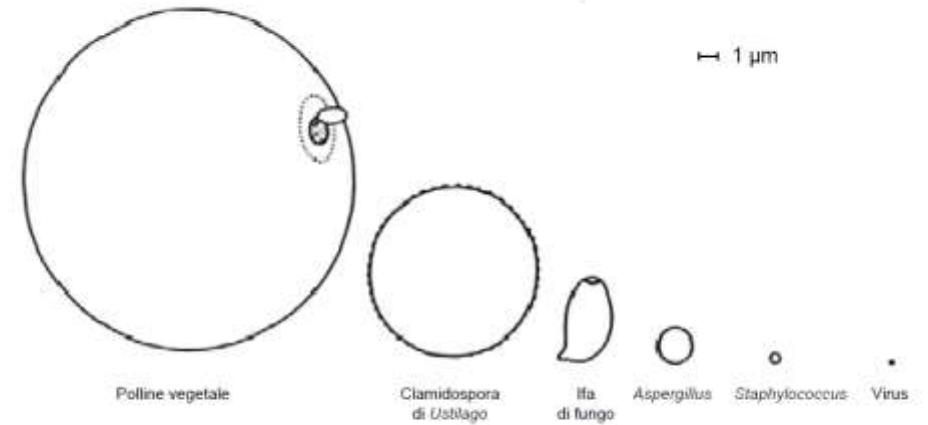


Figura 1. Principali specie di particelle di origine biologica e loro dimensioni

INDICE DI AMPLIFICAZIONE IA
permette di analizzare le differenze tra i livelli di
contaminazione esterni e quelli interni

$$IA = IGCM \text{ interno} / IGCM \text{ esterno}$$

**Tabella V. Indici di contaminazione microbica dell'aria
(Dacarro e collaboratori)**

Categoria	IGCM/m ³	Classe			
Molto bassa	< 500				
Bassa	< 1000				
Intermedia	> 1000	A:	IGCM > 1000	ICM < 3	IA < 3
		B:	IGCM > 1000	ICM > 3 o	IA > 3
		C:	IGCM > 1000	ICM > 3	IA > 3
Alta	> 5000	D:	IGCM > 5000	ICM < 3	IA < 3
		E:	IGCM > 5000	ICM > 3 o	IA > 3
		F:	IGCM > 5000	ICM > 3	IA > 3
Molto alta	> 10000	G:	IGCM > 10000	ICM < 3	IA < 3
		H:	IGCM > 10000	ICM > 3 o	IA > 3
		I:	IGCM > 10000	ICM > 3	IA > 3



Valori proposti dall'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH) per la carica micotica dell'aria indoor

Tabella III. Concentrazione fungina e qualità dell'aria indoor (ACGIH)

QUALITÀ ARIA INDOOR	CONCENTRAZIONE MICETI (UFC/m ³)
buona	<100
intermedia	100 - 1000
scadente	>1000

CONTAMINAZIONE DELL'ARIA


Standard di riferimento per la contaminazione nelle aree di lavoro di un caseificio (Mostert, J.F. et al, 2002).

	Soddisfacente	Insoddisfacente
Batteri	< 200 CFU/m ³	> 2.000 CFU/m ³
Muffe	< 100 CFU/m ³	> 1.000 CFU/m ³
Lieviti	< 100 CFU/m ³	> 1.000 CFU/m ³

CONTAMINAZIONE DELL'ARIA

Aree critiche	Conta batterica totale (CFU/m ³)		Lieviti e muffe (CFU/m ³)	
	soddisfacente	insoddisfacente	soddisfacente	insoddisfacente
Latte e panna fermentati, formaggio a fiocchi	<150	>1.500	<50	>1.000
Latte e panna	<150	>1.500	<50	>1.000
burro	<100	>1.000	<50	>1.000
Latte in polvere	<200	>2.000	<100	>1.000
Stagionatura di formaggi	<200	>2.000	<100	>1.000

Standard di riferimento (Mostert, J.F. et al, 2002)



Come elimino le
specie fungine
critiche in un
caseificio?

BIO-COMPETIZIONE

Biocompetizione miceti-miceti

Penicillium: Acido penicillico e penicillina

Sono antibiotici



Biocompetizione miceti-batteri

Miceti - Lattobacilli

LACTOBACILLUS PLANTARUM

17 ceppi *L. plantarum* testati

9 hanno inibito lo sviluppo di *A. niger*

12 lo sviluppo di *A. flavus*

4 lo sviluppo di *P. roqueforti*

A. flavus



A. niger



Pen. roqueforti



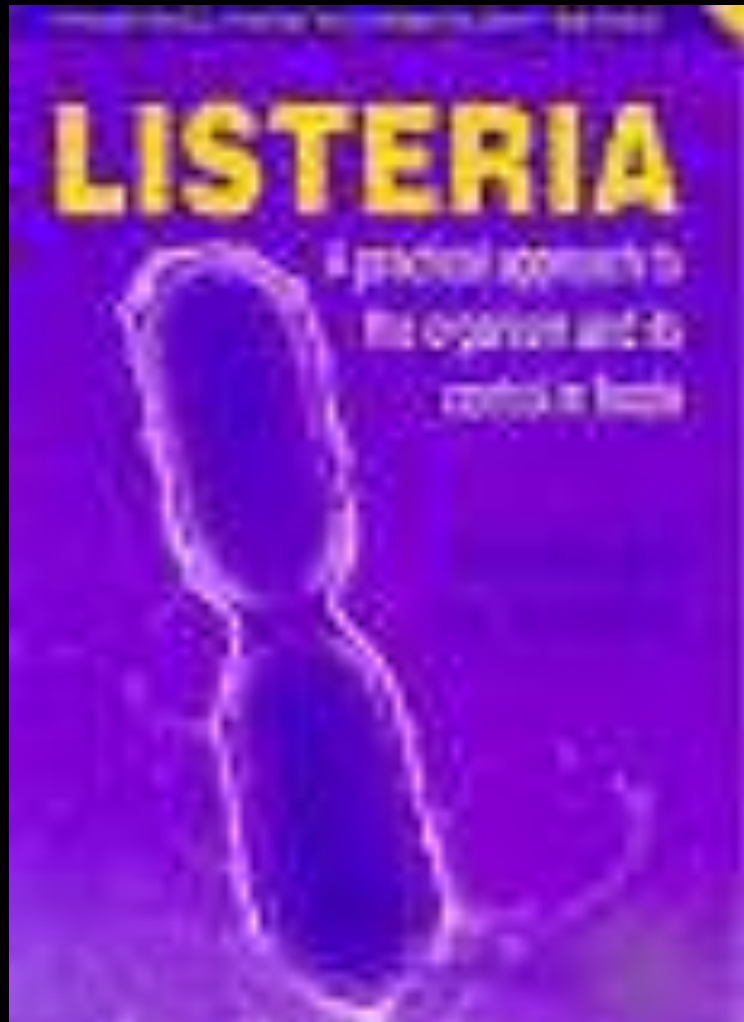
LACTOBACILLUS HELVETICUS

A. niger



A. flavus





ATTIVITA'
INIBITORIA NEI
CONFRONTI DI
CEPPI DI
*Listeria
monocytogenes*


Allestiti filtrati colturali di *Penicillium roqueforti*

Prova di diffusione in agar con dischetti

25 °C per 48 h

Valutati gli aloni di inibizione

La crescita di *Listeria monocytogenes* è stata sensibilmente inibita
dai ceppi fungini

The image is a composite of two microscopic views of bacterial colonies. The top portion shows a dense, pinkish-purple mass of cells, likely a bacterial colony, with some individual cells visible. The bottom portion shows a more detailed view of the cells, which are elongated and arranged in chains or clusters. The overall appearance is that of a bacterial culture that has lost its motility and is forming a biofilm or a similar structure.

Osservazione al microscopio delle colonie:

- limitata crescita
- cellule allungate e perdita della mobilità

A microscopic view of a mold colony, showing various colored spots and structures. The background is dark, and the mold appears as lighter, textured areas with some distinct spots of color like green, yellow, and purple.

FLORA FUNGINA CRITICA

Produzione di metaboliti tossici
da parte di specie fungine potenzialmente
tossinogene

SPECIE FUNGINA POTENZIALMENTE TOSSINOGENA:

specie alla quale appartiene un numero indefinito di ceppi fungini capaci di elaborare uno o più metaboliti tossici, in determinate condizioni e su specifici substrati

Il potenziale tossinogeno può essere quantitativamente molto variabile da ceppo a ceppo della stessa specie

MICOTOSSINE

Metaboliti secondari, prodotti da muffe in risposta a fattori esterni stressogeni, in genere durante la fine della fase di crescita esponenziale del fungo ed è favorita dai parametri di:

- Umidità ambientale 80-90%
- Temperatura 25-30 °C
- $A_w > 0,85$

MICOTOSSINE

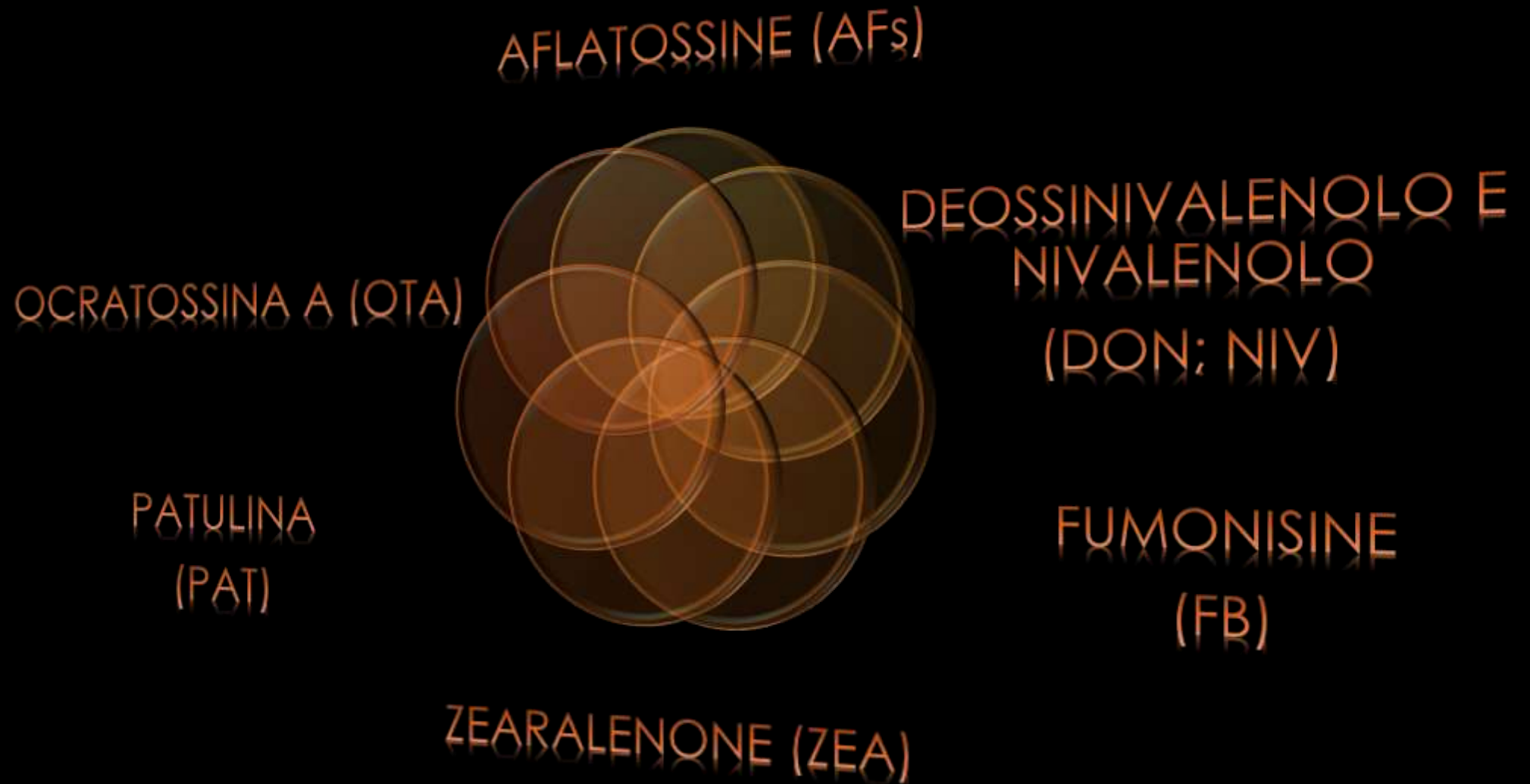
Sono un eterogeneo gruppo di molecole con basso peso molecolare ed elevata stabilità

Quante sono?

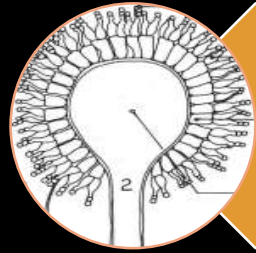
Antibase2014 ne descrive circa 18.000, di cui «solo» 300 sono state completamente caratterizzate chimicamente.

Un gruppo ristretto interessa la sicurezza degli alimenti e del consumatore.

Le micotossine che rivestono la maggiore rilevanza sanitaria per il riconosciuto ruolo patogenetico nell'uomo e negli animali sono:



Prodotte da:



Aspergillus flavus e parasiticus



Aspergillus ochraceus



Fusarium spp

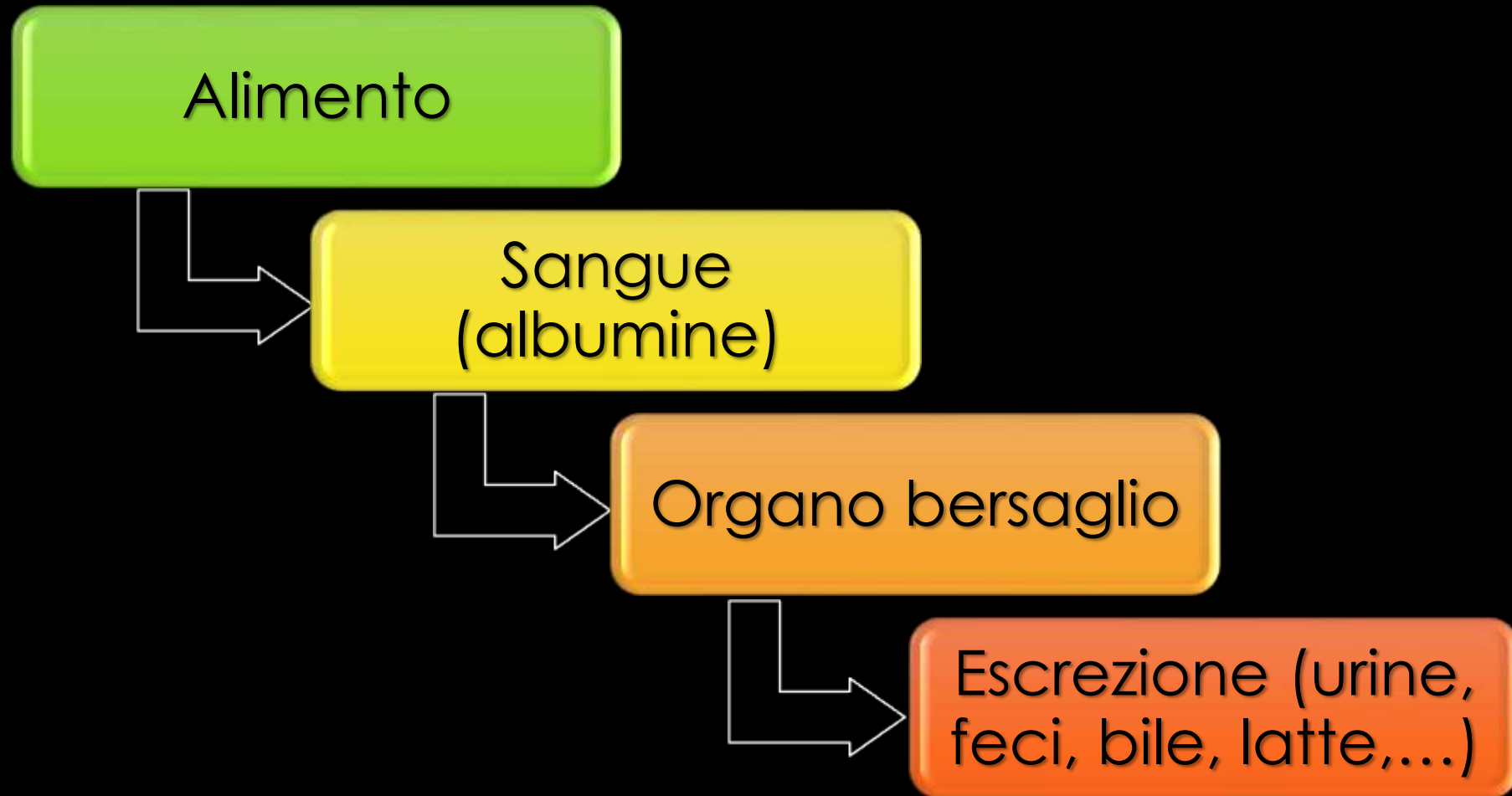


Penicillium expansum



MECCANISMO D'AZIONE

IN GENERALE....



In quali alimenti:

Frutta
secca

Spezie

Vino, birra

Semi oleaginosi
(no olii raffinati)

Salumi e prodotti a
base di carne e
sangue di maiale
(sanguinaccio)

Cereali

Mangimi

Farine

Prodotti da forno

Latte

Yogurt

Formaggi, freschi e a lunga
stagionatura

Cacao

Cioccolato

Prodotti a base di cacao

Uova

Ovoprodotti

Succhi di frutta

AFLATOSSINE

20 MOLECOLE, tra le più studiate

Organo bersaglio: fegato

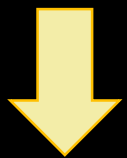
Effetto: carcinoma epatico

AFB₁ Iarc Classe I = cancerogena per l'uomo; anche genotossica per cui non è possibile stabilire una soglia massima di assunzione con la dieta ma è necessario mantenere il livello di esposizione "As low as reasonable achievable - ALARA".

AFLATOSSINA B₁



AFLATOSSINA M₁ (milk)



LATTE

E' ottenuta per detossificazione epatica operata dal citocromo P450 sia nell'uomo sia negli animali in fase di lattazione



AFM₁ Iarc Classe 2b = probabilmente cancerogena per l'uomo.



INDICE DI CONVERSIONE

$(B_1 \longrightarrow M_1)$

0,2 – 3 %

6 %

Ci si può attendere che tutti i derivati da latte contaminato contengano Aflatossina M_1 seppure in proporzione diversa in relazione alle tecniche di trasformazione.

Nel formaggio la sua concentrazione può essere da 3 a 5 volte maggiore per effetto della perdita di acqua durante lo spurgo della cagliata nella caseificazione



- pastorizzazione
- stoccaggio a 4 °C
- sterilizzazione a 120 °C x 15-20'
- stoccaggio a - 18 °C
- fusione a 90 °C





UE Reg. n. 1525/98

Limiti M_1 nel latte :

50 ng/Kg (50 ppt)

“...è imperativo evitarne la presenza nel latte e nei prodotti lattieri destinati al consumo umano e particolarmente all'alimentazione della prima infanzia...”

Acido ciclopiazonico

Acido micofenolico

Acido penicillico

Roquefortina C

PR tossina

Penicillina

Verrucosidina

Citrinina

Sterigmatocistina

Metaboliti
secondari
prodotti
da *Penicillium*
roqueforti

EFSA

Micotossine emergenti

“mycotoxins, which are neither routinely determined, nor legislatively regulated; however, the evidence of their incidence is rapidly increasing”



ACIDO MICOFENOLICO

Prodotto da diverse specie di *Penicillium* fra cui *Pen. roqueforti*.

Ha attività antibiotica nei confronti di molti batteri.

E' stata segnalata, però, una sua attività mutagena.

Ma quale è l'effettivo rischio
per un consumatore?

Quante tossine assumiamo con la dieta?



Piano nazionale di controllo ufficiale Ministero della Salute

2794 CAMPIONI: 2% (PARI A 56 CAMPIONI) È RISULTATO NON
CONFORME AI LIMITI MASSIMI DEFINITI NEL
REG. (CE) 1881/2006 PER LA SPECIFICA MICOTOSSINA



**Piano nazionale di controllo ufficiale delle micotossine negli
alimenti**

Anni 2016-2018

MICOTOSSINE

AF B₁ E M₁, OTA, PATULINA,
DEOSSINIVALENOLO, FUMONISINE,
ZEARALENONE

Alimenti lattanti e
prima infanzia

157 campioni

0 N.C.

AFLATOSSINA M₁

396 campioni

1 n.c.

Latte

Prodotti lattiero-caseari

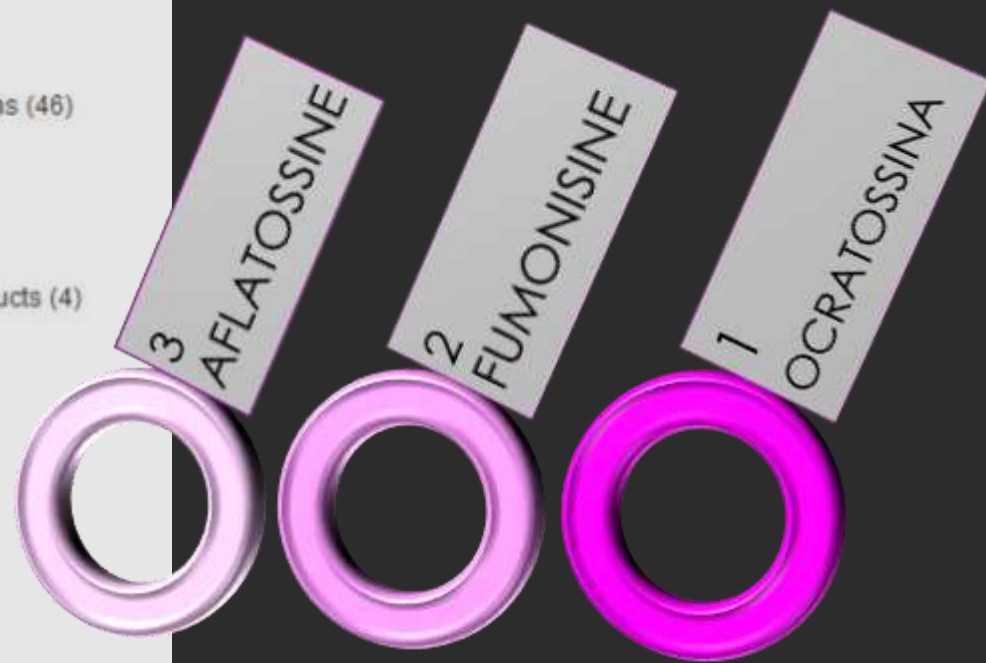
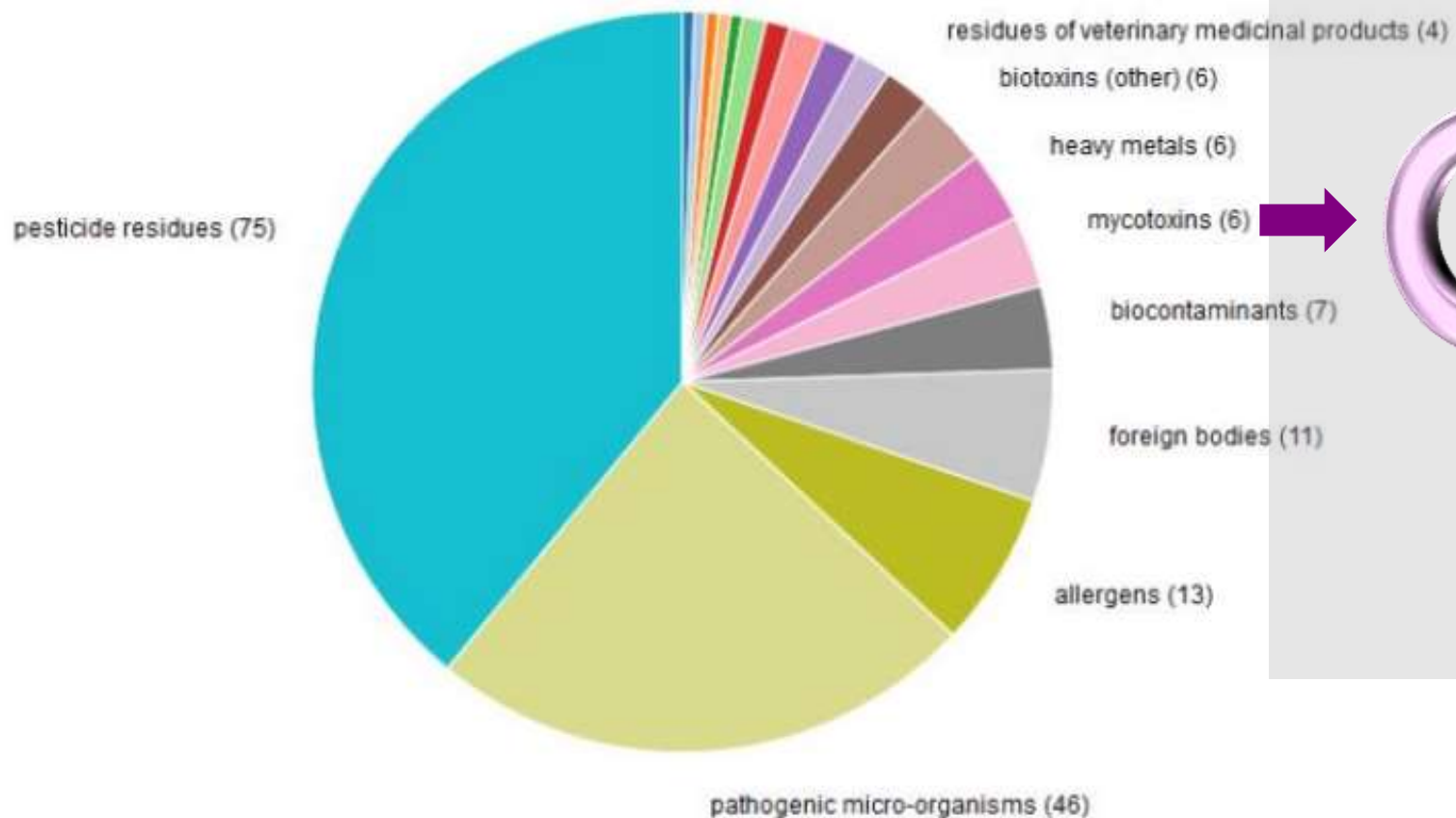
mozzarella, burro, formaggio, yogurt, ricotta di bufalo, preparati per gelati a base di latte, preparazioni a base di latte per la prima infanzia

761 campioni

47 n.c.

Figura 13 - Tipologia del rischio dei prodotti di origine italiana trasmessi in RASFF - anno 2017

- adulteration / fraud (1)
- GMO / novel food (1)
- poor or insufficient controls (2)
- packaging defective / incorrect (3)
- heavy metals (6)
- foreign bodies (11)
- pesticide residues (75)
- chemical contamination (other) (1)
- TSEs (1)
- migration (3)
- residues of veterinary medicinal products (4)
- mycotoxins (6)
- allergens (13)
- food additives and flavourings (1)
- composition (2)
- non-pathogenic micro-organisms (3)
- biotoxins (other) (6)
- biocontaminants (7)
- pathogenic micro-organisms (46)



RASFF 2017

II RISCHIO micotossine

nel piatto

può essere evitato

dalla prevenzione delle
contaminazioni fungine

nel campo



lisa.vallone@unimi.it