

# PRESENZA DI MUFFE NELLA FILIERA PRODUTTIVA DELLE PASTE FARCITE, CON PARTICOLARE RIFERIMENTO AL GENERE *PENICILLIUM*

## *Presence of fungal contamination in the production chain of fresh filled pasta, with particular regard to the penicillium genus*

Lomonaco S.<sup>1</sup>, Grassi M. A.<sup>1</sup>, Vallone L.<sup>2</sup>, Pistone V.<sup>3</sup>, Civera T.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Patologia animale, Grugliasco (TO)

<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Milano

<sup>3</sup>ASL TO3- Azienda Sanitaria Locale di Collegno e di Pinerolo – Sc Servizio Veterinario - Igiene della produzione degli alimenti di origine animale

### SUMMARY

A shelf-life study was carried out on fresh filled pasta in order to evaluate the presence of fungal contamination in the production process (environment, raw materials and finished products), with particular regard to the *Penicillium* genus. Analyses were conducted on three types of products, while air sampling was carried out in shaping processes and packaging areas. After isolation of molds, phenotypic identification of *Penicillium* genus and genotyping confirmation were carried out. As for the isolated strains, the species identified are those expected from this type of matrix: 40.7% *P. viridicatum*, 14.8% *P. griseofulvum*, 11.1% *P. chrysogenum*, 7.4% for *P. citrinum*, *P. nalgiovense* and *P. crustosum* and finally 3.7% for each of the three remaining species (*P. roqueforti*, *P. formosanum*, *P. atramentosum*). Results showed environmental contamination, particularly at the end of the work day. In fact, 59% of identified *Penicillia* originated from air samples, while only 10% from foods. Moreover, even if fungal contamination was observed at all considered times, level of contamination were generally low and never resulted in spoilage of the product as no macroscopically visible colonies were observed. It is therefore clear that pasteurization and modified atmosphere packaging are able to control the growth of potentially present fungal contamination.

### KEYWORDS

Fresh filled pasta, fungal contamination, *Penicillium* genus, sequencing.

### INTRODUZIONE

Le paste fresche farcite sono state per lungo tempo legate al commercio locale e destinate ad un consumo quasi immediato data la loro deteriorabilità. Recentemente lo sviluppo di tecnologie alimentari innovative ha permesso di introdurre una produzione di tipo industriale, ponendo sul mercato due tipologie di prodotti: la pasta fresca artigianale e quella industriale.

Secondo il D.P.R. 187 del 2001 (1), le paste alimentari fresche confezionate devono possedere dei requisiti specifici, quali i) un tenore di umidità superiore al 24%, ii) un Aw compresa tra 0,92 e 0,97, iii) essere state sottoposte ad un

trattamento termico equivalente almeno alla pastorizzazione e iv) essere conservate, dalla produzione alla vendita, a temperatura inferiore ai +4°C, con una tolleranza di 2°C.

Nel processo produttivo delle paste farcite le potenziali criticità sono rappresentate da non corretta gestione ed applicazione delle GMP e GHP: particolarmente a rischio risulta essere la fase di preparazione del ripieno, in quanto i tempi di preparazione e sosta a temperatura ambientale risultano spesso troppo lunghi (2).

Nell'ambito di un progetto di studio di shelf-life per alcune tipologie di paste farcite fresche, si è voluta effettuare una indagine mirata alla valutazione della presenza di specie fungine nella filiera produttiva (ambienti, materie prime e

prodotti finiti). L'attenzione è stata focalizzata in particolare sul genere *Penicillium*, in considerazione della presenza all'interno di questo genere di molte specie dotate di spiccata attività tossigenica e capacità adattative. Le specie di questo subgenere includono molti microrganismi con azione negativa (alteranti per gli alimenti, produttori di micotossine o patogeni per i vegetali); ma anche microrganismi utili in quanto produttori di antibiotici o utilizzati come starter nella produzione di formaggio (3). Inoltre, al subgenere *Penicillium* vengono ascritte le specie che più frequentemente contaminano le derrate alimentari sia in campo sia durante la conservazione (4).

## MATERIALI E METODI

Le analisi sono state condotte su tre tipologie di paste fresche, confezionate in vaschette da 250 grammi in atmosfera protettiva (50% azoto - 50% anidride carbonica) costituite da Agnolotti Piemontesi, Agnolotti del Plin, Panzerotti di magro: le caratteristiche compositive principali sono riportate in Tabella 1. Il confezionamento prevedeva l'impiego di film plastico ad alta barriera e una doppia termosaldatura della confezione. Il processo di pastorizzazione della pasta ripiena veniva monitorato con impiego di una termosonda, garantendo il mantenimento di una temperatura al cuore superiore a 70°C per 2 minuti (picco 80°C per 15 secondi). Per ciascun prodotto sono stati analizzati due lotti, composti ognuno da 60 confezioni, che sono state stoccate a due temperature di conservazione (+4°C e +8°C) ed analizzate a cadenza periodica (1, 7, 14, 21, 28 giorni dal confezionamento). La shelf-life individuata dal produttore è di 28 giorni. Per la ricerca e conteggio delle muffe si sono analizzati 20 gr di campione secondo procedure interne validate, basate sul metodo ISO 21527-1:2008 (5). Dopo l'aggiunta di 180 ml di fisiologica e l'omogeneizzazione del campione, sono state allestite diluizioni scalari poi seminate su Oxytetracycline Glucose Yeast Extract (OGYE) Agar (Sifin) e le piastre successivamente incubate a 25°C per 72 ore. Per la valutazione della contaminazione fungina dell'aria nei locali di lavorazione si è utilizzato il SAS (Surface Air System – PBI), scegliendo due punti di reperi (area preparazione sfoglia e area confezionamento). I prelievi sono stati eseguiti nel corso di dodici giornate lavorative, all'inizio e al termine della giornata lavorativa. Si sottolinea che l'ambiente di lavorazione (preparazione sfoglia – riempimento – pastorizzazione - confezionamento) è costituito da un unico padiglione. Il SAS è stato impostato sul livello 3 (180 litri di aria aspirata/minuto). Le piastre Rodac, allestite con terreno OGYE Agar (Sifin), sono state

poste ad incubare come precedentemente descritto. Da ogni piastra si è proceduto ad isolare colonie fungine per sottoporle ad identificazione fenotipica su terreni Malto 2% (M<sub>2</sub>) e Malto salato (M<sub>5</sub>S<sub>5</sub>) ed osservazione macro e microscopica dopo incubazione a 25°C per 5-7 giorni. Le caratteristiche macroscopiche prese in considerazione sono state diametro della colonia dopo 5gg e sviluppo nel tempo, aspetto e colore superficiale, colore del rovescio della colonia e osservazione a microscopio ottico/stereoscopio. Le analisi e le osservazioni effettuate sono state basate su quanto indicato da Dragoni et al. 1997 (6).

Tutti i campioni riconducibili fenotipicamente al genere *Penicillium* sono stati sottoposti ad analisi biomolecolari. Il DNA è stato estratto utilizzando l'UltraClean® Microbial DNA Isolation Kit (MoBio) e quantificato mediante NanoDrop (Thermo Scientific). Per la conferma di appartenenza al genere *Penicillium* è stata condotta una PCR, utilizzando i primers PENF1 e ASPR1 in grado di amplificare un frammento di 545bp del gene citocromo ossidasi 1 (*COI*) (3). La PCR è stata eseguita in un volume di 25µl contenente Buffer 1X, 2.7mM di MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM di dNTPs, 0.3 µM per ogni primer, 0.7U di Taq polimerasi (Invitrogen) e 10-40 ng di DNA. Le condizioni di amplificazioni hanno previsto una denaturazione iniziale di 3 min a 95°C; 35 cicli (60s a 95°, 45s a 56°C, 90s a 72°C); e una estensione finale di 10 min a 72°C. Il sequenziamento è stato effettuato presso il BMR Genomics di Padova e le sequenze ottenute sono state analizzate con il software Mega 5.0 (7), e confrontate con il database di GenBank.

## RISULTATI

Il conteggio delle muffe dalle paste farcite è stato generalmente inferiore a 100 ufc/g specialmente nei primi giorni di vita commerciali. In particolare, per i Panzerotti di magro la carica si è attestata su valori sempre inferiori a 10<sup>2</sup> ufc/g sia a 4°C che a 8°C. Una situazione simile è stata osservata negli Agnolotti del Plin con cariche generalmente inferiori a 10<sup>2</sup> ufc/g e due confezioni (una a 4°C ed una a 8°C) al 21° gg con cariche leggermente più elevate ma comunque inferiori a 10<sup>3</sup> ufc/g. Infine, per quanto riguarda gli Agnolotti Piemontesi, non è mai stato superato il valore di 10<sup>2</sup> ufc/g. In nessuna confezione si è reperito ammuffimento visibile ad occhio nudo.

Per quanto riguarda le materie prime, solo due campioni hanno superato il valore di 100 ufc/g: il grana padano ed un ripieno di verdure.

I prelievi dell'aria hanno evidenziato una contaminazione più elevata nell'area di preparazione della sfoglia rispetto all'area confeziona-

mento, e per entrambe le zone la contaminazione era maggiore al termine della giornata di lavoro: i risultati sono schematizzati nella Tabella 2.

La valutazione fenotipica ha permesso di identificare il genere in 68 isolati: il 39.7% era rappresentato da muffe del genere *Penicillium*, il 36.7% dal genere *Aspergillus*, l'8.8% dal genere *Cladosporium*, il 5.9% da *Mucor*, il 4.4% da *Micelia sterilia* e il restante 4.4% da altri generi.

I 27 campioni identificati come *Penicillium*, testati in PCR, hanno fornito tutti l'amplificato specifico. Il successivo sequenziamento ha permesso di identificare le seguenti specie: 40.7% *P. viridicatum*, 14.8% *P. griseofulvum*, 11.1% *P. chrysogenum*, 7.4% rispettivamente per *P. citrinum*, *P. nalgiovense* e *P. crustosum* ed infine 3.7% per ognuna delle 3 rimanenti specie (*P. roqueforti*, *P. formosanum*, *P. atramentosum*) (Tabella 3).

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La contaminazione fungina delle paste fresche farcite rappresenta un fattore igienico-sanitario da porre sotto stretto controllo nel processo produttivo, al fine di evitare la comparsa, durante la fase di commercializzazione, di alterazioni macroscopiche che rendono l'alimento inidoneo al consumo. Al fine di prevenire tale rischio, gli operatori intervengono principalmente sulla riduzione della contaminazione delle materie prime e il controllo del processo produttivo, sulla pastorizzazione, sul confezionamento e sulla temperatura di conservazione e distribuzione (8).

In questo lavoro, pur avendo evidenziato gli esami di laboratorio la presenza di muffe in tutti i momenti considerati, queste non hanno mai compromesso l'idoneità del prodotto con comparsa di colonie macroscopicamente evidenti. È quindi chiaro come la pastorizzazione e il confezionamento in atmosfera protettiva, unitamente ai film ad alta densità impiegati e alla doppia saldatura, siano in grado di tenere sotto controllo la popolazione presente.

Per quanto riguarda i ceppi isolati, occorre sottolineare che il 59% originano da prelievi dell'aria, mentre solo il 10% dalla pasta ripiena. La maggiore contaminazione dell'aria è legata proprio al genere *Penicillium*: infatti il 70% degli isolati proveniva dall'ambiente, indicando come questa fonte di contaminazione possa rappresentare un problema da tenere in considerazione, anche per quanto riguarda la programmazione degli interventi di sanificazione. La specie maggiormente presente risulta il *P. viridicatum* isolato da entrambe le zone e i momenti di prelievo; a seguire *P. griseofulvum* e *P.*

*chrysogenum* (distribuiti in entrambe le aree di prelievo) e *P. nalgiovense*, nella sola area confezionamento.

Nei processi produttivi da noi esaminati è stato osservato come 3 specie fossero presenti solo nel prodotto finito (*P. roqueforti*, *P. citrinum* e *P. formosanum*) e 2 specie (*P. chrysogenum* e *P. viridicatum*) siano invece state isolate sia nel prodotto finito che a livello ambientale (in pre- e post-operativo).

In generale, le specie identificate sono quelle che ci si poteva attendere da questo tipo di matrice; infatti *P. viridicatum*, *P. chrysogenum*, *P. griseofulvum*, *P. crustosum* e *P. citrinum* sono stati isolati molto spesso da cereali e matrici quali: grano, mais, riso e orzo (4). *P. viridicatum*, in particolare, è stato anche isolato frequentemente da carni, frutta secca, spezie e pasta (8). Strettamente correlato a *P. chrysogenum* è *P. nalgiovense* che è però impiegato principalmente in Europa come coltura starter nella produzione di prodotti carnei fermentati (4). *P. roqueforti*, sebbene conosciuto principalmente per il suo impiego nella produzione di Gorgonzola DOP, è in realtà una muffa alterante molto diffusa a livello ambientale. L'abilità di crescere a temperature di refrigerazione lo rende un causa comune di deterioramento in alimenti conservati a temperatura di refrigerazione (4). Interessante il ritrovamento di *P. crustosum* in quanto tutti i ceppi di questa specie producono ad alti livelli una potente neurotossina, recentemente associata a sindrome del tremore nell'uomo (4). La presenza di questa specie in ambienti di produzione di alimenti potrebbe quindi rappresentare un rischio sia per un eventuale trasmissione agli alimenti o per la salute dell'operatore. E' da notare come comunque non sia mai stato riscontrato negli alimenti o materie prime (4).

La ricerca di *Penicillium* spp. a livello ambientale o all'interno di substrati specifici può avvenire mediante terreni colturali, ma la scelta del terreno per l'isolamento del genere può rivelarsi difficoltosa in quanto è molto complicato scegliere quello più adatto per evidenziare tutte le specie presenti nella matrice considerata, senza privilegiarne qualcuna in particolare. Inoltre, la notevole variabilità morfologica che caratterizza il genere *Penicillium* e i pochi caratteri sui quali si basa la differenziazione tra le specie, possono rendere l'identificazione morfologica particolarmente complessa e molti lavori non identificano i *Penicillia* a livello di specie (4). Assume quindi notevole interesse l'applicazione di tecniche molecolari che permettano di superare i problemi legati all'identificazione di *Penicillium* (4): nel presente studio l'identificazione morfologica del genere, seguita dalla PCR genere-

specifica (3) e successivo sequenziamento hanno permesso di identificare, con alta percentuale di omologia rispetto alle sequenze depositate, tutti i *Penicillium* isolati nel corso della presente indagine, con tempi e costi oggi compatibili con le necessità di un'azienda del settore, che intenda investire per migliorare le conoscenze e il controllo di questi importanti agenti di alterazione.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Decreto del Presidente della Repubblica 9 febbraio 2001, n.187. Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e paste alimentari, a norma dell'articolo 50 della legge 22 febbraio 1994, n. 146. G.U. n. 117 del 22 maggio 2001.
2. Rossi A., Febbaro F., Tombolini B., Cenni C. (2005). "Problematiche igienico-sanitarie delle paste alimentari fresche". *Tecnica Molitoria Maggio*, 465-472.
3. Seifert K. A., Samson R. A., deWaard J. R., Houbraken J., Lévesque C. A., Moncalvo J., Louis-Seize G., Hebert P. D. N. (2007). "Prospects for Fungus Identification Using CO1 DNA Barcodes, with *Penicillium* as a Test Case" *PNAS*, 104, 3901-3906.
4. Pitt J.I., Hocking A.D. (2009). "Fungi and Food Spoilage". Springer Science + Business Media, LLC.
5. ISO 21527-1:2008. 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 1: Colony count technique in

products with water activity greater than 0,95.

6. Dragoni I., Vallone L., Papa A., Cantoni C. (1997). "Muffe, alimenti e micotossicosi". Città Studi.
7. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.
8. Zardetto S. (2005). Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh filled pasta. *Food Microbiology*, 22, 367-371.

**Tabella 1.** Principali caratteristiche compositive dei prodotti esaminati.

Agnolotti Piemontesi	Pasta: semola di grano duro, farina di grano tenero tipo 00, uova, acqua Ripieno (50%):carne di bovino e suino, mortadella, pangrattato, bieta, grana padano, sale, vino, burro, cipolla, aglio, rosmarino
Panzerotti di magro	Pasta: semola di grano duro, farina di grano tenero tipo 00, uova, acqua Ripieno (60%): ricotta fresca, spinaci, pane grattugiato, sale, noce moscata, pepe
Agnolotti del Plin	Pasta: semola di grano duro, farina di grano tenero tipo 00, uova, acqua Ripieno:carne bovina, carne suina, grana Padano, bieta, pangrattato, sale, rosmarino.

**Tabella 2.** Risultati dei prelievi ambientali effettuati con SAS nelle zone di impasto e confezionamento. Tutti i valori sono espressi in ufc/m<sup>3</sup>.

		Min	Max	Media	Mediana
Zona Impasto	Pre-operativo	33	340	154	110
	Post-operativo	33	1000	418	673
Zona confezionamento	Pre-operativo	10	380	115	55.5
	Post-operativo	50	600	238	250

**Tabella 3.** Identificazione delle muffe appartenenti al genere *Penicillium*.

ID	Campione	Prelievo effettuato in:	Identificazione genotipica
1	SAS – Conf.	Post-operativo	<i>P. chrysogenum</i>
2	SAS – Conf.	Post-operativo	<i>P. viridicatum</i>
3	SAS – Conf.	Pre-operativo	<i>P. viridicatum</i>
4	SAS – Conf.	Pre-operativo	<i>P. griseofulvum</i>
5	SAS – Conf.	Pre-operativo	<i>P. viridicatum</i>
6	SAS – Conf.	Pre-operativo	<i>P. viridicatum</i>
7	SAS – Conf.	Pre-operativo	<i>P. viridicatum</i>
8	SAS – Conf.	Pre-operativo	<i>P. viridicatum</i>

9	SAS - Sfoglia	Post-operativo	<i>P. viridicatum</i>
10	SAS - Sfoglia	Post-operativo	<i>P. viridicatum</i>
11	SAS - Sfoglia	Post-operativo	<i>P. viridicatum</i>
12	SAS - Sfoglia	Pre-operativo	<i>P. griseofulvum</i>
13	SAS - Sfoglia	Post-operativo	<i>P. griseofulvum</i>
14	SAS - Sfoglia	Pre-operativo	<i>P. crustosum</i>
15	SAS - Sfoglia	Pre-operativo	<i>P. chrysogenum</i>
16	SAS - Sfoglia	Pre-operativo	<i>P. crustosum</i>
17	SAS - Conf.	Post-operativo	<i>P. griseofulvum</i>
18	SAS - Sfoglia	Pre-operativo	<i>P. atramentosum</i>
19	SAS - Sfoglia	Post-operativo	<i>P. nalgiovense</i>
20	SAS - Sfoglia	Post-operativo	<i>P. nalgiovense</i>
21	Farina di grano tenero	/	<i>P. viridicatum</i>
22	Ravioli di magro	/	<i>P. viridicatum</i>
23	Agnolotti gg 0	/	<i>P. chrysogenum</i>
24	Ripieno con verdure	/	<i>P. roqueforti</i>
25	Agnolotti 4°C gg 15	/	<i>P. citrinum</i>
26	Agnolotti 8°C gg 15	/	<i>P. formosanum</i>
27	Agnolotti 4°C gg 21	/	<i>P. citrinum</i>