

Garantire La Qualità Della Salamoia Per Formaggio Con La Microfiltrazione

Ursula Brendel-Thimmel, Yvonne Schilz, Kai Unkelbach, Ralph Heusslein
Scientific and Laboratory Services, Pall Food and Beverage

Aline Sokol-Cencetti
Global Marketing, Dairy, Pall Food and Beverage

Introduzione

La salatura per immersione in salamoia viene utilizzata per molte varietà di formaggio nel mondo. I sistemi con vasche o canalizzazioni aperte contenenti salamoia sono punti di accesso per molteplici fonti di contaminazione microbica come l'acqua utilizzata per preparare la salamoia, l'ambiente umido (schizzi, gocce condensate da pareti e soffitti) e formaggi potenzialmente contaminati. Grassi, particelle di cagliata e microrganismi del formaggio, oltre all'accumulo di proteine ed altri componenti, creano un ambiente ricco di nutrienti per i microrganismi resistenti al sale. La salamoia riutilizzata può quindi diventare un ricettacolo di microrganismi indesiderati come batteri che producono gas o pigmenti, lieviti, muffe o patogeni resistenti al sale, contaminando di conseguenza il formaggio e incidendo sulla sua qualità.

Ridurre i costi di gestione e limitare al massimo il consumo di acqua e l'impatto ambientale comportano l'esigenza di prolungare la durata della salamoia per poterla riutilizzare. Un controllo corretto della salamoia è fondamentale per garantire una produzione giornalmente costante.

La configurazione degli impianti di salamoia e i sistemi di trattamento possono variare notevolmente in funzione dei diversi obiettivi legati al tipo di formaggio, ai mercati finali ed all'ambiente di processo. Se i raggi UV e le attrezzature di pastorizzazione effettuano una disattivazione microbica, la filtrazione può garantire nel contempo la chiarificazione e la riduzione o l'eliminazione della contaminazione microbica. Sono disponibili diversi sistemi e mezzi dalla filtrazione grossolana alla filtrazione a membrana finale.

I sistemi di microfiltrazione Pall Microflow XL Brine (Figura 1) abbinano in maniera efficiente una costante riduzione della torbidità ed un controllo affidabile dei livelli di contaminazione microbica per lunghi cicli di funzionamento automatizzati dando anche prova di un funzionamento efficace dal punto di vista dei costi rispetto a metodi che non prevedono la filtrazione e riduzioni fino al 50% del consumo di acqua e al 30% del tempo di pulizia e del consumo dei prodotti

chimici rispetto ad altri sistemi a membrana, oltre a soddisfare le principali esigenze del settore lattiero-caseario: protezione del marchio, qualità costante e riduzione dei costi.

Challenge test microbici della salamoia

Sebbene siano comunemente disponibili valori di efficienza di rimozione microbica per caratterizzare le cartucce filtranti finali basati su microrganismi standard in fluidi modello, i dati stabiliti con tipici microrganismi deterioranti nei rispettivi fluidi di applicazione sono limitati ed addirittura meno disponibili per i filtri a fibra cava con flusso tangenziale.

Lo scopo del presente studio è stabilire l'efficienza di rimozione per le membrane di microfiltrazione installate sul sistema Pall Microflow sulla base di challenge test microbiologici appositamente elaborati per le condizioni operative della salamoia ed i tipici organismi contaminanti. Sono stati anche inclusi test con *Brevundimonas diminuta*, un microrganismo standard comunemente utilizzato per la convalida dei filtri. Lo studio ha comportato le seguenti fasi:

- Selezione dei microrganismi presenti nella salamoia
- Definizione delle condizioni di crescita e caratterizzazione dei microrganismi da testare nella salamoia
- Challenge test nelle condizioni tipiche della salamoia con moduli a fibra cava in scala di laboratorio
- Caratterizzazione dell'efficienza di rimozione con valori di riduzione logaritmica (LRV) per 6 diversi microrganismi

Selezione dei microrganismi per i challenge test

In letteratura sono citati vari tipi di contaminazione microbica del formaggio tra cui diverse specie di batteri e lieviti. Benchè alcuni studi si concentrino sulla presenza di batteri patogeni legati al ritiro del prodotto come *Listeria* e la sua sopravvivenza nella salamoia⁽¹⁾, la maggior parte riguarda batteri o lieviti isolati dalla salamoia e responsabili di varie forme di deterioramento del formaggio^(2,3,4) come difetti legati



al gonfiore tardivo nei formaggi a pasta semidura, anomalie di colore nella mozzarella e sapore sgradevole per la presenza squilibrata di batteri e lieviti.

Tra i microrganismi riscontrati nella salamoia per formaggio, sono stati anche selezionati *Pseudomonas fluorescens*, un contaminante dell'acqua responsabile di varie forme di deterioramento della mozzarella, *Lactobacillus casei*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, microflora tipica del formaggio, anch'essi responsabili di alcuni casi di deterioramento. La *Listeria monocytogenes*, uno dei patogeni più pericolosi, è stata inclusa come scenario del caso peggiore. Al programma è stato infine aggiunto come microrganismo di riferimento *Brevundimonas diminuta*, non presente nella produzione del formaggio, ma comunemente usato per qualificare i filtri da 0,2 μm in condizioni standard (ASTM 838-05 modificato)⁽⁵⁾.

Definizione delle condizioni di crescita e caratterizzazione dei microrganismi selezionati per i challenge test

La prima parte dello studio era volta a fornire curve di crescita allo scopo di stabilire il punto di raccolta ottimale per ciascun microrganismo e valutarne la vitalità nella salamoia.

Indurre la crescita dei microrganismi selezionati in un mezzo nutritivo appropriato ed in condizioni predefinite è un fattore determinante per ottenere dati affidabili in quanto per i challenge test servono conte di cellule elevate al fine di ottenere un livello specifico predefinito in CFU/cm² riferito alla superficie filtrante effettiva. Inoltre, le cellule devono essere tanto resistenti da sopravvivere una volta inoculate nel modello di salamoia di sale al 20% per evitare che lo stress cellulare generi una falsa risposta ai test di challenge con un livello di contaminazione sottostimato. La morfologia e le dimensioni delle cellule sono state poi misurate mediante microscopia.

Le curve di crescita (Figura 2), ottenute da almeno 3 colture principali per ogni microrganismo, mostrano le tipiche 3 fasi denominate lag, log e stazionaria. La conta delle colonie è stata effettuata mediante serie di diluizioni e piastramento su idonei agar nutritivi. La densità ottica è stata misurata per un periodo minimo di 20 ore fino ad un massimo di 50. Sono state raggiunte conte di colonie fino a $4,10^9$ CFU/ml corrispondenti a densità ottiche (misurate a 546 nm) da 2 a 5 a seconda del microrganismo.

Per i challenge test, i microrganismi sono stati raccolti nella fase log tardiva o nella fase stazionaria precoce, contrassegnate dalla freccia rossa nella Figura 2, per evitare che un numero elevato di cellule morte caricasse il filtro senza rientrare nel calcolo della conta vitale sulle piastre di agar.

La vitalità di ogni microrganismo testato è stata verificata per tre ore dopo l'inoculazione nella salamoia al fine di valutare l'impatto dell'esposizione alla salamoia durante il challenge test microbico. Nessun organismo testato è stato influenzato dalla

soluzione di salamoia durante il test, come dimostra la Figura 3.

L'impatto dell'inoculazione nella salamoia è stato anche valutato per quanto concerne le dimensioni delle cellule, parametro importante per la verifica di un filtro. La riduzione della lunghezza, della larghezza o di entrambe per tutti i microrganismi da 1/6 a 1/3 è stata osservata per tutti gli organismi testati durante la prima ora di permanenza nella salamoia. Trascorsa la prima ora, le dimensioni delle cellule, riportate nella Figura 4, sono rimaste stabili. Partendo da tale risultato, i microrganismi sono stati inoculati nella salamoia un'ora prima del challenge test, consentendo in tal modo alle cellule di adattarsi alla salamoia e assumere dimensioni stabili durante la filtrazione di 1 ora.

Challenge test microbico nelle condizioni tipiche della salamoia

I moduli USP143 in PVDF a fibra cava valutati nel presente studio sono versioni ridotte dei moduli utilizzati nei sistemi di microfiltrazione Pall Microflow XL Brine.


I challenge test sono stati eseguiti in una configurazione di prova appositamente elaborata (Figura 5) che ha consentito la realizzazione delle fasi di disinfezione, risciacquo e filtrazione (Figura 6), con caratteristiche della salamoia simili a quelle presenti in un impianto industriale.

La portata dei test è stata fissata a un livello di 37 L/m²h, flusso medio ottenuto negli impianti di produzione del formaggio che utilizzano sistemi Pall Microflow XL Brine. La temperatura di filtrazione per la salamoia contaminata è stata scelta in base a un valore realistico di 10°C. Si è scelta la modalità di filtrazione diretta per controllare il livello di concentrazione microbica nel flusso in entrata per un challenge test definito in maniera precisa. E' stato così possibile stabilire un livello di challenge specifico in CFU/cm², il che non è invece possibile con la modalità a flusso tangenziale. Le condizioni di prova sono sintetizzate nella tabella 2.

Caratterizzazione dell'efficienza di rimozione mediante valori di riduzione logaritmica (LRV)⁶

Le prestazioni microbiologiche dei filtri sono generalmente valutate in condizioni di laboratorio predefinite. Ciò viene eseguito mettendo il filtro alla prova in condizioni riproducibili con alcuni microrganismi sospesi in un volume prestabilito ad una concentrazione predefinita in presenza di un flusso idoneo della sospensione attraverso il filtro. Le condizioni specifiche per i challenge test della salamoia sono state descritte nel paragrafo precedente.

Una volta misurato, il rapporto tra la concentrazione di microrganismi a monte e a valle è utilizzato per calcolare la riduzione del titolo. Per comodità, questi numeri, solitamente molto grandi, sono espressi indicando il valore di riduzione logaritmica (LRV), che rappresenta il logaritmo decimale della riduzione del titolo. Il valore della riduzione logaritmica esprime efficacemente le prestazioni microbiche dei filtri.


$$\text{LRV} = \text{logaritmo} \frac{\text{Numero totale di microrganismi affluenti nel filtro}}{\text{Numero di colonie registrato sul disco di analisi a valle}}$$

I valori di riduzione logaritmica sono legati alla concentrazione nel flusso in entrata, ossia il livello di challenge. Se tale livello è troppo basso, il numero ridotto di microrganismi a valle del filtro potrebbe limitare il calcolo preciso della riduzione del titolo. In questo caso, l'effluente sterile potrebbe essere erroneamente interpretato come prestazione elevata. Viceversa, se il calcolo viene eseguito in maniera corretta con il limite teorico del metodo, potrebbe risultarne una prestazione falsamente bassa.

Per giungere ad un'interpretazione chiara delle prestazioni di un filtro, il valore LRV viene espresso unitamente al livello di challenge specifico per area filtrante effettiva in CFU/cm², nonché unitamente alla conta totale delle colonie o all'assenza di microrganismi nel filtrato totale.

Per ogni tipo di microrganismo, si sono testati tre diversi moduli a fibra cava tipo Pall USP143 provenienti da tre lotti differenti. In un primo tentativo, il livello di challenge specifico è stato fissato a 10⁵ CFU/cm² per i microrganismi di prova più piccoli *B. diminuta* e *P. fluorescens*. Poiché ne è risultato un filtrato sterile, vale a dire nessuna conta di colonie a valle del filtro, il livello di challenge è stato innalzato a 10⁷ CFU/cm² per tutti gli altri test ed organismi.

Microfiltrazione con fibra cava ad alte prestazioni

Nel presente studio sulle prestazioni microbiche, sono stati testati moduli a fibra cava Pall USP 143 con 5 tipici microrganismi di contaminazione della salamoia per formaggio in condizioni di processo realistiche per un impianto lattiero-caseario.

Tutti i test hanno dimostrato che i microrganismi sono stati efficientemente eliminati a un livello di challenge di 10⁷ CFU/cm² della superficie filtrante con valori di riduzione logaritmica >10,4.

Sebbene le prestazioni in termini di efficienza di rimozione microbica della fibra cava emersi dal presente studio non siano direttamente confrontabili con quelle delle cartucce filtranti sterilizzanti utilizzate in modalità diretta, la cui efficienza di eliminazione è correlata ai valori dei test di integrità ottenuti a seguito del processo di convalida del filtro, sono comunque un buon indice del livello di sicurezza ottenibile nel processo di salatura in salamoia con i sistemi a fibra cava Pall Microflow.

Vantaggi dei sistemi Pall Microflow XL Brine per gli impianti di produzione del formaggio

I moduli Pall USP 143 valutati nel presente studio sono versioni ridotte dei moduli XL utilizzati nei sistemi di microfiltrazione Microflow XL Brine.

Le prestazioni tipiche dei sistemi Pall Microflow XL

Brine sono una torbidità del filtrato inferiore a 0,8 NTU, abbinata ad una notevole efficienza di riduzione microbica, se utilizzati in modalità a flusso tangenziale. Misurazioni eseguite in loco presso impianti di produzione di formaggi a pasta morbida hanno dato prova di prestazioni notevoli in termini di eliminazione con un livello microbico tipico nella salamoia da 10² a 10⁵ CFU/mL ed un valore di riduzione logaritmica (LRV) fino a >5 sulla microflora totale. La torbidità tipica della salamoia grezza, del filtrato e del concentrato è riportata nella Figura 7.

La tecnologia Pall Microflow è facile da integrare nei sistemi di salatura in salamoia con modalità operative studiate per rispondere ai diversi requisiti dell'azienda correlati al tipo di formaggio e all'organizzazione dell'impianto. Per esempio, il sistema può funzionare in modalità in ricircolo filtrando continuamente dal 5 al 20% del volume totale della salamoia durante la salatura del formaggio, per cui riducendo costantemente i solidi sospesi e la carica microbica, oppure in modalità a lotto, vale a dire filtrando lotti di volume durante la notte per ottenere il massimo livello di controllo microbico come quello richiesto per i formaggi a pasta morbida e semimorbida.

Tra le principali caratteristiche del sistema Pall Microflow XL Brine ricordiamo:

- Uso di membrane in PVDF a elevata resistenza meccanica, per una lunga vita in esercizio
- Capacità di risciacquo della membrana in fibra cava Microza*, che consente di mantenere un flusso superiore per un ciclo operativo più lungo
- Membrana a fibra cava con canale aperto di diametro 1,4 mm di facile lavaggio
- Serbatoi integrati di pulizia/concentrazione degli scarti
- Dosaggio automatizzato dei prodotti chimici per garantire la sicurezza dell'operatore
- Controllo della temperatura di lavaggio, filtrazione dell'acqua
- Tutti i componenti che vengono a contatto con il prodotto realizzati in acciaio inossidabile 316L
- Programmazione del ciclo completamente automatizzata per funzionamento non presidiato con riduzione del tempo di inattività e minor impiego di manodopera

Il sistema di microfiltrazione Pall Microflow è una soluzione avanzata per il controllo della contaminazione microbica che consente alle aziende di eseguire la chiarificazione con costi di gestione ridotti ottenendo una qualità elevata e costante della salamoia filtrata, fornendo in tal modo un sistema rispettoso dell'ambiente per prolungare la durata della salamoia ed evitare il deterioramento della qualità del formaggio, migliorando in tal modo l'economia dei produttori di formaggio.

Bibliografia e riferimenti

¹ Larson A.E., Johnson E.A., and Nelson J.H.; Survival of *Listeria monocytogenes* in Commercial Cheese Brines; 1999; Journal of Dairy Science, Volume 82, Issue 9, September 1999, Pages 1860-1868
² Cantoni C., Marchisio E., Galli M.; 2000; Blu-green coloration of mozzarella cheese (Causa della colorazione blu-verde di mozzarella); Industrie Alimentari; v. 39(392) p. 586-588
³ Fleet G.H.; A review, Yeasts in dairy products; 1990; Journal of Applied Biotechnology; 68;199-211

⁴ Wendorff W.L.; Brining Cheese, A comprehensive guide for cheesemakers; May 2010; Wisconsin Center for Dairy Research
⁵ Guidance for Industry: Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing- Current Good Manufacturing Practice, Sept.2004
⁶ Brendel-Thimmel U., Jaenchen R., Schlamp F., Sterilfiltration von Flüssigkeiten und Gasen, Chemie Ingenieur Technik 2006,78, No.11, p.1655-1665

Figure e tabelle

Figura 1: Sistema Pall Microflow XL



Tabella I: Ceppi selezionati e mezzi di coltura

Ceppo	N. DSMZ	N. altra raccolta	Brodo nutritivo	Mezzo nutritivo
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	4358	NCDO 2085	NB	TSA
<i>Listeria monocytogenes</i>	15675	NCTC 11994	TSB	TSA
<i>Lactobacillus casei</i>	20011	—	MRS	MRS
<i>Debaryomyces hansenii</i>	70590	—	YPB	YPD
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	5419	ATCC 8582	YPB	YPD
<i>Brevundimonas diminuta</i>	—	ATCC 19146	—	TSA



Figura 2: Curve di crescita dei microrganismi selezionati a diverse temperature

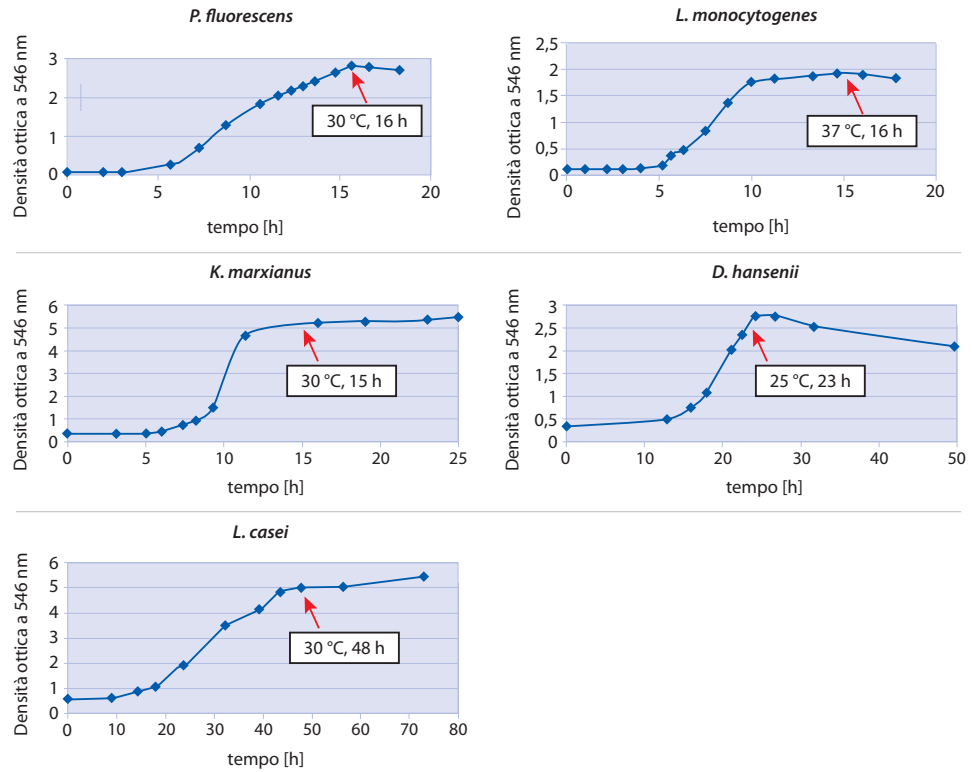
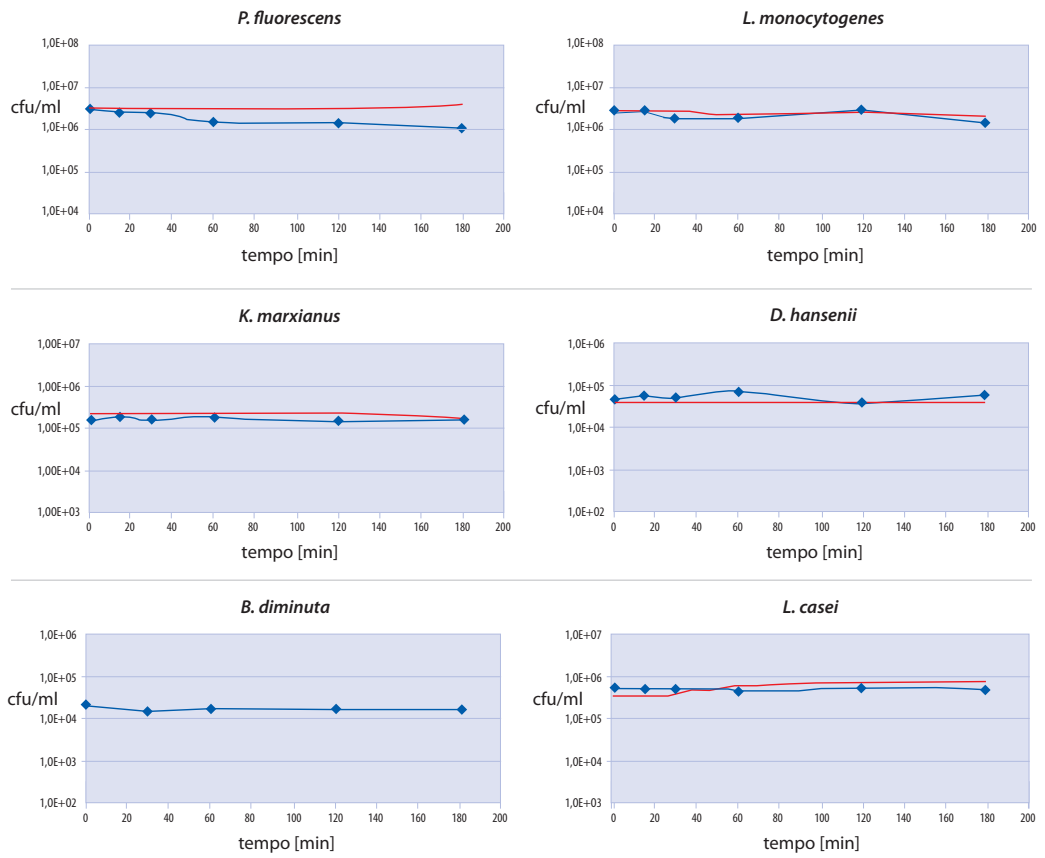


Figura 3: Vitalità dei microrganismi nella salamoia rispetto alla soluzione tampone



Legend:

Salamoia —◆—◆—

Soluzione —◆—◆—



Figura 4: Dimensioni delle cellule dei microrganismi nella soluzione tampone e nella salamoia

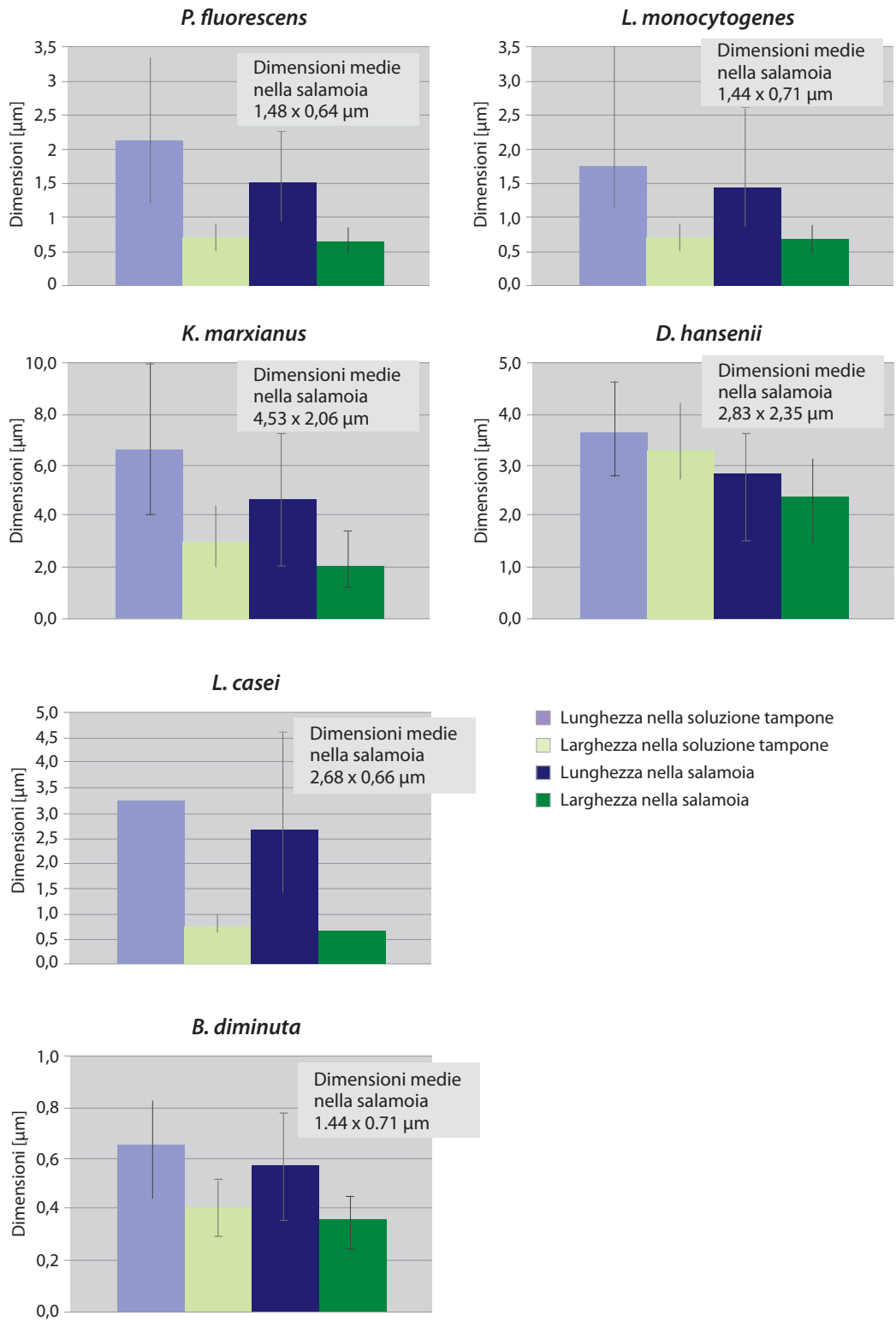




Tabella II: Condizioni di test

Filtro	Modulo Pall USP143 a flusso tangenziale
Superficie filtrante effettiva	0,12 m ²
Portata di prova	37 L/m ² h in modalità di filtrazione diretta
Temperatura di filtrazione	10 °C
Numero di test	3 diversi moduli filtranti per organismo testato Da 2 a 3 challenge test per modulo filtrante
Soluzione modello di salamoia	20 % NaCl + 0,1% CaCl ₂ pH corretto 4,6 – 4,8 con HCl
Volume filtrato	4,5 L
Filtrato totale campionato dalle membrane di controllo per l'analisi	

Figura 5: Configurazione dei challenge test – Descrizione schematica

1. Disinfezione

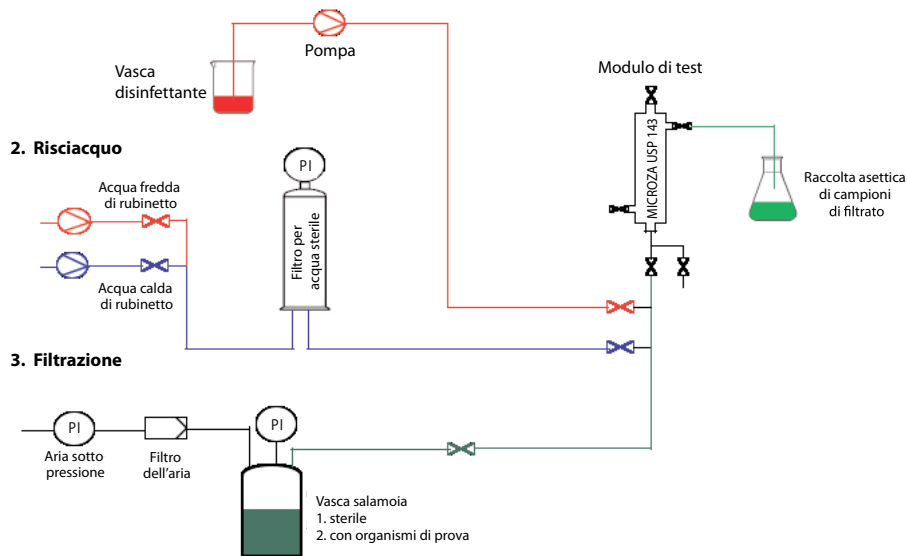


Figura 6: Challenge test – Fasi principali



Figura 7: Torbidità tipica della salamoia

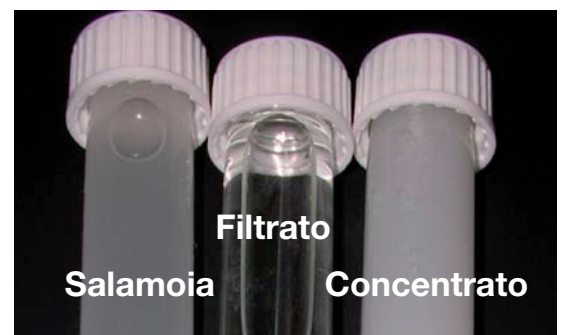




Tabella III: Risultati dei challenge test microbici per modulo a fibra cava Pall USP 143

Modulo n.	Organismo	CFU nel challenge totale	CFU / cm ²	CFU nel filtrato totale	LRV
1	<i>P. fluorescens</i>	3,43E+08	2,86E+05	0	> 8,5
2	<i>P. fluorescens</i>	3,80E+08	3,17E+05	0	> 8,6
3	<i>P. fluorescens</i>	2,71E+08	2,26E+05	0	> 8,4
1	<i>P. fluorescens</i>	3,99E+10	3,33E+07	0	> 10,6
2	<i>P. fluorescens</i>	3,76E+10	3,13E+07	0	> 10,6
3	<i>P. fluorescens</i>	3,12E+10	2,60E+07	0	> 10,5
4	<i>L. monocytogenes</i>	8,55E+10	7,13E+07	0	> 10,9
5	<i>L. monocytogenes</i>	3,89E+10	3,24E+07	0	> 10,6
6	<i>L. monocytogenes</i>	8,24E+10	6,86E+07	0	> 10,9
4	<i>L. casei</i>	4,29E+10	3,57E+07	0	> 10,6
5	<i>L. casei</i>	5,36E+10	4,46E+07	0	> 10,7
6	<i>L. casei</i>	4,22E+10	3,51E+07	0	> 10,6
1	<i>K. marxianus</i>	2,62E+10	2,19E+07	0	> 10,4
2	<i>K. marxianus</i>	2,70E+10	2,25E+07	0	> 10,4
3	<i>K. marxianus</i>	2,52E+10	2,10E+07	0	> 10,4
1	<i>D. hansenii</i>	4,50E+10	3,75E+07	0	> 10,7
2	<i>D. hansenii</i>	4,73E+10	3,94E+07	0	> 10,7
3	<i>D. hansenii</i>	4,13E+10	3,44E+07	0	> 10,6
4	<i>B. diminuta</i>	2,12E+08	1,76E+05	0	> 8,3
4	<i>B. diminuta</i>	2,53E+10	2,11E+07	0	> 10,4
5	<i>B. diminuta</i>	3,42E+10	2,85E+07	0	> 10,5
6	<i>B. diminuta</i>	2,92E+10	2,43E+07	0	> 10,5

Contatti

Aline Sokol-Cencetti

Global Marketing Manager, Pall Food and Beverage

E-mail: aline_sokol@europe.pall.com



Pall Corporation

Pall Food and Beverage

25 Harbor Park Drive
Port Washington, NY 11050
+1 516 484 3600 telephone
+1 866 905 7255 toll free US


foodandbeverage@pall.com

Visitate il nostro sito www.pall.com/foodandbev

Pall Corporation ha uffici e stabilimenti in tutto il mondo. Per conoscere i rappresentanti Pall nella vostra area, visitare il sito www.pall.com/contact

Si prega di contattare Pall Corporation per verificare che il prodotto sia conforme ai requisiti legali nazionali e/o ai requisiti normativi regionali per l'uso a contatto con acqua e alimenti.

Per esigenze di sviluppo tecnologico dei prodotti, dei sistemi e/o dei servizi descritti nel presente documento, i dati e le procedure sono soggetti a modifiche senza preavviso. Per verificare se le informazioni fornite sono tuttora valide, consultate il vostro rappresentante Pall o visitate il sito Web www.pall.com

© Copyright 2011, Pall Corporation. Pall,  e SUPRADisc sono marchi di fabbrica di Pall Corporation. © Indica un marchio depositato di Pall negli USA. Filtration. Separation. Solution.SM e Total Fluid ManagementSM sono marchi di servizio di Pall Corporation.