

# ALIMENTA<sup>ESD</sup>

COMMENTARIO TECNICO-GIURIDICO DELLA PRODUZIONE AGRO-ALIMENTARE

N. 5 Anno XVIII

Maggio 2010

Mensile

## ANALISI UNICHE E IRRIPETIBILI

### Convocazioni inutili e dispendiose

## SOMMARIO

### G. Zagaria

Commento all'art. 527-*quater* codice penale, un reato "OGM" - II parte (99)

### Trattamento, utilizzo e valorizzazione del siero di latte nel rispetto dell'ambiente

Convegno 26-27 Febbraio 2010 - Salerno

#### C. Mucciolo

Consuntivo (103)

#### V. Giaccone

I pericoli microbici e chimici nei sottoprodotti dell'industria casearia: aggiornamenti e approfondimenti (104)

#### M. Pizzichini, C. Russo, M. Vitagliano, D. Pizzichini

Valorizzazione commerciale del siero di latte bufalino nel rispetto dell'ambiente (115)

L'argomento è stato affrontato per la prima volta da ALIMENTA grazie alla preziosa collaborazione di Alfredo Montagna, sostituto procuratore generale della Corte di Cassazione Penale, autore di due articoli (\*) che hanno suscitato l'interesse che mi aspettavo.

Produttori e distributori hanno apprezzato la messa a fuoco di una problematica che li vede coinvolti senza ragioni plausibili, né per incombenze tecniche né per necessità di natura sanitaria. Sono i casi in cui prevale un cieco automatismo sull'applicazione delle norme che regolano il prelevamento dei campioni di alimenti in fase di distribuzione.

Cercherò dunque di commentare in fatto quel che Montagna ha discusso in dottrina onde convergere insieme sul punto che, secondo logica e diritto, costituisce il vero significato della cosiddetta analisi unica ed irripetibile. Percepito il quale si vedrà che le convocazioni per l'assistenza alle analisi si rivelano per lo più inutili, economicamente gravose per l'interessato e non di rado intempestive al punto da non consentire l'organizzazione della trasferta in tempo utile alla sede del laboratorio designato. Accade così che nel mentre sono formalmente osservate le procedure previste dall'art. 223 delle disposizioni attuative del c.p.p. (analisi dei campioni e garanzie per l'interessato) in pratica sono vanificate le garanzie difensive rappresentate nell'art. 230 del c.p.p. (attività dei consulenti tecnici).

E' il caso, più frequente, del prodotto "sotto scadenza" (per usare il gergo invalso) che si realizza quando l'agente fa mostra di eccesso di zelo oppure, all'opposto, di svogliata applicazione delle sue mansioni. Valide entrambe le ipotesi quando difetta la professionalità. La dannosa conseguenza è che viene individuato in uno o due giorni il lasso di tempo fatale alla sicurezza alimen-

a cura di Istituto Bromatologico Italiano

Direttore responsabile: Antonio Neri

ASSOCIATO



Unione Stampa Periodica Italiana

tare del prodotto oppure ci si disimpegna adducendo la carenza di confezioni necessarie alla cosiddetta preanalisi amministrativa. Nel primo caso si dimentica il presupposto di legge che pone la rapida deperibilità microbiologica in relazione al pericolo per la salute umana, nel secondo prevale la pigrizia di volgere i passi verso un distributore più fornito. Per soprammarchato, troppo volte avviene che luogo, data e ora d'inizio delle operazioni peritali, siano indicati a verbale secondo autonomia ed insindacabile decisione dell'agente. E questo vale da avviso di convocazione, del tutto indifferenti alle molte circostanze che rendono difficile e talvolta impossibile a un documento di tale importanza di pervenire in tempo utile a conoscenza dell'interessato. Inaccettabile logica di procedere che rischia di trasformare l'"interessato", impossibilitato *de facto*, in un "prevenuto" *de iure*.

Contemperare due diritti (tutela del consumatore e diritti difensivi) non sembra impossibile tanto più che la legge non da adito a dubbi. Buona volontà ed intelligenza nell'applicarla, in modo che, una volta scattato il meccanismo garantista, lo stesso produca in concreto i suoi effetti. Come è dimostrato quando, fortunatamente,

l'incombenza della convocazione è affidata al responsabile del laboratorio che, in virtù della sua professionalità, sa decidere con cognizione di causa fra analisi unica o preanalisi amministrativa. Ma per questo è necessario che sia posto nella condizione di poter operare una scelta fra le due procedure e quindi si torna al punto di partenza e cioè alla professionalità dell'agente prelevatore. E' questa una fra le altre situazioni di sudditanza, che ho più volte lamentato, in cui è posto suo malgrado il responsabile di laboratorio nei confronti dell'incaricato del servizio di vigilanza e controllo.

La questione è complessa e non può considerarsi così esaurita. Essa merita una estesa e approfondita disamina più di quanto non lo permetta il mio canonico editoriale mensile. E' quello che mi riprometto riprendendo il tema del prelevamento campioni a cominciare dalla nozione di "aliquota" che appare inspiegabilmente trascurata nella sua immanenza nel contesto di cui abbiamo oggi discusso.

**Antonio Neri**

(\*) "Quali le regole per i prelievi e le analisi dei prodotti alimentari. Le norme regionali non possono incidere sulle norme statali", in *Alimenta* n. 11-12/2009, p. 231-232

"Sulle garanzie per il produttore e distributore in tema di prelievi e analisi dei prodotti alimentari", in *Alimenta* n. 2/2010 p. 27-31

## RECENSIONI

### IMPRESA AGRICOLA E SICUREZZA ALIMENTARE. ESPERIENZE E REGOLE A cura di Mario Ciancio e Antonella Miletta

Università di Napoli Federico II – Collana del Dipartimento di Diritto dell'Economia n. 21  
Vol. 24x17 di pagg. 174 – Edizioni Scientifiche Italiane s.p.a. [www.edizioniesi.it](http://www.edizioniesi.it) – euro 19,00

Grazie al contributo del Dipartimento di Diritto dell'Economia dell'Università di Napoli Federico II, di A.I.D.A. (Associazione Italiana di Diritto Alimentare) e Assessorato all'Agricoltura Regione Campania vede la luce questo volume curato da **Mario Ciancio** docente Istituzione Diritto Privato Facoltà di Economia e di **Antonella Miletta** docente Istituzione Diritto Privato e Diritto Agrario presso la stessa Facoltà dell'Università Federico II di Napoli. I curatori tengono a ringraziare gli Autori che hanno collaborato alla realizzazione dell'opera che con i loro contributi hanno lumeggiato la necessità di far chiarezza in un contesto normativo così ampio ed eterogeneo. Gli attori coinvolti sono soggetti pubblici e privati, agricoltori ed industrie alimentari, la grande distribuzione organizzata, le imprese queste ultime chiamate a produrre con un ingente carico di disciplinari e sottoposte a rigorosi controlli, talvolta volontari, testimoni di un articolato sistema di

tracciabilità.

Gli Autori: **Francesco Lucarelli**, *"Il diritto agrario tra specialità e valenza costituzionale"*; **Italo Santangelo**, *"La sicurezza alimentare nella regione Campania"*; **Ferdinando Albisinni**, *"Impresa agricola e impresa alimentare"*; **Felice Casucci**, *"La ruralità nel processo di integrazione europea"*; **Mario Ciancio**, *"Impresa agricola e sicurezza alimentare"*; **Antonio Sciaudone**, *"La sicurezza alimentare tra filiera e tracciabilità"*; **Antonella Miletta**, *"La sicurezza alimentare. L'esperienza degli agriturismi"*; **Domenico Viti**, *"L'esperienza dei Farmers' Markets negli USA tra Food Security e Food Safety"*; **Duilio Cortassa**, *"La sicurezza alimentare nel settore vitivinicolo: i controlli sulla produzione"*; **Renato Briganti**, *"Verso un'agricoltura sostenibile: la terra come bene comune"*; **Antonio Limone**, *"La sicurezza negli alimenti di origine animale"*.

# COMMENTO ALL'ART. 517-QUATER CODICE PENALE, UN REATO "OGM"

Giuseppe Zagaria – Diplomato SSPL di Parma  
Maresciallo Ordinario del Comando Carabinieri Politiche Agricole e Alimentari (\*)

**Indice: Premessa. – 1. Definizione di Indicazione Geografica e Denominazione di Origine. – 2. Differenze con i marchi collettivi geografici. – 3. Contraffazione e alterazione delle IG o DO. – 4. Struttura del reato. – 5. Quadro sanzionatorio. – Conclusioni**

## II Parte

### 4. STRUTTURA DEL REATO

Dopo aver sottolineato nei paragrafi precedenti le evidenti distonie della norma in esame con l'ordinamento giuridico preesistente, è possibile ora passare ad esaminare le ulteriori discordanze interne che dal punto di vista strutturale connotano l'art. 517-quater c.p..

Prima, però, di occuparci degli elementi del reato, è bene precisare che il **bene giuridico** protetto dalla norma incriminatrice è da individuarsi nella tutela dell'ordine economico, declinato nella tutela degli operatori (consumatori compresi) da condotte che presentano una spiccata attitudine ingannatoria circa la provenienza di prodotti agroalimentari particolarmente qualificati, perché sottoposti ad una specifica disciplina e tutela in ordine alla indicazione della loro origine geografica.

Un primo evidente divario lo si riscontra nell'**elemento oggettivo** che contraddistingue la condotta del primo e del secondo comma. Infatti, mentre il primo comma, rivolto al momento della produzione, sanziona la condotta di chi contraffà o comunque altera IG o DO di prodotti agroalimentari, il secondo comma, diretto al successivo momento della commercializzazione, punisce la condotta di chi introduce nel territorio dello Stato, detiene per la vendita, pone in vendita con offerta diretta ai consumatori o mette comunque in circolazione i prodotti agroalimentari con le indicazioni o denominazioni contraffatte.

Non vi è chi non veda che, inspiegabilmente, le condotte sanzionate dal secondo comma hanno ad oggetto i prodotti agroalimentari con le IG o DO solo contraffatte e non anche alterate. La mancanza che senz'altro è ascrivibile ad una svista del legislatore, potrebbe generare un pericoloso vuoto di tutela colmabile o da interpretazioni giurisprudenziali estensive o, come sarebbe preferibile, da un intervento legislativo correttivo.

In ordine all'**elemento soggettivo**, la norma in esame si segnala ancora per una palese ed incomprensibile disparità di trattamento tra le condotte descritte dal primo comma e quelle enumerate nel secondo. Infatti, mentre per la punibilità delle condotte di contraffazione o alterazione delle IG e DO dei prodotti agroalimentari

sarà sufficiente riscontrare la sussistenza del dolo generico, le condotte di introduzione nel territorio dello Stato, di detenzione per la vendita, di messa in vendita con offerta diretta ai consumatori o di messa comunque in circolazione di tali prodotti assumono rilievo penale solo qualora il soggetto abbia agito al fine di trarne profitto.

In ordine al **soggetto attivo**, "*chiunque*", il tenore letterale dell'art. 517-quater c.p. non lascia spazio ad alcun dubbio: è un reato comune. Non sono richieste particolari qualifiche soggettive in capo al soggetto che pone in essere le condotte ivi descritte e punite. Tuttavia, alla luce del sistema di qualità delle DO e/o IG disciplinato dal Reg. (CE) 20 marzo 2006, n. 510/2006 (1), la figura del soggetto attivo del reato merita alcune dovute precisazioni.

Limitando l'osservazione alle condotte punite dal primo comma, non vi è dubbio che un soggetto estraneo alla filiera certificata di produzione della DO o IG, oggetto di "*contraffazione*" o "*alterazione*", è certamente destinatario dell'art. 517-quater c.p.; ma come ci si pone di fronte ai casi in cui autore della violazione è un produttore che, riunendo tutti i requisiti per farne parte, è regolarmente inserito nella filiera certificata?

Con la sottoposizione al piano dei controlli tale produttore è autorizzato ad impiegare legittimamente la DO o IG per i propri prodotti, a condizione che la produzione avvenga nel rispetto dei dettami del disciplinare di produzione. Per converso, per un prodotto realizzato in violazione del disciplinare di produzione (ad esempio, formaggio con DO realizzato con latte non proveniente da stalle certificate o peggio ancora di origine estera) non può, per nessun motivo, essere impiegata la DO o IG. Qualora, però, ciò dovesse accadere, quali sono le conseguenze per il produttore?

Un discrimine ci viene offerto dall'esame dell'elemento psichico che connota la condotta del produttore. Se la violazione al disciplinare sia stata commessa colposamente, tale comportamento rileverà, oltre che ai fini dell'adozione da parte dell'organismo di certificazione dei provvedimenti conseguenti alla non conformità (sorveglianza rinforzata, sospensione, revoca, ecc.), solo ai fini dell'applicazione della sanzione amministrativa prevista dall'art. 1 del D. Lgs. 19 novembre 2004, n. 297. Qualora, invece, la condotta

del produttore sia caratterizzata dall'intenzionalità, la stessa, oltre ad essere sanzionata con i suddetti due provvedimenti, sarà ritenuta idonea ad integrare la fattispecie punita dall'art. 517-quater, comma 1, c.p..

#### 5. QUADRO SANZIONATORIO.

Anche dal punto di vista sanzionatorio non mancano le contraddizioni. Se la gamma di istituti punitivi allestiti attorno al nuovo art. 517-quater c.p. è quanto di più avanzato il nostro ordinamento giuridico offra sul fronte del contrasto al crimine, non può passare inosservato il fatto che la **pena edittale** prevista nello stesso articolo non è caratterizzata da pari severità: **reclusione fino a due anni e la multa fino a 20.000 euro**. Un tal mite regime punitivo, dal punto di vista processuale si traduce, da un lato, nella non possibilità di procedere all'arresto in flagranza di reato, al fermo e alla custodia cautelare in carcere, dall'altro, non impedisce all'imputato di richiedere il patteggiamento, in modo da evitare il pagamento delle spese del procedimento, l'applicazione delle pene accessorie nonché delle misure di sicurezza, fatta eccezione per la confisca.

L'art. 517-quater al terzo comma stabilisce l'applicabilità della **circostanza aggravante speciale** di cui all'art. 474 ter, comma 2, c.p. che comporta un aumento di pena della reclusione fino a tre anni e dalla multa fino a 30.000 euro. Si richiede a tal fine che il delitto sia commesso in modo sistematico o attraverso l'allestimento di mezzi e attività organizzate. Tale circostanza si pone ad un livello intermedio tra il delitto di associazione a delinquere di cui all'art. 416 c.p., oggetto di espressa riserva da parte della norma, ed il concorso eventuale di persone nel reato di cui all'art. 110 c.p.

Siffatta circostanza aggravante pare destinata ad essere contestata in modo pressoché automatico tutte le volte che sarà accertata una delle condotte punite dall'art. 517-quater c.p.. Invero, si stenta ad immaginare un'attività di contraffazione o alterazione di IG o DO di prodotti agroalimentari, come anche di commercializzazione degli stessi, attraverso modalità che non comportino l'allestimento di mezzi o abbiano un minimo di organizzazione di "impresa".

La conferma a quanto appena sostenuto la fornisce il successivo art. 517-quinquies, ove si prevede la **circostanza attenuante speciale** relativa alla collaborazione con l'autorità di polizia o giudiziaria. In esso, infatti, si stabilisce che le pene previste dall'articolo 517-quater sono diminuite dalla metà a due terzi nei confronti del colpevole che si adopera per aiutare concretamente l'autorità di polizia o l'autorità giudiziaria nell'azione di contrasto del delitto di cui al predetto art. 517-quater, nonché nella raccolta di elementi decisivi per la ricostruzione dei fatti e per l'individuazione o la cattura dei concorrenti, ovvero per la individuazione degli strumenti occorrenti per la commissione del delitto medesimo o dei profitti da esso derivante.

Quali **pene accessorie**, la norma in esame, nei casi di rilevante gravità o di recidiva specifica, stabilisce l'applicabilità alternativa delle due misure interdittive

previste dal secondo comma dell'art. 517-bis c.p. e cioè: la temporanea chiusura dello stabilimento o dell'esercizio in cui il fatto è stato commesso da un minimo di cinque giorni a un massimo di tre mesi, ovvero la revoca della licenza, dell'autorizzazione o dell'analogo provvedimento amministrativo che consente lo svolgimento dell'attività commerciale nello stabilimento o nell'esercizio stesso.

Particolarmente incisivo il trattamento sanzionatorio si presenta sul fronte delle **misure di sicurezza patrimoniali**. Alla condanna per il delitto di cui all'art. 517-quater c.p. potrebbero conseguire due tipi di confisca.

Una **confisca obbligatoria** e una eventuale **confisca per equivalente**, infatti, conseguono, anche in caso di "patteggiamento", dall'applicazione delle disposizioni di cui all'art. 474-bis c.p., a cui il terzo comma dell'art. 517-quater, espressamente, rinvia. Si stabilisce, infatti, che è sempre ordinata, salvi i diritti della persona offesa alle restituzioni e al risarcimento del danno, la confisca delle cose che servirono o furono destinate a commettere il reato e delle cose che ne sono l'oggetto, il prodotto, il prezzo o il profitto, a chiunque appartenenti (2). Qualora non sia possibile eseguire la confisca dei suddetti beni, il giudice ordina la confisca di beni di cui il reo ha la disponibilità per un valore corrispondente al profitto.

Un'ulteriore ipotesi di confisca, originariamente prevista solo per i reati di stampo mafioso e col tempo estesa anche ai reati ritenuti di maggiore allarme sociale, è stata introdotta dal comma 3 dell'art. 15 della legge 23 luglio 2009, n. 99 (3). Si prevede, in tal modo, che nei casi di condanna o di "patteggiamento" per il reato di associazione a delinquere di cui all'art. 416 c.p., realizzata allo scopo di commettere il delitto di cui all'art. 517-quater c.p., è sempre disposta la **confisca** del denaro, dei beni o delle altre utilità di cui il condannato non può giustificare la provenienza e di cui, anche per interposta persona fisica o giuridica, risulta essere titolare o avere la disponibilità a qualsiasi titolo in valore sproporzionato al proprio reddito, dichiarato ai fini delle imposte sul reddito, o alla propria attività economica.

Al pari della confisca per equivalente, l'ipotesi di confisca in questione non richiede l'accertamento di un nesso eziologico tra il reato e i beni oggetto di confisca. Dal momento che opera una presunzione legislativa di illecita accumulazione, non rileva se detti beni siano o meno derivanti dal reato per il quale è stata inflitta la condanna (4). L'elemento determinante è la "sproporzione" che deve, comunque, essere accertata attraverso una ricostruzione storica della situazione dei redditi e delle attività economiche del condannato al momento dei singoli acquisti. Una volta fornita tale prova sussiste una presunzione relativa di illecita accumulazione patrimoniale che può essere superata solo da specifiche e verificate allegazioni dell'interessato (5).

Chiude il cerchio della risposta sanzionatoria la prevista estensione della **responsabilità amministrativa** da

reato degli enti di cui al D.Lgs. 8.6.2001, n. 231 ai delitti contro l'industria e il commercio previsti nel Capo II, del Titolo VIII del Libro II del Codice Penale. Nel citato decreto è stato, infatti, introdotto un nuovo art. 25 bis. 1 che prevede la responsabilità dell'ente in relazione alla commissione, tra gli altri, del delitto di cui all'art. 517-quater, con la sanzione pecuniaria fino a cinquecento quote.

Pregevole e quanto mai opportuno è lo strumento per il contrasto fornito alle forze di polizia dall'art. 16 della medesima legge 23 luglio 2009, n. 99. Mutuando quanto già stabilito per il contrasto allo spaccio delle sostanze stupefacenti (6), si è previsto, infatti, che i beni mobili iscritti in pubblici registri, le navi, le imbarcazioni, i natanti e gli aeromobili sequestrati nel corso di operazioni di polizia giudiziaria per la repressione del reato di cui all'art. 517-quater c.p. sono affidati, provvisoriamente (7), dall'autorità giudiziaria in **custodia giudiziale agli organi di polizia** che ne facciano richiesta per essere utilizzati in attività di polizia ovvero possono essere affidati ad altri organi dello Stato o ad altri enti pubblici non economici, per finalità di giustizia, di protezione civile o di tutela ambientale.

(\*) *Le considerazioni esposte sono frutto esclusivo del pensiero dell'autore e non impegnano in alcun modo l'Amministrazione di appartenenza.*

#### NOTE

1) Il legislatore italiano con l'art. 14, L. 21 dicembre 1999, n. 526, che ha individuato, nel Ministero delle Politiche Agricole e Forestali, l'autorità pubblica preposta a sorvegliare che il controllo avvenga secondo i canoni prestabiliti, ma ha poi anche riconosciuto la possibilità di effettuare il controllo in capo ad organismi privati.

2) In ordine alla posizione dei terzi la norma stabilisce che: "*Si applicano le disposizioni dell'articolo 240, commi terzo e quarto, c.p. se si tratta di cose che servirono o furono destinate a commettere il reato, ovvero che ne sono l'oggetto, il prodotto, il prezzo o il profitto, appartenenti a persona estranea al reato medesimo, qualora questa dimostri di non averne potuto prevedere l'illecito impiego, anche occasionale, o l'illicita provenienza e di non essere incorsa in un difetto di vigilanza*".

3) Ha integrato l'articolo 12-sexies, comma 1, primo periodo, del decreto-legge 8 giugno 1992, n. 306, convertito, con modificazioni, dalla legge 7 agosto 1992, n. 356.

4) Cass. Pen. Sez. I, sent. n. 8404 del 15.01.2009.5)

5) Cass. Pen. Sez. I, sent. n. 25728 del 05-06-2008.

6) D.P.R. 9.10.1990, n. 309, art. 100.

7) Gli stessi beni mobili, acquisiti dallo Stato a seguito di provvedimento definitivo di confisca, sono assegnati, a richiesta, agli organi o enti che ne hanno avuto l'uso.

8) **Art. 1 Depenalizzazione.**

Sono trasformate in illeciti amministrativi, soggetti alle sanzioni stabilite dagli articoli 2 e 3, le violazioni previste come reato dalle leggi comprese nell'elenco allegato al presente decreto legislativo e da ogni altra disposizione in materia di produzione, commercio e igiene degli alimenti e delle bevande, **nonché di tutela della denominazione di origine dei medesimi**, fatta eccezione per i reati previsti dal codice penale e dagli articoli 5, 6 e 12 della legge 30 aprile 1962, n. 283, e successive modificazioni ed integrazioni.

9) Legge 10 aprile 1954, n. 125, recante "Tutela delle denominazioni di origine e tipiche dei formaggi"; Decreto del Presidente della Repubblica 12 luglio 1963, n. 930, recante "Norme per la tutela delle denominazioni di origine dei mosti dei vini"; Legge 4 novembre 1981, n. 628, recante "Norme relative alla tutela della denominazione d'origine e tipica del prosciutto veneto berico-euganeo"; Legge 30 maggio 1989, n. 224, recante "Tutela della denominazione di origine del salame di Varzi delimitazione della zona di produzione e caratteristiche del prodotto"; Legge 12 gennaio 1990, n. 11, recante "Tutela della denominazione di origine del prosciutto di Modena delimitazione della zona di produzione e caratteristiche del prodotto"; Legge 13 febbraio 1990, n. 26, recante "Tutela della denominazione di origine Prosciutto di Parma"; Legge 14 febbraio 1990, n. 30, recante "Norme in materia di Denominazione di origine del prosciutto di San Daniele"; Legge 10 febbraio 1992, n. 164, recante "Nuova disciplina delle denominazioni d'origine dei vini".

#### Conclusioni

Sono passati esattamente dieci anni da quando il legislatore con l'art. 1 del D.Lgs. 30.12.1999, n. 507 (8), puntando sulla più rapida e snella risposta sanzionatoria di carattere amministrativo, depenalizzava le già esistenti, sia pur frammentarie, norme penali poste a tutela i prodotti agroalimentari a IG o DO (9). Con l'introduzione dell'art. 517-quater c.p., si registra un dietrofront strategico nella tutela delle IG o DO. Una scelta di campo condivisibile, se non fosse che il nuovo art. 517-quater c.p., per come è stato strutturato, rischia di non raggiungere l'obiettivo perseguito.

Con le osservazioni svolte in questo breve lavoro si è cercato di rimarcare il perimetro delle IG e DO al fine di dimostrare che le stesse sono segni distintivi insuscettibili di divenire oggetto di contraffazione o alterazione, intese in senso tecnico; a meno che non si voglia sostenere l'assunto secondo cui, nell'ambito dello stesso codice penale, le condotte di contraffazione o alterazione dei segni distintivi possono esplicarsi in maniera differente.

(Fine)

**NFI**  
**CENTRO STUDI DELL'ALIMENTAZIONE**  
**NUTRITION FOUNDATION OF ITALY**

**Convegno Internazionale**

**"NOVEL FOODS AND NOVEL FOODS INGREDIENTS"**  
*Sviluppi normativi e scientifici in materia di nuovi alimenti ed ingredienti*

**Milano, 9 Luglio 2010**

**Aula Magna, Università degli Studi di Milano, Via Festa del Perdono 7**

**Programma**

**10.15 APERTURA DEI LAVORI E NOTE INTRODUTTIVE**

**Rodolfo PAOLETTI** (Presidente, NFI - Nutrition Foundation of Italy)

**10.30 I SESSIONE: RUOLI E ATTIVITA' DELLE ISTITUZIONI EUROPEE**

**Paola TESTORI COGGI** (Direttore Generale per la Salute e i Consumatori , DG SANCO, Commissione Europea)

**Wolfgang GELBMANN** (Senior Scientific Officer, Panel on Nutrition, Dietetic Products and Allergy, European Food Safety Authority – EFSA)

**12.00 II SESSIONE: RUOLI E ATTIVITA' DELLE ISTITUZIONI ITALIANE**

Moderatore: **Andrea POLI** (Direttore scientifico, NFI - Nutrition Foundation of Italy)

**Bruno SCARPA** (Direttore, Ufficio IV – Alimenti Particolari e Integratori; Direzione Generale Sicurezza Alimenti e Nutrizione; Dipartimento S.P.V.N.S.A., Ministero della Salute )

**Pier Davide LECCHINI** (Consigliere Salute Pubblica, Farmaceutici e Derrate Alimentari, Rappresentanza Permanente d'Italia presso l'Unione Europea)

**Agostino MACRÌ** (Direttore del Dipartimento di Sanità Alimentare e Animale, Istituto Superiore di Sanità)

**14.30 III SESSIONE IL PUNTO DI VISTA DEI CONSUMATORI E DELLE AZIENDE**

**Anna BARTOLINI** (Docente dell'Università IULM di Milano per il Corso di Laurea Specialistica "Il Diritto dei Consumatori e l'Europa")

**Gianni CAVINATO** (Presidente dell'Associazione Consumatori Utenti – ACU, in rappresentanza del Consiglio Nazionale dei Consumatori e degli Utenti - CNCU, Ministero dello Sviluppo Economico)

**Daniele ROSSI** (Direttore FEDERALIMENTARE – Federazione Italiana dell'Industria Alimentare)

**Nicola CALZOLARO** (Direttore ANICAV - Associazione Nazionale Industriali Conserve Alimentari Vegetali)

**Claudio RANZANI** (Direttore Generale ASSITOL – Associazione Italiana dell'Industria Olearia)

**16.00 IV SESSIONE: DIBATTITO GENERALE**

Moderatore: **Vittorio SILANO** (Presidente, Comitato Scientifico, European Food Safety Authority -EFSA)

17.00 CONCLUSIONI DEI LAVORI

**Quota di iscrizione - € 270,00 ( € 225,00 + IVA 20%):** Le iscrizioni dovranno essere comunicate a NFI entro il 25 giugno 2010.

**Per ulteriori informazioni:**

**NFI – Nutrition Foundation of Italy**

**Viale Tunisia 38 - 20124 Milano**

**Tel. 02 76399532 - Fax 02 25060035**

**E-mail: [meeting@nutrition-foundation.it](mailto:meeting@nutrition-foundation.it); Website: [www.nutrition-foundation.it](http://www.nutrition-foundation.it)**

# TRATTAMENTO, UTILIZZO E VALORIZZAZIONE DEL SIERO DI LATTE NEL RISPETTO DELL'AMBIENTE

CONVEGNO 26 e 27 Febbraio 2010 Cioffi di Eboli - Salerno

ASL SALERNO E ORDINE DEI MEDICI VETERINARI DI SALERNO

## CONSUNTIVO

Come Direttore Scientifico del Convegno mi compete il gravoso compito di riportare i risultati delle numerose relazioni presentate, nel tentativo riassumerne il significato.

Come è noto, nel nostro territorio campano e più specificatamente nella Provincia di Salerno il problema relativo alla gestione dei sottoprodotti dell'industria casearia bufalina, di cui siero e scotta rappresentano i principali effluenti ma non i soli, determinano un problema non risolto, di grande interesse sociale perché condiziona l'economia di tutto il territorio della Piana del Sele.

Nella fase di programmazione del Convegno mi sono preoccupato di inserire relatori esperti per gli aspetti sanitari relativi alla gestione del comparto zootecnico e caseario, esperti di processi di valorizzazione del siero di latte, industrie che già operano nella lavorazione industriale del siero e nella commercializzazione dei prodotti finiti.

Ho anche cercato di portare esperienze dirette di trattamento del siero sia a livello nazionale che internazionale.

Tutto questo nell'intento di fornire ai veterinari una informazione a 360° su tutta la filiera di nostro interesse che include Agricoltura-Zootecnica-Industria, ma anche con la debole speranza di passare dalla formazione alla traduzione pratica del problema, con proposte concrete adatte per il nostro territorio.

Come abbiamo riportato nella locandina di programma, il Convegno è stato programmato soprattutto per fornire ai veterinari specializzati che sono presenti in tutte le realtà produttive locali di filiera (campo agricolo, stalla, caseificio), il massimo di informazione tecnica e aggiornamenti normativi e sanitari sul tema, in modo da raccogliere gli elementi tecnici per passare "eventualmente" alla fase di progettualità e realizzazioni future.

A conclusione del lavoro posso ben dire che i risultati raggiunti sono andati ben oltre le mie aspettative e quelle dei miei colleghi del corpo veterinario di Salerno e dell'ASL SA/3.

Fare un resoconto puntuale di tutte le relazioni presentate sarebbe impossibile vista la ricchezza degli interventi che si sono succeduti.

Anche l'ordine delle tre Sessioni in cui si è articolato il Convegno:

1) Aspetti Sanitari; 2) Tecnologia e Normativa nel comparto siero; 3) le industrie di settore, è stato

leggermente modificato per le esigenze di alcuni relatori, ma i contributi sono arrivati lo stesso.

Gli aspetti sanitari, i pericoli microbici e chimici dei sottoprodotti caseari sono stati discussi dal (Prof. Giaccone Univ. PD), la chimica e le tecnologie applicate sul siero sono state discusse dalla Prof. Luisa Pellegrino Univ. MI) mentre il tema relativo agli aggiornamenti sulle nuove disposizioni comunitarie sullo smaltimento dei reflui caseari è stato presentato dal Dr. Borrello del Ministero della salute (RM).

Tutti i relatori intervenuti nel convegno sono stati concordi nel giudicare il siero di latte una importante risorsa economica per l'azienda che lo produce e non un ingombrante rifiuto del comparto zootecnico-caseario.

Nessuno vuole contestare l'utilizzo zootecnico del siero, ma per questo comparto non mancano certo reflui di produzione casearie, utilizzare il siero di qualità per questo scopo sembra proprio uno spreco, che non risolve l'impatto ambientale derivante dalle deiezioni degli animali, in particolare dei maiali.

Il Convegno ha spaccato come una folgore le tenebre costituite dal ritardo culturale della nostra industria casearia, che ha sempre considerato il siero di latte un rifiuto scomodo di cui si doveva liberare al più presto.

Il siero è una risorsa importante come il nostro latte di bufala campana, la cui valorizzazione commerciale potrebbe rilanciare il nostro comparto produttivo e la nostra tribolata economia locale.

Per il bene della nostra terra produttiva, operosa e ricca di storia e di cultura agronomica DOBBIAMO fare in modo che tutta la mole di lavoro emerso dal Convegno, costato lavoro organizzativo e impegno della ASL SA/3, non si disperda nel nulla, ma rappresenti una solida base scientifica per uscire definitivamente dalle tenebre del passato.

Ho già messo in atto la procedura di raccolta delle relazioni scritte presentate al Convegno, per le quali chiedo la collaborazione di tutti i relatori, per farne un volume da distribuire e divulgare.

Fino ad ora abbiamo seminato e continuiamo a farlo per poter raccogliere frutti preziosi come quelli che ci regala la nostra terra meravigliosa, grazie al nostro sapiente e instancabile lavoro di tutti i giorni.

Sarebbe un guaio se dopo tanto "tuonare" non cadesse una goccia d'acqua.

Claudio Mucciolo

# I PERICOLI MICROBICI E CHIMICI NEI SOTTOPRODOTTI DELL'INDUSTRIA CASEARIA: AGGIORNAMENTI E APPROFONDIMENTI

**Valerio Giaccone** - Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata e Igiene veterinaria, Facoltà di Medicina veterinaria, Università degli Studi di Padova

Quando si parla di industria casearia, il primo sottoprodotto (chiamiamolo ancora così per qualche momento ...) su cui si centra la nostra attenzione è il siero di caseificazione, per la grande massa liquida che deriva da ogni ciclo di produzione di formaggio.

Per avere una minima idea di quanto abbondante sia la produzione di siero, negli Stati Uniti dati del 1998 riferiscono che ogni anno nella confederazione americana si producevano oltre 35 milioni di tonnellate di siero di caseificazione (Bohnert, 1998). Negli ultimi anni l'approfondirsi delle conoscenze e il perfezionarsi delle tecnologie applicate alle produzioni alimentari ci hanno letteralmente fatto spalancare gli occhi su questo derivato della caseificazione che sempre più si conferma come fonte di preziosi componenti del latte. Non si tratta più, quindi, di un sottoprodotto della lavorazione dei formaggi, ma di un vero co-prodotto che può fungere da materia prima da cui ricavare componenti del latte che torneranno poi utili per altri alimenti. Da qualche anno a questa parte è invalsa l'abitudine di aggiungere il siero o alcune sue frazioni a una varietà di alimenti, cosmetici e prodotti farmaceutici (Scott, 1986). L'aggiunta di siero alle cagliate di formaggio ne aumenta le rese, accresce il loro valore nutritivo e permette di tenere meglio sotto controllo le caratteristiche fisiche di tessitura (Hinrichs, 2001).

Ma quali pericoli potrebbe comportare un siero di caseificazione per la salute umana, qualora venisse impiegato come materia prima per la produzione di altri alimenti?

La professoressa Pellegrino, intervenuta prima di me, ha illustrato quali sono le caratteristiche fisico-chimiche compositive del siero di caseificazione e le implicazioni tecnologiche che portano alla sua gestione nei processi di lavorazione casearia.

A me spetta il compito di richiamare in sintesi quali possono essere, appunto, i pericoli microbici e chimici che il siero di caseificazione può avere in sé, facendo il punto delle attuali conoscenze. Tratteremo più dei pericoli microbiologici che di quelli chimici, dal momento che in letteratura abbiamo qualche dato in più sui primi e molti di meno sui secondi.

La microecologia del siero (d'ora in avanti lo chiamerò così) è condizionata direttamente dal processo di caseificazione e, per via indiretta, dalla flora microbica che arriva in caseificio con il latte crudo. Al variare del processo produttivo, potranno cambiare gli effetti che la trasformazione può avere sulle caratteristiche microbiologiche del semilavorato e di conseguenza del siero.

Per essere più chiari, se il latte è messo in produzione allo stato crudo saranno le fasi successive della

caseificazione a condizionare la flora microbica che residua nel siero e in quest'ultimo potrebbe ancora esserci traccia di batteri patogeni che erano presenti nel latte crudo. Se, invece, si parte da un latte pastorizzato per fare il formaggio, le flore microbiche che arriveranno al siero saranno essenzialmente quelle che si sono raccolte in esso durante la lavorazione, con predominio delle microflore che derivano dalle superfici di lavoro, intendendo con questo termine non solo gli apparecchi e gli utensili di lavoro, ma anche le mani dei lavoratori che possono trasferire al prodotto una serie di generi microbici, tra cui anche alcuni agenti di malattia alimentare.

E superfluo sottolineare che centerò la mia attenzione soprattutto sui microrganismi patogeni, ossia i batteri agenti di malattia alimentare.

## 1. Microecologia dei patogeni nel latte destinato a produzione casearia

Per nostra sfortuna, il latte crudo è un substrato esposto a molti inquinamenti microbici; bisogna, però, sfatare la convinzione che esso sia un terreno di coltura ideale per la proliferazione di batteri patogeni, perché non sempre questi trovano nel latte le condizioni di vita ideali per crescere. Dipende, piuttosto, dalle circostanze e dal patogeno che prendiamo in considerazione.

Il latte crudo, infatti, contiene enzimi che hanno effetto antimicrobico (lisozima, lattoferrina e lattoperossidasi); questi sono in grado di stabilizzare la flora microbica del latte per almeno 4-6 ore dopo la raccolta. Essendo gli enzimi delle proteine, più il latte è ricco di proteine, più sarà lungo questo effetto di stabilizzazione iniziale delle flore microbiche.

Il latte, inoltre, contiene un solo zucchero, il lattosio, e non tutti gli agenti patogeni sono in grado di utilizzarlo come fonte di energia per la loro moltiplicazione. Tra le enterobatteriacee, infatti, si distinguono quelle che sono in grado di utilizzarlo (i coliformi) e quelle che non ne sono capaci (enterobatteri non lattosio-fermentanti). *Escherichia coli* quindi i suoi sierotipi verocitotossici (VTEC) a partire da 0157:H7 sono in grado di metabolizzare il lattosio mentre *Salmonella enterica* non ne è capace; nemmeno i *Campylobacter* termotrofi enteropatogeni sono in grado di utilizzare il lattosio, per cui tra i tre principali agenti di malattia alimentare quello che potrebbe in teoria duplicare con facilità nel latte crudo sono proprio i ceppi VTEC di *E.coli*.

Non va però dimenticato che i tre patogeni sopra indicati sono anche mesofili se non addirittura termotrofi: ciò significa che non sono in grado di duplicare se la temperatura del mezzo scende sotto 100 (*E. coli* VTEC e *Campylobacter*) o sotto i 7°C (*Salmonella enterica*). Lo stesso si può dire anche per i

ceppi enterotossici di *Staphylococcus aureus*, che invece è in grado di metabolizzare il lattosio.

*Listeria monocytogenes*, invece, è in grado di duplicare (seppure lentamente) anche fino a 4°C per cui le condizioni ambientali cui il latte può essere sottoposto tra la mungitura e le successive fasi di sosta e trasformazione possono solo rallentarne la moltiplicazione, ma non arrestarla del tutto.

## 2. Come i patogeni arrivano a inquinare il latte crudo

In generale, la flora microbica del latte crudo (batteri patogeni compresi) si forma per effetto di due differenti meccanismi:

(1) gli inquinamenti che a ogni fase di mungitura raggiungono il latte, a partire dall'interno della mammella per arrivare alla sua raccolta in cisterna, passando per la mungitura vera e propria e il flusso del latte nei vasi di raccolta e nelle condutture,

(2) le modificazioni che intervengono all'interno della flora microbica che si è raccolta nel latte. I differenti gruppi di microrganismi competono fra loro per la sopravvivenza e tutti insieme subiscono l'influsso delle condizioni di mantenimento che l'uomo impone al latte, a partire dal raffrescamento o dal mantenimento a temperatura ambiente.

Nel latte di massa, quindi, la flora microbica da un lato aumenta progressivamente di carica e dall'altro si modifica di composizione; al suo interno, singoli gruppi di batteri possono prendere il sopravvento sugli altri in base alle caratteristiche del latte stesso e alle condizioni di conservazione imposte dall'uomo.

Va ricordato, infatti, che il latte è un substrato molto aerobio in condizioni naturali: al suo interno è favorita la moltiplicazione dei microrganismi nettamente aerobi (*Pseudomonas*, muffe, alcuni lieviti) mentre altri gruppi microbici anaerobi facoltativi o anaerobi stretti trovano difficoltà a moltiplicare, come capita per i batteri lattici, le enterobatteriacee e i clostridi.

Inoltre, buona parte dei microrganismi non è in grado di superare trattamenti termici superiori ai 70°C per 30-60 secondi e altri muoiono già quando il latte è sottoposto a una termizzazione. Solo i batteri più termodurici, come i batteri lattici e le micrococccacee possono sopravvivere in un latte pastorizzato. Inoltre, se il trattamento supera gli 80°C per alcune decine di secondi, nel latte finiscono per essere presenti solo le spore di *Bacillus* e *Clostridium* che, sotto l'effetto del calore, sono indotte a germinare. Se si sottopone, quindi, il latte a un forte trattamento termico oltre gli 80°C per alcuni secondi, quello che otterremo è un alimento praticamente sterile, ma al suo interno potranno essere presenti forme vegetative di *Clostridium* e di *Bacillus* nate proprio dalla germinazione delle spore.

Per quanto riguarda i batteri patogeni, il processo di pastorizzazione del latte è tarato sulla soglia di morte termica di *Listeria monocytogenes* che, fra tutti gli agenti di malattia alimentare, è il più termodurico. Di conseguenza, se il processo termico è applicato ad arte,

abbiamo la probabilità che una carica iniziale del batterio possa essere ridotta di almeno 5 o 6 gradi logaritmici. Poiché tutti gli altri agenti di malattia alimentare sono meno termoresistenti di *L. monocytogenes*, un trattamento che sia in grado di inattivare efficacemente quest'ultima sarà ben più efficace anche nei confronti dei primi.

Una piccola parte dei patogeni può essere presente in basse cariche già all'interno della mammella, soprattutto se la ghiandola è colpita da una mastite specifica in forma clinicamente poco evidente. Il latte che esce dal capezzolo della lattifera, quindi, potrebbe già contenere cariche più o meno consistenti di batteri quali *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* o *Listeria monocytogenes*, visto che tutti questi batteri sono agenti di mastite, se pure con incidenza decisamente differente da un agente patogeno all'altro.

Una parte consistente di patogeni può raggiungere il latte crudo al momento della mungitura per effetto di inquinamenti ambientali più o meno banali o specifici; al momento della mungitura, infatti, nel latte possono confluire piccole quantità di batteri che arrivano dal mantello dell'animale o dall'aria dell'ambiente dove si effettua la mungitura.

Sulla cute dell'animale possono essere presenti anche tracce di feci, per cui nel latte possono confluire batteri patogeni che derivano:

(1) dal contenuto intestinale della lattifera (*Salmonella enterica*, *Campylobacter* termotrofi patogeni, ceppi verocitotossici di *E. coli*)

(2) dall'ambiente dove l'animale è tabulato (*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, spore di *Bacillus cereus* e di *Clostridium* (*C. perfringens* e persino *clostridium botulinici*).

Infine, il latte può essere inquinato da batteri patogeni che provengono dalle apparecchiature e dagli utensili utilizzati per la mungitura e la successiva destinazione del latte fino alle cisterne di raccolta. In questo caso, le specie microbiche pericolose che possono arrivare al latte sono essenzialmente quelle riportate al precedente punto 2).

Se un batterio patogeno inquina il latte, in quale carica può farlo? Non è per niente facile rispondere a una domanda del genere. Si possono azzardare delle cifre per quanto concerne il secreto di ogni singola mammella di un animale, ma diventa molto difficile stabilire delle cariche su 1 millilitro di un latte di massa, nel quale l'inquinamento portato da una sola mammella o da un evento inquinante sporadico viene poi diluito in misura più o meno consistente secondo la massa di latte che abbiamo di fronte.

Per fornire qualche dato, comunque, possiamo dire che per quanto riguarda almeno *Staphylococcus aureus* e *Brucella* spp., ogni ghiandola mammaria di una lattifera affetta da mastite specifica può produrre un latte che contiene tra le 10 e le 5.000 ufc/ml, con un andamento molto variabile e a ondate più o meno cicliche. Non abbiamo dati analoghi per gli altri patogeni alimentari.

Se però consideriamo un assioma generale, si può concludere che nella maggior parte dei casi quando un batterio patogeno inquina una matrice come il latte, lo fa in cariche quasi sempre molto ridotte, stimabili nell'ordine di 0,1 - 10 ufc/m.

Una delle principali fonti di inquinamento del latte crudo da parte dei principali agenti di malattia alimentare resta, quindi, il corpo della lattifera; di conseguenza, sulla qualità igienico-sanitaria del latte crudo destinato a caseificazione incide in misura consistente la prevalenza dei portatori asintomatici di *Salmonella enterica*, *Campylobacter* patogeni ed *Escherichia coli* VTEC fra gli animali produttori. Quali sono i dati che abbiamo al riguardo?

### 3.1. PORTATORI ASINTOMATICI TRA LE VACCHE DA LATTE

In primo luogo bisogna annotare che in bibliografia i dati reperibili si riferiscono quasi tutti alle vacche da latte; non risultano dati approfonditi sulla prevalenza di soggetti portatori di *E. coli* verocitotossici, *Salmonella enterica* o *Campylobacter* fra le lattifere di altre specie; abbiamo qualche dato sporadico, ma ottenuto su numeri piuttosto esigui di animali.

Prendendo in esame questi valori nel loro complesso, si può affermare che tra le vacche da latte in produzione i capi portatori di *E. coli* VTEC sono presenti con prevalenze decisamente maggiori di quelli dei capi che eliminano con le feci *Salmonella enterica*.

I valori che si desumono dalla bibliografia variano parecchio da un paese all'altro e anche da un anno all'altro all'interno dello stesso paese, per cui preferisco esporli con maggiori dettagli nelle pagine che seguono.

Al contrario, non abbiamo dati specifici sulla prevalenza di capi diffusori di *Campylobacter* patogeni con le feci, anche se è presumibile che le vacche e le altre lattifere possano veicolare anche questi patogeni con le loro feci. Per quanto riguarda *Listeria monocytogenes*, gli unici valori di cui disponiamo per l'Italia sono quelli pubblicati da Giaccone e coll. (2009); da essi desumiamo che nel nostro paese la prevalenza di *L. monocytogenes* fra le vacche da riforma che arrivano al macello è stimabile nel 21% dei capi, un valore equiparabile a quello della Spagna. Tutto porta a ipotizzare, quindi, che anche *L. monocytogenes* possa giungere a inquinare il latte con una certa probabilità al momento della mungitura.

In generale, quindi, possiamo affermare che il latte crudo di vacca è mediamente più esposto agli inquinamenti da ceppi verocitotossici di *E. coli* e di *Listeria monocytogenes* e con probabilità molto inferiore agli inquinamenti da *Salmonella enterica* e ceppi enteropatogeni di *Campylobacter*.

#### Per quanto riguarda i ceppi VTEC di *Escherichia coli*...

In uno studio condotto in Danimarca si è stimato che le vacche da latte in quel paese risultavano portatrici del batterio in prevalenza del 2,4% su 957 capi testati

(Nielsen *et al.*, 2002). Dati decisamente superiori si possono rilevare, invece, in Spagna: Bianco e coll. (1997) hanno riscontrato tassi praticamente simili tra vitelli e vacche da latte (37% e 35%, rispettivamente). *Vice versa*, le vacche da latte risultano relativamente poco sovente portatrici di *E. coli* VTEC in Australia (il 7,5% di 294 vacche esaminate) (Cobbold e Desmarchelier, 2000). In Olanda i dati di un autore anonimo riferiscono nel 2006 fanno riferimento alle positività di allevamento piuttosto che di singoli capi, facendo rilevare una prevalenza del 5,1% degli allevamenti esaminati positivi per VTEC (Anonimo, 2006).

Per quanto riguarda gli Stati Uniti, va detto che in quel paese sono stati condotti negli ultimi 20 anni estese indagini epidemiologiche sulla diffusione dei capi portatori di *E. coli* VTEC tra i bovini, sia da carne che da latte, con un netto sbilanciamento dei controlli sui bovini da carne rispetto alle vacche da latte.

A ogni modo, possiamo dire che nel 1998 Hancock e collaboratori avevano segnalato prevalenze del 2,3% di 1097 vacche da latte come portatrici di *E. coli* VTEC.

Nel 2006 LeJeune e coll. hanno segnalato prevalenze molto inferiori, stimabili nello 0,7% di 770 capi da latte esaminati.

Sempre in quell'anno, in Minnesota Cho e coll. (2006) su un totale di 2.208 vacche da latte hanno rilevato una prevalenza del 3,2%, mentre l'anno successivo Doane e coll. (2007), analizzando le feci di 408 vacche di 8 differenti allevamenti, hanno trovato una prevalenza di portatori del 3,9%.

Spostandoci in Canada, nello stato dell'Alberta, le vacche da latte risultano portatrici del patogeno in prevalenza decisamente basso (2%) mentre Wilson e coll. (1998) nell'Ontario su 886 vacche di 80 differenti allevamenti hanno rilevato una prevalenza di positivi pari al 36%.

Per quanto riguarda il continente europeo, in Italia Bonardi e coll. (1999) hanno riscontrato prevalenze del 16,1% nelle vacche da latte. In Norvegia, su 680 vacche controllate, LeJeune e coll. (2006) non ne hanno trovata nemmeno una positiva.

In Svizzera Kuhnert e coll. (2005) hanno esaminato le feci di 892 vacche da latte, con una prevalenza del 4,6% di *E. coli* VTEC.

#### Per quanto riguarda *Salmonella enterica*

i dati della bibliografia sono notevolmente più ridotti rispetto ai ceppi VTEC di *E. coli*. Negli USA Rodriguez e coll. (2006) hanno saggiato in complesso 480 vacche trovando positive per *Salmonella* lo 0,4% di esse. Nello stato di Alberta (Canada) Van Donkersgoed e coll. (1999) avevano esaminato 654 bovine da latte evidenziando il batterio nello 0,2% dei casi. Nel 2006, In Gran Bretagna, in un'indagine che ha coinvolto 200 bovine macellate in 7 stabilimenti inglesi, Madden e coll. (2006) hanno rilevato una prevalenza del 3,0%.

### 3. Destino dei patogeni alimentari nel siero di caseificazione

Il siero che deriva dalla produzione del formaggio può avere caratteristiche di acidità molto differenti secondo che si tratti di siero dolce, appena dopo la fase di spurgo e sineresi della cagliata, o siero acido destinato a essere aggiunto come siero-innesto al latte per la produzione di formaggi duri quali il Parmigiano-Reggiano o il Grana Padano.

Nel primo caso, il siero ha un pH che mediamente si aggira intorno al 5,5 mentre nel secondo i processi di acidificazione operati dalla flora lattica possono fare abbassare il pH del siero fino a 3,5 o anche meno.

E' evidente che i batteri patogeni avranno un destino differente secondo la matrice in cui verranno a trovarsi.

In base al valore di acidità cui possono sopravvivere e anche moltiplicare, i microrganismi si suddividono in acidodurici e non acidodurici. I primi riescono a moltiplicare anche al disotto di pH 4,5 e fino a pH 3,5 mentre i secondi smettono di duplicare se il pH del mezzo scende sotto 4,5. Tutti i batteri agenti di malattia alimentare sono non acidodurici; ciò significa che immessi in un substrato con un pH inferiore a 4,5 non sono in grado di moltiplicare.

Questo è già un fatto degno di importanza: abbiamo visto prima, infatti, che quasi sempre i patogeni arrivano a inquinare il latte e il siero in cariche molto ridotte. Il pericolo di avere un episodio di malattia diventa concreto quando la carica del patogeno supera le  $10^4$  -  $10^5$  ufc/ml; ciò significa che il batterio, prima di diventare concretamente pericoloso deve poter moltiplicare nel siero e questo non è facile che accada, non solo per il pH del mezzo, ma anche per l'effetto concomitante di altri fattori, quali soprattutto la presenza di un'elevata carica di batteri lattici.

E' ben nota e documentata l'azione antimicrobica dei batteri lattici diretta contro i microrganismi alteranti e anche contro quelli agenti di malattia alimentare, ma gli effetti di questi antibiotici naturali non sono sempre così ben netti e sicuri.

Risultati di prove sperimentali condotte sia *in vitro* che con sistemi informatici di modellazione microbica predittiva portano a ipotizzare che le batteriocine possano avere solo un effetto transitorio sulla crescita di *L. monocytogenes*, effetto che sovente è seguito da una ripresa di crescita del batterio (Davies *et al.*, 1996). Questo effetto potrebbe essere dovuto a concentrazioni troppo basse della batteriocina, insufficienti per un effetto battericida duraturo; non si può neanche escludere che sulla scarsa efficacia della nisina agiscano fattori chimico-fisici come un pH alcalino (Liu e Hansen, 1990), la presenza di sale (Bell e De Lacy, 1985) o di grassi (Jung *et al.*, 1992) che potrebbero attenuare l'efficacia della batteriocina o indurre la persistenza di cellule batteriche resistenti alla nisina, secondo il principio dell'antibiotico-resistenza indotta (Chi-Zhang *et al.*, 2004).

### 4. Interazioni tra siero di caseificazione e batteri patogeni

In Argentina, Gallo e coll. (2007) hanno studiato come il pH del siero, la temperatura di mantenimento e l'aggiunta di nisina possono interagire nel tenere a freno la crescita di *Listeria innocua*, presa a modello sperimentale in sostituzione della ben più pericolosa *Listeria monocytogenes*. Gli autori argentini hanno saggiato tre differenti valori di pH del siero (5,5 - 6,0 - 6,5), due temperature di mantenimento (7° e 20°C) e l'aggiunta al siero di due differenti dosi di nisina (100 e rispettivamente 300 UI di nisina per ml di siero).

Com'era da prevedere, l'effetto antimicrobico nei confronti di *Listeria innocua* era tanto maggiore quanto più elevate erano le dosi di nisina; questo effetto tendeva ad aumentare se il siero era mantenuto a 7°C anziché a 20°C e aumentava man mano che il pH del siero passava da 6,5 a 5,5.

La nisina è una batteriocina prodotta da ceppi di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, per cui là dove ci sia un'intensa proliferazione di questo specifico batterio lattico si può contare anche sulla sua azione antimicrobica, diretta soprattutto verso i batteri Gram positivi, quali *L. monocytogenes* e *Bacillus cereus* (Abee *et al.*, 1994; Wincowski *et al.*, 1994; Breukink *et al.*, 1997; Jaquette e Beuchat, 1998; Montville *et al.*, 1999). Poiché la nisina è anche uno dei pochi antibiotici naturali ammessi come additivo alimentare, gli stessi effetti protettivi si potrebbero ottenere aggiungendo direttamente la batteriocina al siero.

Per quanto riguarda i dubbi sulla reale efficacia delle batteriocine nel riuscire a inattivare gli agenti di malattia alimentare o a frenarne la proliferazione, si veda però quanto annotato più sopra.

Negli USA Marek e coll. (2004) hanno saggiato la sopravvivenza di *Escherichia coli* 0157:H7 in siero di formaggio cheddar pastorizzato e non pastorizzato, effettuando prove di inoculazione sperimentale.

Seguendo in modo assai preciso i criteri per l'impostazione di un valido *challenge test*, essi hanno preparato una miscela di 5 ceppi di *E. coli* 0157:H7 e li hanno inoculati in siero di cheddar fresco dolce (sia non pastorizzato che pastorizzato), a pH 5,5. Gli autori hanno fatto in modo che il batterio fosse presente nel siero in cariche sia alte che relativamente basse (rispettivamente pari a  $10^5$  e  $10^2$  ufc/ml). I campioni sono stati conservati a 4°, 10° e 15°C poi, a distanza di 0, 1, 4, 7, 14, 21 e 28 giorni i ricercatori hanno determinato sia le cariche residue del batterio che la conta dei batteri lattici.

I risultati ottenuti hanno rivelato che a tutte e tre le temperature *E. coli* 0157:H7 sopravviveva in misura significativamente maggiore nel siero pastorizzato rispetto a quello non pastorizzato. A 10° e 15°C il patogeno tendeva a crescere in modo significativo nella prima settimana di conservazione, per poi ridursi di carica nelle tre settimane successive. I ceppi inoculati

nel siero non pastorizzato, invece, facevano segnare una forte riduzione di carica sin dal primo giorno dopo l'inoculazione, segni che nel siero non pastorizzato erano presenti fattori antimicrobici determinanti. A tutte e tre le temperature di conservazione saggiate, i ceppi verocitotossici di *E. coli* sono sopravvissuti fino a 21 giorni nel siero pastorizzato e in quello non pastorizzato, se pure in cariche molti differenti. L'efficacia antimicrobica del siero non pastorizzato è stata individuata essenzialmente nella abbondante microflora lattica del siero non pastorizzato, di molto ridotta in quello pastorizzato. Gli studiosi statunitensi hanno infatti calcolato che nei campioni di siero non pastorizzato la carica iniziale di batteri lattici era pari a circa  $10^7$  ufc/ml ma che essa tendeva poi, logicamente, a ridursi man mano che passavano i giorni di conservazione, fino a ridursi al 28° giorno a non più di  $10^3$  ufc di batteri lattici per ml di siero.

In definitiva, quindi, si può ipotizzare che se nel latte crudo è presente in partenza un ceppo verocitotossico di *E. coli* il suo destino nel siero non pastorizzato non è molto roseo, vista la notevole presenza di batteri lattici, ma se il patogeno è presente in cariche piuttosto rilevanti (superiori almeno alle 100 ufc/ml) può avere qualche *chance* di sopravvivenza, man mano che il siero invecchia e la carica dei lattici diminuisce.

Nel caso del siero pastorizzato, invece, non è concretamente ipotizzabile che un *E. coli* 0157:H7 possa sopravvivere alla pastorizzazione del siero, ma se il prodotto è inquinato dal batterio nelle fasi successive, le sue speranze di sopravvivenza sono decisamente maggiori che non nel siero non pastorizzato.

E altrettanto evidente che l'adozione di buone misure igieniche per la gestione del siero dopo lo spurgo possano tornare utili per ridurre il più possibile questo pericolo.

##### **5. Un fattore da tenere in considerazione: la *Acid Tolerance Response***

I batteri agenti di malattia alimentare, di rado sono un rischio concreto per la salute umana se prima non raggiungono, nell'alimento, cariche piuttosto o molto consistenti, almeno superiori alle  $10^4$  o addirittura  $10^6$  ufc/g. Posto che, come ho annotato prima, i patogeni arrivano a inquinare gli alimenti quasi sempre in cariche molto contenute (addirittura inferiori a 1 cellula microbica per grammo o millilitro di prodotto), è giocoforza che un batterio pericoloso per la salute trovi nell'alimento condizioni ambientali sufficienti per moltiplicare.

Il valore di acidità del substrato (pH) è uno dei fattori più importanti nel favorire o impedire la proliferazione microbica. Sappiamo, infatti, che gli agenti di malattia alimentare non riescono a duplicare quando il pH dell'alimento è inferiore a 4,5; se però altri fattori come l'attività dell'acqua libera (*Aw*) si allontanano dal loro valore ottimale (0,999 nel caso della *Aw*) riducendosi, la soglia di acidità che riesce a bloccare la duplicazione batterica si alza, per cui possono bastare anche pH inferiori a 5,0 per annullare la crescita di un patogeno.

Questo porta a considerare il valore di pH degli alimenti uno dei più importanti CCP sui quali fare perno per tenere sotto controllo la proliferazione di pericoli microbici negli alimenti.

Anche il siero di caseificazione ha valori di pH che potrebbero costituire, di per sé, un valido blocco alla moltiplicazione batterica, ma prima di trarre delle conclusioni che potrebbero risultare non esatte occorre riflettere sulle capacità di adattamento dei batteri alle condizioni ambientali avverse e, in particolare, all'acidità del substrato.

Da alcuni anni è ormai dimostrato che i microrganismi, messi in condizione di parziale acidità (intorno a 5,5 - 5,0), invece di smettere di duplicare e poi di soccombere riescono ad adattarsi alle condizioni del substrato, sviluppando una nuova, inattesa resistenza a valori di pH anche molto più acidi. Questa capacità di adattamento è stata chiamata dai ricercatori anglosassoni *Acid Tolerance Response* (ATR). Merita spendere qualche parola su questa specifica capacità di adattamento dei batteri, perché anche i patogeni possono svilupparla e quindi vanificare i ragionamenti che i tecnici fanno sull'efficacia inattivante dei composti acidi, compresi quelli presenti nel siero di caseificazione.

Nello studiare i fattori che possono contribuire alla morte o alla sopravvivenza dei batteri patogeni, non sempre teniamo presente le condizioni che si realizzano durante i processi produttivi degli alimenti assomigliano in modo più o meno marcato alle condizioni che i microrganismi trovano nell'ambiente esterno in cui la natura li ha voluti.

All'interno di un'industria alimentare, quindi, i patogeni sono esposti a condizioni che possono riprodurre le sollecitazioni che l'ambiente esterno esercita su di loro, quanto a variazioni di pH, attività dell'acqua libera (*Aw*), potenziale di ossido-riduzione ecc.

Sappiamo che i batteri, compresi gli agenti di malattia alimentare, sotto la pressione di una serie di fattori ambientali stressanti, possono sopravvivere e sviluppare, per reazione, una serie di adattamenti che li rendono appunto più resistenti alle condizioni ambientali avverse e persino più virulenti contro gli organismi animali (Shadbolt *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2002; Samelis e Sofos, 2003).

Quello che a volte non si considera, però, è che in laboratorio sovente si studiano gli effetti prodotti sulle colture microbiche da un solo fattore stressante per volta, un singolo effetto subletale. Sappiamo che uno stress subletale può indurre nei batteri patogeni un aumento di resistenza contro quel singolo stress (reazione omologa) o persino contro un altro stress (reazione eterologa) (Farber e Brown, 1990; Farber e Pagotto, 1992; Lou e Yousef, 1997; Jørgensen *et al.*, 1999; Lin e Chou, 2004).

Sovente, però, nel condurre queste valutazioni sperimentali non si considerano due aspetti che sono, invece, essenziali:

(1) gli stress subletali di solito si esercitano tutti insieme e contemporaneamente su una stessa popolazione batterica

(2) quando sono sottoposti a questi stress subletali, di solito i batteri sono già per loro natura in una fase di crescita stazionaria, il che li rende ancora più resistenti e adattabili alle condizioni avverse.

Anche l'ordine con cui si applicano i singoli stress subletali alle colture microbiche influisce sulla loro sopravvivenza. Shadbolt e coll. (2001) hanno dimostrato che esponendo cellule di *E. coli* a condizioni di acidità spinta (pH 3,5) e poi applicando uno stress osmotico (abbassando la Aw del substrato fino a 0,90) a 25°C si riusciva a ostacolare la crescita del batterio in misura più efficace che non facendo l'opposto, ossia prima agendo sulla Aw e poi acidificando il substrato.

Nel caso del siero di caseificazione, il fatto che sin dall'inizio il siero abbia un pH piuttosto o decisamente acido, secondo le condizioni, dovrebbe avere una buona efficacia antimicrobica, specialmente se poi si fa in modo di ridurre anche la attività di acqua libera del mezzo, concentrandolo o disidratandolo.

Negli studi sperimentali più recenti, però, si sta mettendo riparo a queste lacune e le prove che si conducono da qualche anno a questa parte cominciano a tenere in considerazione più parametri stressanti contemporaneamente. Le nozioni che si stanno acquisendo, di conseguenza, diventano sempre più precise e si comincia a conoscere abbastanza bene come si possono comportare le popolazioni batteriche quando si trovano in una derrata alimentare, in fase di produzione e poi durante la conservazione.

Quando puntiamo sull'azione antimicrobica degli acidi organici per tenere sotto controllo i batteri patogeni negli alimenti, dovremmo sempre valutare con cautela il loro effetto reale.

Infatti, se un batterio viene a contatto con una soluzione acquosa acidulata, in base al tipo di acido organico, alla sua concentrazione e al tempo di contatto il batterio potrebbe sviluppare una forma di resistenza agli acidi che è stata chiamata, appunto, *Acid Tolerance Response* (ATR) (Foster e Hall, 1991; Hill *et al.*, 1995).

A seguito di questo adattamento, le cellule batteriche possono diventare più resistenti non solo a condizioni di blanda acidità, ma anche a condizioni di acidità molto più marcata. In parole povere, se una popolazione di *Salmonella enterica* o di un altro patogeno alimentare è messa in condizioni di blanda acidità (pH tra 5,5 e 5,0) per alcune ore, potrebbe sviluppare una forma di resistenza a valori di pH anche nettamente più acidi (anche inferiori a 3,5) ritenute dall'uomo efficaci per tenere sotto controllo il rischio di una loro proliferazione. Il calcolo, invece, potrebbe risultare sbagliato e dare origine a una malattia alimentare apparentemente inattesa per le condizioni acide del substrato (Koo *et al.*, 2002; Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2009). Sono molti gli alimenti che per processo produttivo vanno incontro a una parziale, blanda acidificazione (prodotti di carne trasformati, prodotti

lattiero-caseari, vegetali fermentati) e una risposta adattativa del genere potrebbe essere all'origine di pericolosi episodi di malattia alimentare.

Reazioni di adattamento alle condizioni di acidità (ATR) sono state sinora documentate in vari batteri patogeni, a partire da *Listeria monocytogenes* (Gahan e Hill, 1999; Hill *et al.*, 1995; Kroll e Patchett, 1992), per passare ai ceppi verocitotossici di *Escherichia coli* (Buchanan e Edelson, 1999; Garren *et al.*, 1997; Leenanon e Drake, 2001) e a *Salmonella enterica* (Bacon *et al.*, 2003; Bearson *et al.*, 1996; Bearson *et al.*, 1998; Foster e Hall, 1990; Greenacre *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1994; Leyer e Johnson, 1992; Yuk e Schneider, 2006).

E' probabile che il tipo di acido organico presente nel mezzo influisca sul tipo di ATR che si induce nel batterio. Nel caso particolare di *Salmonella enterica*, Greenacre e coll. (2003) sono riusciti a dimostrare con prove sperimentali in vitro che l'acido acetico è più efficace dell'acido lattico nell'indurre una ATR in *Salmonella enterica* ser. typhimurium. Yuk e Schneider (2006) nel valutare la ATR di 5 differenti sierotipi di *Salmonella* in vari succhi di vegetali (mela, arancia, pomodoro) hanno dimostrato che l'acido malico era in grado di attivare nei batteri una ATR più spiccata che non l'acido citrico.

Non bisogna però dimenticare che in queste prove sperimentali appena citate, la reazione di ATR era stata ottenuta esponendo le colture batteriche alle condizioni di acidità per tempi relativamente molto brevi.

Sappiamo che la metodologia con la quale si induce la comparsa di una ATR nei batteri patogeni può influenzare in misura considerevole la risposta adattativa dei singoli microrganismi, per cui è opportuno usare cautela nel trattare qualunque considerazione in merito (Cheng *et al.*, 2003; Greenacre *et al.*, 2003; Yuk e Schneider, 2006).

Gli spagnoli Alvarez-Ordóñez e coll. (2009) di recente hanno sviluppato accurati studi sulla comparsa di risposta adattativa ATR in colture di *Salmonella enterica* ser. typhimurium per valutare se un valore di pH pari a 3,0 potesse efficacemente inattivare il batterio.

Per le loro prove, gli spagnoli hanno utilizzato colture in fase di crescita stazionaria fatte crescere in un brodo non acido (pH 7,4) e in estratto di carne (pH 6,6) e poi acidificando i due brodi portandoli a valori di pH pari a 6,4 - 5,4 - 4,5 con acido acetico, ascorbico, citrico, lattico, malico e cloridrico e poi valutando il grado di sopravvivenza e quindi di adattamento dei batteri a condizioni di pH via via più marcate, fino ad arrivare a pH 3,0. Al termine delle loro prove gli autori hanno potuto dimostrare che i batteri apparivano più resistenti a condizioni anche molto spinte di acidità quando erano stati adattati a pH intermedi nell'estratto di carne.

Anche il tipo di acidulante usato per indurre la reazione adattativa di ATR gioca un suo ruolo nella comparsa della resistenza agli acidi: l'acido citrico, l'acetico e il lattico inducono una forte ATR in *Salmonella enterica*,

mentre il malico, il cloridrico e l'ascorbico sono meno efficaci, da questo punto di vista.

I medesimi autori spagnoli ora citati hanno poi completato le proprie ricerche valutando l'influenza della temperatura di incubazione sulla comparsa di una ATR sempre in colture di *Salmonella enterica* ser. typhimurium. I risultati ottenuti hanno dimostrato che la temperatura è un fattore importante per la comparsa di ATR in *Salmonella*. Il fatto che le temperature inferiori a 10°C influenzino negativamente la comparsa di un adattamento alle condizioni di acidità del batterio confermano che il mantenimento degli alimenti a basse temperature non solo rallenta la proliferazione microbica, ma ostacola la comparsa nei batteri di una resistenza intrinseca alle condizioni di acidità (Alvarez-Ordoñez *et al.*, 2010).

Anche *Listeria monocytogenes* è in grado di sviluppare resistenza a tutta una serie di fattori ambientali avversi, se esposta a una serie di stress subletali. Il batterio, per esempio, è capace di sviluppare una ATR a valori di pH molto acidi (Koutsoumanis *et al.*, 2003; Koutsoumanis e Sofos, 2004) o al calore (Jørgensen *et al.*, 1999; Lin e Chou, 2004; Ferreira *et al.*, 2003).

Come già annotato in precedenza, il fatto di associare fra di loro più stress subletali (pH, riduzione di  $A_w$ , trattamenti termici) in varie combinazioni fra loro può influire sulla capacità di *L. monocytogenes* di adattarsi ai singoli stress. Anche l'ordine con cui i singoli stress si succedono nel processo produttivo può influenzare, in un senso o nell'altro, l'aumento di resistenza del batterio, come hanno dimostrato anche di recente Skandamis e coll. (2008).

Quello che emerge dalla bibliografia, inoltre, è che c'è una forte variabilità di reazioni tra differenti ceppi di *L. monocytogenes* nella comparsa di queste capacità di resistere alle condizioni di acidità del substrato o al calore dei trattamenti termici (Mackey *et al.*, 1990; Faleiro *et al.*, 2003; Francis e O'Beime, 2005; Lianou *et al.*, 2006).

La capacità di *L. monocytogenes* di aderire alle superfici di lavoro in un'industria alimentare può favorire un aumento della resistenza del batterio alle condizioni stressanti di acidità e/o bassa  $A_w$  e/o trattamenti termici, col risultato di selezionare ceppi microbici altamente resistenti alle condizioni stressanti imposte dall'uomo nel corso dei processi di produzione e poi di conservazione dei prodotti lattiero-caseari (Jørgensen *et al.*, 1995; Faleiro *et al.*, 2003).

## 6. Micotossine, latte e siero di caseificazione

Sono tanti i tipi di micotossine che possono contaminare i mangimi e da questi passare agli animali in allevamento e ai prodotti che da essi l'uomo ricava, a partire dal latte. Tra queste, grande attenzione è stata data in questi ultimi anni soprattutto ad aflatossine e ocratossine, per l'alto livello di tossicità e pericolosità che esse comportano per la salute umana.

In bibliografia sono numerosissime le pubblicazioni che

trattano del destino delle aflatossine dal mangime al latte e al formaggio, mentre sono relativamente pochi i lavori che documentano la ripartizione percentuale delle micotossine presenti nel latte fra massa caseosa e siero di caseificazione.

In buona parte dei lavori gli autori sono partiti da latte contaminato da micotossine per cause naturali, studiando poi la ripartizione che i composti tossici facevano segnare fra massa caseosa e siero (Kiermeier e Buchner, 1977; Applebaum e Marth, 1982; Brackett *et al.*, 1982b; Manetta *et al.*, 2009).

Solo in alcune indagini i ricercatori hanno sottoposto a caseificazione del latte che essi stessi avevano contaminato sperimentalmente con quantità note di aflatossine, per calcolarne poi la distribuzione fra cagliata e siero (Govaris *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2001; Oruc *et al.*, 2006).

Nonostante queste differenze, comunque, i dati riportati grosso modo concordano: fatta 100 la quantità di aflatossine presenti nel latte destinato a caseificazione, al termine del processo di caseificazione circa il 40% di esse resta nel siero mentre il 60% si raccoglie nella massa caseosa.

Ne desumiamo, quindi, che il siero di caseificazione potrebbe comportare rischi concreti per la salute umana qualora nel latte usato per produrre formaggio, i livelli di inquinamento da aflatossine fossero ben superiori a quelli previsti per legge dall'Unione Europea, che dal 1998 sono stati fissati in 50 ng/kg di latte.

## 7. Conclusioni

Il siero di caseificazione si sta affermando come fonte di preziosi componenti del latte, utilizzabili in vari tipi di prodotti alimentari, anche non strettamente di origine casearia. A fronte di una massa di dati ormai cospicua sulle sue caratteristiche chimiche di composizione e sulle tecniche più utili per utilizzarlo, sul piano strettamente igienico-sanitario le conoscenze che abbiamo sono ancora piuttosto limitate.

Nel siero possono in teoria confluire tutti i batteri patogeni che entrano in un'industria casearia con le materie prime (a partire dal latte) e quelli che al siero arrivano per inquinamenti di tipo "ambientale", ossia derivati dalle superfici di lavoro.

Presenza e sopravvivenza dei patogeni nel siero di caseificazione, quindi, dipendono in larga misura dalla qualità microbiologica del latte in entrata che, a sua volta, è condizionata da vari fattori tra i quali un ruolo essenziale è dato dall'igiene di mungitura. Un fattore di una certa importanza, sempre da questo punto di vista, è costituito dalla prevalenza, tra le lattifere, di soggetti portatori di *Salmonella enterica*, ceppi VTEC di *E. coli*, *Campylobacter* termotrofi patogeni e *Listeria monocytogenes*. Dalla bibliografia scientifica consultabile emergono disparità piuttosto consistenti di dati fra i singoli paesi, per quanto riguarda questi valori. Inoltre, abbiamo in pratica solo dati per le vacche da latte, mentre mancano quasi del tutto indicazioni sulla

prevalenza dei portatori dei predetti batteri patogeni in pecore, capre e bufale.

Un fattore di notevole importanza nel determinare la qualità microbiologica del siero di caseificazione è sicuramente il trattamento termico di pastorizzazione cui il latte è sottoposto nella produzione di determinati formaggi. In altri termini, a rigore il siero ottenuto da formaggi a latte crudo dovrebbe essere sempre più a rischio di quello ottenuto da formaggi a latte pastorizzato. Tuttavia, questa considerazione potrebbe anche rivelarsi non del tutto esatta, se pensiamo all'influenza decisiva che può avere sulla sopravvivenza dei batteri patogeni l'azione antimicrobica svolta dai batteri lattici tramite l'abbassamento del pH del mezzo e la produzione di antibiotici naturali (batteriocine). Va però anche annotato che in genere quello che è destinato a ricupero è il siero dolce, nel quale le cariche di batteri lattici non sono così alte quanto nel siero-innesto maturo e il pH è decisamente meno acido che in quest'ultimo.

Sempre per deduzione logica, si potrebbe pensare che il siero pastorizzato sia sempre più valido, sul piano igienico-sanitario, di quello non pastorizzato, ma anche in questo caso le indicazioni che emergono dalla bibliografia esistente non permettono di essere così certi nel trarre delle conclusioni. È stato dimostrato, infatti, che nel siero dolce non pastorizzato i batteri patogeni (nella fattispecie, si tratta di ceppi verocitotossici di *E. coli*) possono avere un destino non del tutto favorevole, vista l'azione antimicrobica svolta dai batteri lattici presenti nel siero non pastorizzato rispetto a quello pastorizzato.

È comunque evidente che una buona pastorizzazione del siero consente di inattivare con efficacia batteri patogeni presenti nel latte crudo e sopravvissuti al trattamento di caseificazione, a patto che si rispettino poi le Buone Prassi Igieniche nella successiva conservazione del siero.

Non va, infine, dimenticato che il pH piuttosto o decisamente acido di un siero non sempre può avere la meglio sui batteri agenti di malattia alimentare, poiché questi ultimi possono anche sviluppare una specifica resistenza alle condizioni acide, chiamata *Acid Tolerance Response* (ATR). È proprio il contatto dei batteri con un mezzo blandamente acido come il siero che potrebbe innescare nel microrganismo lo sviluppo

di questa resistenza che gli permette, poi, di resistere anche a condizioni di pH decisamente più bassi.

I dati raccolti dalla bibliografia in merito all'adattamento dei batteri patogeni alle condizioni di stress subletale cui l'uomo li sottopone coi suoi processi produttivi ci fanno capire che:

(1) in un alimento non si esercita mai un solo stress subletale per volta, ma più stress insieme che influenzano simultaneamente il metabolismo batterico,

(2) conta la successione con cui gli stress subletali si esercitano sulla flora microbica. In generale, il rischio di indurre una resistenza agli acidi è minore se sulla popolazione microbica si esercita prima uno stress acido e poi un calo della  $A_w$  e/o un trattamento termico. Nel caso del siero di caseificazione, quindi, siamo nelle condizioni migliori per evitare una ATR, ma non bisogna mai sottovalutare le capacità adattative dei batteri patogeni.

Per quanto riguarda i pericoli chimici che possono trovare nel siero di caseificazione un veicolo di trasmissione all'uomo, i dati della letteratura scientifica sono relativamente scarsi, ma tra i pericoli a maggiore rischio non vanno dimenticate le micotossine e, in misura più contenuta, le contaminazioni da metalli pesanti. Poco o nulla sappiamo, invece, sulla persistenza nel siero di residui di antibiotici e chemioterapici, se questi si trovano nel latte destinato a caseificazione. È probabile che la quantità di detti residui vari in base alla natura chimica del principio attivo antimicrobico: se esso tenderà a legarsi alla caseina, buona parte dei residui si concentrerà nel formaggio mentre se resterà in soluzione tenderà a trasferirsi anche nel siero.

Per quanto riguarda altri pericoli chimici quali sono i PCB e le diossine, non bisogna dimenticare che questi composti tendono a legarsi di preferenza ai grassi; di conseguenza, in caso di elevate quantità di PCB e/o diossine in un latte, buona parte dei residui tenderà a confluire nella massa caseosa e solo una frazione resterà nel siero.

In conclusione, il siero, oltre a offrire ottime prospettive per i tecnologi alimentari pone obiettivi di studio anche agli igienisti, chiamati a colmare le lacune di conoscenza che al momento ancora sussistono. Più che di vere e proprie conclusioni, quindi, azzarderei a dire che siamo appena all'inizio, in questo campo!

## Riferimenti bibliografici

1. Álvarez-Ordoñez A., Fernández A., Bernardo A., López M. (2009) "Comparison of acids on the induction of an Acid Tolerance Response in *Salmonella typhimurium*, consequences for food safety". *Meat Science* 8, 165-170.
2. Álvarez-Ordoñez A., Fernández A., Bernardo A., López M. (2010) "Acid tolerance in *Salmonella typhimurium* induced by culturing in the presence of organic acids at different growth temperatures". *Food Microbiology* 27, 44-49.
3. Anonimo (2006). "The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005". *The EFSA Journal* 94, 3-288.
4. Applebaum R.S., Marth E.H. (1982). "Fate of aflatoxin M1 in cottage cheese". *Journal of Food Protection*, 45, 903-904.
5. Arqués J.L., Fernández J., Gaya P., Nunez M., Rodriguez E., Medina M. (2004) "Antimicrobial activity of reuterin in combination with nisin against food-borne pathogens". *Int. J. Food Microbiol.*, 95, 225-229.

6. Aureli P., Ferrini A.M., Mannoni V., Hodzie S., Wedell-Weergard C., Oliva B. (2004) "Susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food in Italy to antibiotics". *Int. J. Food Microbiol.*, 83, 325-330.
7. Bacon R.T., Sofos I.N., Kendall P.A., Belk K.E., Smith G.C. (2003). "Comparative analysis of acid resistance between susceptible and multi-antimicrobial resistant *Salmonella* strains cultured under stationary-phase acid tolerance inducing and noninducing conditions". *Journal of Food Protection*, 66, 732-740.
8. Bearson B.L., Wilson L., Foster J.W. (1998). "A low pH-inducible, PhoPQ dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress". *Journal of Bacteriology*, 180, 2409-2417.
9. Bearson S.M.D., Benjamin W.H., Swords W.E., Foster J.W. (1996). "Acid shock induction of RpoS is mediated by the mouse virulence gene *mviA* of *Salmonella typhimurium*". *Journal of Bacteriology*, 178, 2572-2579.
10. Bell R.G., De Lacy K.M. (1985). "The effect of nisin-sodium chloride interactions on the outgrowth of *Bacillus licheniformis* spores". *Journal of Applied Bacteriology*, 59, 127-132.
11. Blanco M., Bianco J.E., Blanco J., Mora A., Prado C., Alonso M.P., Mourino M., Madrid C., Balsalobre C., Jurez A. (1997). "Distribution and characterization of faecal verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) isolated from healthy cattle". *Veterinary Microbiology* 54, 309-319.
12. Bohnert G.W., (1998). "Bioconversion of Cheese waste (Whey). Performer: Department of Energy, Washington DC. 11 Mar. 6 pp., abstr.
13. Bonardi S., Maggi E., Bottarelli A., Pacciarini M.L., Ansuini A., Vellini G., Morabito S., Caprioli A. (1999). "Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* 0157:H7 from cattle at slaughter in Italy". *Veterinary Microbiology* 67, 203-211.
14. Borczyk A.A., Kamali M.A., Lior H., Duncan L.M.C. 1987). "Bovine reservoir for verotoxin producing *Escherichia coli* 0157:H7". *Lancet* 1 98.
15. Brackett R.E., Marth E.H. (1982b). "Fate of aflatoxin M1 in Parmesan and Mozzarella cheese". *Journal of Food Protection*, 45, 597-600.
16. Buchanan R.L., Edelson S.G. (1999). "pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants". *Journal of Food Protection*, 62, 211-218.
17. Centers for Disease Control, (2000). "Outbreak of *Escherichia coli* 0157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds - Wisconsin, June 1998". *MMWR Weekly* 49 (40), 911- 913.
18. Cheng H.Y., Yu R.C., Chou C.C. (2003). "Increased acid tolerance of *Escherichia coli* 0157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge". *Food Research International*, 36, 49-56.
19. Chi-Zhang Y., Yam K.L., Chikindas M.L. (2004). "Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into broth system". *International Journal of Food Microbiology*, 90, 15-22.
20. Cho S., Diez-Gonzalez F., Fossier C.P., Welis S., Hedberg C.W., Kaneene J.B., Ruegg P.L., Wamick L.D., Bender J.B. (2006). "Prevalence of shiga toxin-encoding bacteria and shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy farms and country fairs". *Veterinary Microbiology* 118, 289-298.
21. Cobbold R., Desmarchelier P. (2000). "A longitudinal study of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* (STEC) prevalence in three Australian dairy herds". *Veterinary Microbiology* 71, 125-137.
22. Davies E.A., Falahee M.B., Adams M.R. (1996). "Involvement of the cell envelope of *Listeria monocytogenes* in a acquisition of nisin resistance". *Journal of Applied Bacteriology*, 81, 139-146.
23. Doane C.A., Pangoli P., Richards H.A., Mount J.R., Golden D.A., Draughon F.A. (2007). "Occurrence of *Escherichia coli* 0157:H7 in diverse farm environments". *Journal of Food Protection* 70, 6-10.
24. Farber J.M., Brown B.E. (1990). "Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat". *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1584-1587.
25. Farber J.M., Pagotto F., (1992). "The effect of acid-shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes*". *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 197-201.
26. Ferreira A., Sue D., O'Byrne C.P., Boor K.J. (2003). "Role of *Listeria monocytogenes* sB in survival of lethal acidic conditions and in the acquired tolerance response". *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2692-2698.
27. Foster J.W., Hall H.K. (1990). "Adaptative acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*". *Journal of Bacteriology*, 172, 771-778.
28. Foster I.W., Hall H.K. (1991). "Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*". *Journal of Bacteriology*, 173, 5129-5135.
29. Francis G.A., O'Beirne D. (2005). "Variation among strains of *Listeria monocytogenes* differences in survival on packaged vegetables and in response to heat and acid conditions". *Food Con.* 16, 687-694.
30. Gahan C.G.M., Hill C. (1999). "The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*". *Int. J Food Microbiol.*, 50, 93-100.
31. Gallo L.I., Pilosof A.M.R., Jagus R.J. (2007). "Effective control of *Listeria innocua* by combination of nisin, pH and low temperature in liquid cheese whey". *Food Control* 18, 1086-1092.
32. Garren D.M., Harrison M.A., Russeli S.M. (1997). "Retention of acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* 0157:H7 and non-0157:H7 isolates". *Journal of Food Protection*, 60, 1478-1482.
33. Giaccone V., Vercellotti L., Pavoletti E., Chiesa F., De Palma D., Miotti Scapin R., Radu I., Colavita G. (2009). "*Listeria monocytogenes* nel contenuto intestinale di bovini da macello". VII Workshop Nazionale Enter-net Italia "Infezioni trasmesse da alimenti e acqua: diagnostica ed epidemiologia". Roma, 4-5 novembre 2009, ISTISAN Congressi 09/C10.
34. Govaris A., Roussi V., Koidis P.A., Botsoglou N.A. (2001). "Distribution and stability of aflatoxin M1 during processing, ripening and storage of Teleme cheese". *Food Additives and Contaminants*, 18, 437-443.
35. Greenacre E., Brocklehurst T.F., Waspe C.R., Wilson D.R., Wilson P.D.G. (2003). "*Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* acid tolerance response induced by organic acids at 20 C: optimization and modeling". *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3945-3951.

36. Hancock D.D., Besser T.E., Rice D.H., Ebel E.D., Hemot D.E., Carpenter L.V. (1998). "Multiple sources of *Escherichia coli* O:157 in feedlots and dairy farms in the Northwestern USA". Preventive Veterinary Medicine 35, 11-19.
37. Hill C., Cotter P.D., Sleator R.D., Gahan C.G.M. (2002). "Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes* jumping the hurdles imposed by minimal processing". Int. Dairy J. 12, 273-283.
38. Hill C., O'Driscoll B., Booth I. (1995). "Acid adaptation and food poisoning microorganisms". Int. J. Food Microbiol., 28, 245-254.
39. Hinrichs J. (2001). "Incorporation of whey proteins in cheese". Int. Dairy J. 11, 495- 503.
40. Jørgensen F., Hansen T.B., Knøchel S. (1999). "Heat shock-induced thermotolerance in *Listeria monocytogenes* 13-249 is dependent on growth phase, pH and lactic acid". Food Microbiol. 16, 185-194.
41. Jørgensen F., Stephens P.J., Knøchel S. (1995). "The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on the thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*". J. Appl. Microbiol. 79, 274-281.
42. Jung D.S., Bodyfelt F.W., Daeschel M.A. (1992). "Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk". Journal of Dairy Science, 75, 387-393.
43. Kiermeier F., Buchrier M. (1977). "On the aflatoxin MI content of cheese during ripening and storage". Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung, 164, 87-91.
44. Koo J., Marshall D.L., DePaola A. (2002). "Antacid increased survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage in a gastrointestinal model". Applied and Environmental Microbiology, 67, 2895-2902.
45. Koutsoumanis K.P., Kendall P.A., Sofos J.N. (2003). "Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*". Applied Environ. Microbiol. 69, 7514-7516.
46. Koutsoumanis K.P., Sofos J.N. (2004). "Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella Typhimurium* after habituation at different pH conditions". Lett. Appl. Microbiol. 38, 321-326.
47. Kroll R.G., Patchett R.A. (1992). "Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*". Letters in Applied Microbiology, 14, 224-227.
48. Kuhnert P., Dubosson C.R., Roesch M., Homfield E., Doherr M.G., Blum J.W. (2005). "Prevalence and risk-factor analysis of Shiga toxicogenic *Escherichia coli*" in faecal samples of organically and conventionally farmed dairy cattle". Veterinary Microbiology 109, 37-45.
49. Lee I.S., Slonczewski 3.L, Foster J.W. (1994). "A low-pH-inducible, stationary phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*" Journal of Bacteriology, 176, 1422- 1426.
50. Leenanon B., Drake MA. (2001). "Acid stress, starvation and cold stress affect poststress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*". Journal of Food Protection, 64, 970-974.
51. Leieune IT., Hancock D., Wasteson Y., Skjerve E., Urdahl A.M. (2006). "Comparison of *E. coli* O157 and Shiga toxin-encoding genes (stx) prevalence between Ohio, USA, and Norwegian dairy cattle". Journal of Food Microbiology 109, 19-24.
52. Leyer G.J., Johnson E.A. (1992). "Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp in cheese". Applied and Environmental Microbiology, 58, 2075-2080.
53. Lianou A., Stopforth J.D., Yoon Y., Wiedmann M., Sofos J.N. (2006). "Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins". J. Food Prot. 69, 2640-2647. 54. Lin Y.D., Chou C.C. (2004). "Effect of heat shock on thermal tolerance and susceptibility of *Listeria monocytogenes* to other environmental stresses". Food Microbiol. 21, 605-610.
55. Liu W., Hansen J.N. (1990). "Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*". Applied and Environmental Microbiology, 56, 2551-2558.
56. Lopez C., Ramos L., Ramadàn S., Bulacio L, Perez J. (2001). "Distribution of aflatoxin MI in cheese obtained from milk artificially contaminated". mt. J. Food Microbiol., 64, 211-215.
57. Lou Y., Yousef A.E. (1997). "Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors". Appl. Environ. Microbiol. 63, 1252-1255.
58. Mackey B.M., Pritchett C., Norris A., Mead G.C. (1990). "Heat resistance of *Listeria*: strain differences and effects of meat type and curing salts". Lett. Appl. Microbiol., 10, 251-255.
59. Madden R.H., Murray K.A., Gilmour A. (2006). "Carriage of four bacterial pathogens by beef cattle in Northern Ireland at time of slaughter". Lett. Appl. Microbiol., 44, 115-119.
60. Manetta A.C., Giammarco M., Di Giuseppe L., Fusaro I., Gramerizi A., Formigoni A., Vignola G., Lambertini L (2009) "Distribution of aflatoxin MI during Grana Padano cheese production from naturally contaminated milk". Food Chemistry 113, 595-599.
61. Martin M.L., Shipman L.D., Wells J.G., Potter M.E. (1986). "Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dairy cattle associated with two cases of hemolytic uremic syndrome". Lancet 2 (8514), 1043.
62. Neill M.A. (1994). "*E. coli* O157:H7 time capsule: what do we know and when did we know?" Dairy Environ. Sanit. 14, 374- 377.
63. Nielsen E.M., Tegtmeyer C., Andersen H.J., Grønbc C., Andersen J.S. (2002). "Influence of age, sex and herd characteristics on the occurrence of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in Danish dairy farms". Veterinary Microbiology, 88, 245-257.
64. Oruc H.H., Cibik R., Yilmaz E., Kalkanli O. (2006). "Distribution and stability of aflatoxin MI during processing and ripening of traditional white pickled cheese". Food Additives and Contaminants, 23, 190-195.
65. Marek P., Nair M.K.M., Hoagland T., Venkitanarayanan K. (2004) "Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey". mt. J. Food Microbiol., 94 1-7.
66. Reitsma C.J., Henning D.R., (1996). "Survival of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese". J. Food Prot., 59, 460- 464.
67. Rodriguez A., Pangloli P., Richards H.A., Mount J.R., Draughton F.A. (2006). "Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples". J. Food Prot., 69 (11), 2576-2580.

68. Samelis J., Sofos J.N. (2003). "Strategies to control stress-adapted pathogens". In: Yousef, A.E., Juneja, V.K. (Eds.), *Microbial Stress Adaptation and Food Safety*. CRC Press, New York, pp. 303-353.
69. Scott R., (1986). *Cheesemaking Practice*. Elsevier, New York, p. 312.
70. Shadbolt C., Ross T., McMeekin T.A. (2001). "Differentiation of the effects of lethal pH and water activity: food safety implications". *Let. Appl. Microbiol.* 32, 99-102.
71. Singh A., Singh R.K., Bhunia A.K., Singh N. (2003) "Efficacy of plant essential oils as antimicrobial agents against *Listeria monocytogenes* in hotdogs". *Lebensm. Wiss. in. Technol.*, 36, 787-794.
72. Sinkem B., Pamuk S., Ökazin C., Gedikoglu S., Eyigör M. (2006) "A note on the incidences of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish sausage (Soudjouk)". *Meat Science*, 72, 177-181.
73. Skandamis P.N., Yoon Y., Stopforth J.D., Kendall P.A., Sofos J.N. (2008) "Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses". *Food Microbiology* 25, 294-303.
74. Thomas L.V., Ingram R.E., Yu S., Delves-Broughton. (2004) "Investigations of the effectiveness of Ascopyrone P as a food preservative". *Int. J. Food Microbiology*, 93, 319-323.
75. Tolonen M., Rajaniemi S., Pihlava J.-M., Johansson T., Saris P.E.J., Ryhanen E.-L. (2004) "Formation of nisin, plant derived biomolecules and antimicrobial activity in starter culture fermentations of sauerkraut". *Food Microbiol.*, 21, 167-179.
76. Upton P., Coia J.E. (1994). "Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurized milk supply". *Lancet* 344, 1015.
77. Van Donkersgoed J., Graham T., Gannon V. (1999). "The prevalence of verotoxins, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* in the faeces and rumen of cattle at processing". *Canadian Veterinary Journal* 40, 332-338.
78. Vannini L., Lanciotti R., Baldi D., Guerzoni M.E. (2004) "Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase". *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 123-135.
79. Vattem D.A., Un J.-T., Labbe R.G., Shetty K. (2004) "Antimicrobial activity against select food-borne pathogens by phenolics antioxidants enriched in cranberry pomace by solid-state bioprocessing using the food grade fungus *Rhizopus oligosporus*". *Process Biochemistry*, 39, 1939-1946.
80. Vaz-Velho M., Todorov S., Ribeiro J., Gibbs P. (2004) "Growth control of *Listeria innocua* 2030c during processing and storage of cold-smoked salmon-trout by *Carnobacterium divergens* V41 culture and supernatant". *Food Control*
81. Vermeiren L., Devlieghere F., Debevere J. (2004) "Evaluation of meat borne lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products". *Int. J. Food Microbiol.*
82. Wang G., Zhao T., Doyle M.P. (1997). "Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized and pasteurized milk". *J. Food Prot.* 60, 610-613.
83. Williams T., Joseph B., Beier D., Goebel W., Kuhn M. (2005) "Response regulator DegU of *Listeria monocytogenes* regulates the expression of flagella-specific genes". *FEMS Microbiology Letters*, 252, 287-298.
84. Wilson J.B., Renwick S.A., Clarke R.C., Rahn K., Alves D., Johnson R.P., Ellis A.G., McEwen S.A., Karmali M.A., Lior H., Spika J. (1998). "Risk factors for infection with verocytotoxigenic *Escherichia coli* in cattle on Ontario dairy farms". *Preventive Veterinary Medicine* 34, 22-236.
85. Yamazaki K., Yamamoto T., Kawai Y., Inoue N. (2004) "Enhancement of antilisteria activity of essential oil constituents by nisin and diglycerol fatty acid ester". *Food Microbiol.*, 21, 283-289.
86. Yuk H.G., Schneider K.R. (2006). "Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid". *Food Microbiology*, 23, 694-700.

# VALORIZZAZIONE COMMERCIALE DEL SIERO DI LATTE BUFALINO NEL RISPETTO DELL'AMBIENTE

Massimo Pizzichini, Claudio Russo - ENEA, Dipartimento BAS, C.R. Casaccia, Roma

Massimo Vitagliano, Daniele Pizzichini - Genelab s.r.l

## 1. Introduzione

Il siero di caseificazione costituisce ciò che rimane del latte a seguito del processo di coagulazione acida o presamica delle caseine del latte per ogni tipo di produzione casearia.

In seguito alla coagulazione acida (starter microbici) o presamica (enzimi proteolitici, in particolare chimosina o rennina e pepsina, si ottiene la precipitazione soltanto delle caseine del latte, mentre le siero-proteine, il lattosio, le vitamine ed i sali minerali presenti nel latte rimangono inalterati nel siero. L'industria lattiero-casearia tradizionale, come quella delle mozzarelle o del Parmigiano, considera da sempre questa matrice siero come un rifiuto, riutilizzabile solo per all'alimentazione zootecnica, in particolare dei suini.

I caseifici dal canto loro, in ragione di una normativa europea molto lacunosa (Regolamento CE 1774/2002), quando non trasformano il siero in farine per la zootecnia, devono spesso sostenere un costo di smaltimento più o meno legale, e sono gravate dal rischio, sempre più incombente, di sanzioni o denunce penali.

La ricerca scientifica e tecnologica è molto più avanti della normativa, che fra l'altro penalizza solo paesi come il nostro e privilegia quelli del Nord Europa, che infatti vendono i loro prodotti siero derivati in tutto il mondo, Italia compresa.

Non è un caso che l'Italia importa ogni anno circa 70.000 ton di siero in polvere ([www.clal.it](http://www.clal.it)) destinate prevalentemente all'alimentazione umana ed anche alla mangimistica zootecnica.

Come è noto la categoria più importante di integratori

alimentari, commercializzati soprattutto per favorire le attività sportive, ma anche per il benessere, sono costituiti proprio da siero proteine ottenute dal siero di latte, con tecniche di microfiltrazione (MF) e di ultrafiltrazione (UF), come sovente viene riportato in etichetta.

Questi formulati in polvere o in tavolette aromatizzate con fragola, cannella, cacao, etc., arrivano ad avere una composizione in siero proteine vicina al 100%, ed hanno dei prezzi di vendita al dettaglio dell'ordine dei 40-80 €/kg.

Si ricorda che in 1 m<sup>3</sup> di siero grezzo sono presenti almeno 10 kg di siero proteine, in quello di bufala fino a 12 kg.

La tecnologia più diffusa per recuperare la componente proteica ma anche quella glucidica del siero è quella a membrana che prevede l'uso di tecnologie separative specialistiche che operano in condizioni di flusso tangenziale, quindi ad elevata produttività.

L'Enea ha maturato una lunga esperienza studio e ricerca sul trattamento del siero di latte basato proprio sull'impiego delle tecnologie di membrana (1-5).

Tutti i sieri, in particolare quello di bufala, contengono sostanze di grande interesse alimentare e farmaceutico: proteine e derivati proteici, zuccheri come il lattosio che possono trasformarsi in idrolizzati glucidici (glucosio e galattosio e in GOS) con proprietà potenzialmente prebiotiche, sali minerali e vitamine come la riboflavina, oltre ai peptidi bioattivi, o Glico Macro Peptidi, che hanno importanti funzioni biomediche (6).

Nella Tabella seguente si riportano le funzioni biologiche attive delle SP non denaturate, quelle a più alto valore commerciale.

Siero Proteine e GMP	Funzione biologica
Caseine ( $\alpha$ , $\beta$ e $\kappa$ )	Trasportatore di ioni (Ca, PO <sub>4</sub> , Fe, Zn, Cu), precursore di peptidi bioattivi
$\beta$ -lattoglobulina	Facilmente assorbita a livello intestinale, trasportatore del retinolo, possibile antiossidante, recettore di acidi grassi
$\alpha$ -lattalbumina	Facile assorbimento da parte del muscolo, trasportatore del Ca, anticancerogeno, proprietà nutraceutiche per l'alto contenuto in triptofano, alta affinità per recettori glicosilati sulla superficie degli oociti e spermatozoi come potenziale azione contraccettiva
Immunoglobuline (A, M, G)	Protezione immunitaria e trattamento terapeutico
Albumina serica	Alto contenuto in cisteina per la produzione del glutathione, proprietà antiossidanti, applicazioni terapeutiche
Glicomacropeptidi (GMP)	Antivirale, facilitazione per la digestione dei grassi, protezione anti-influenzale, aumentano le colecistichinine (CCK) con riduzione della fame prevenzione nell'adesione tartarica nei denti, inibizione dell'attacco dell' <i>E. coli</i> nell'intestino
Lattoferrina (LF)	Antimicrobico, antiossidante, anticancerogeno, Immunoregolatore, contenuto in soluzioni di collutorio, regolazione del trasporto del ferro, produzione di peptici bioattivi con proprietà anti-opioidi e anti-trombotiche
Lactoperoxidasi	Antimicrobico, formulazione di cosmetici "terapeutici" e soluzioni di collutorio
Lisozima	Antimicrobico verso i batteri Gram negativi,

GMP= Glico Macro Peptidi o peptidi bioattivi.

I Peptidi Biologicamente attivi (PB) sono frammenti proteici derivanti dall'idrolisi delle frazioni caseiniche ( $\alpha$ S1,  $\alpha$ S2,  $\beta$ ,  $\kappa$ ) e di alcune SP, principalmente  $\beta$ -lattoglobulina,  $\alpha$ -lattalbumina e lattoferrina. Tale frammentazione avviene naturalmente ad opera degli enzimi proteolitici presenti nell'intestino (pepsina, tripsina) in seguito all'assunzione del latte, oppure ad opera degli enzimi coinvolti nel processo di caseificazione (chimosina, pepsina), e anche dai lattobacilli durante la fermentazione lattica.

I PB hanno caratteristiche biochimiche diverse per struttura primaria, punto isoelettrico e peso molecolare; quest'ultimo in media è compreso fra 200 e 1.900 Da.

Nell'ultimo decennio la comunità scientifica ha estesamente investigato le proprietà biochimiche dei peptidi derivanti dalla idrolisi delle proteine del latte mettendo in luce per alcuni di essi, la capacità di intervenire in numerosi processi fisiologici quali: l'azione antimicrobica, l'immunomodulazione, il trasporto di minerali, l'attività ACE inibitoria (antistress), l'attività oppioide agonista e antagonista, estrinsecando in tal senso comportamenti ormoni-simili estremamente diversificati.

Le SP sono anch'esse importanti da punto di vista salutistico, per le loro specifiche proprietà nutrizionali e

biomediche. Alla luce degli studi recenti, condotti in particolare dall'ENEA, emergono nuove ed importanti informazioni scientifiche che dimostrano il grande valore nutrizionale, biologico ed anche farmacologico dei composti presenti nel siero di latte (4,5),

Infatti dal siero si possono ricavare derivati che potrebbero sostituire alcuni prodotti dell'industria farmaceutica, con il vantaggio di non comportare controindicazioni biomediche. (6).

Purtroppo si continuano a sfruttare nel comparto alimentare le proprietà funzionali delle SP, come ad esempio la capacità di assorbire l'acqua, di formare gel, emulsioni ecc., tutte caratteristiche importanti, ma di seconda categoria perché le SP sono denaturate.

Tali proprietà hanno consentito di impiegare largamente le SP nell'industria alimentare (pasta, cioccolato, biscotti, maionese, sughi, prodotti per l'infanzia ecc.).

Le SP hanno inoltre la funzione di "fat replacer", cioè di sostituire il sapore del grasso e di esaltare il gusto e gli aromi dei cibi in generale.

Nella pratica casearia le SP sono impiegate marginalmente nella produzione della ricotta, un prodotto tutto italiano, presente solo in alcuni periodi dell'anno e poco diffuso al Nord Italia, in cui le SP

hanno perso le funzioni enzimatiche, ma conservano quelle nutrizionali.

## **2. Il siero è un prodotto instabile**

Una delle maggiori difficoltà pratiche per l'utilizzo del siero di latte al fine di ottenere dei prodotti ad alto valore aggiunto, è costituito dalla sua instabilità microbiologica. Il siero è un brodo di coltura microbica, per cui viene facilmente trasformato, dai batteri lattici, in esso presenti, in acido lattico con la conseguente perdita del suo valore commerciale.

Per questa ragione il siero, una volta separato dalla cagliata, deve essere subito raffreddato a 5-7 °C in modo da bloccare le fermentazioni lattiche che lo trasformano in un sottoprodotto di basso valore commerciale.

Generalmente nel nostro paese c'è poca attenzione nei confronti del siero, che viene considerato un rifiuto scomodo, a cui si aggiungono tutti gli altri scarti della produzione casearia. Per siero di caseificio spesso si intende un miscuglio di sottoprodotti non ben identificati, comunque un rifiuto.

Un'altra limitazione applicativa deriva dal fatto che i nostri caseifici, specialmente quelli della Piana del Sele, sono relativamente piccoli e dispersi sul territorio. Ciò comporta soltanto un problema logistico di facile soluzione, basti pensare ad un centro di trattamento che permetta di raccogliere il siero raffreddato del singolo caseificio.

In tal modo si potrebbe disporre di un quantitativo di siero e scotta dell'ordine di 1 milione di litri/giorno, il che costituisce il primo presupposto per la realizzazione di un grande impianto di valorizzazione del siero, con ritorni economici importanti per la Provincia di Salerno.

## **3. Il rispetto dell'ambiente ed il controllo della filiera produttiva**

All'interno della UE è operativa da alcuni anni una direttiva denominata Life Cycle Assessment (LCA) normativa ISO 14040, che dovrebbe obbligare le industrie europee a rispettare l'ambiente, indicando in maniera precisa come devono essere trattati i materiali, quindi gli effluenti di stabilimento a fine ciclo di vita.

L'Enea, Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie, l'Energia e lo Sviluppo Sostenibile è da sempre

impegnata in questo obiettivo, per questo ha promosso una tecnologia di trasformazione e valorizzazione del siero, nel rispetto rigoroso dell'ambiente, in osservanza del modello di sviluppo sostenibile (5;7).

Questo significa controllare tutta la filiera di generazione del siero di latte, partendo dalla salute dei capi zootecnici, dalla loro alimentazione, dal controllo della produzione nella stalla in cui devono essere garantite le norme igienico-sanitarie, fino al trattamento ecosostenibile del siero e di tutti gli effluenti generati nel caseificio.

Non si può ottenere un siero di qualità se questa filiera produttiva è lasciata all'improvvisazione degli allevatori o dei caseari.

L'industria casearia è piuttosto inquinante non solo in relazione al siero e alla scotta ma anche in ragione del volume di effluenti prodotti giornalmente.

In media un caseificio produce un volume di effluenti di lavorazione che varia da 3 a 5 volte il volume di latte lavorato. Fra questi effluenti oltre al siero ci sono la scotta, le acque di filatura, il latticello e tutte le acque di lavaggio dei serbatoi del latte, delle polivalenti usate nella produzione della cagliata, dei locali di caseificazione etc.

Nel convegno di Eboli, Massimo Pizzichini ha mostrato alcuni esempi di trattamento di questi effluenti che consentono, fra l'altro, il recupero di sostanze chimiche importanti come grasso, proteine e lattosio per produrre energia da biogas e soprattutto per recuperare l'acqua, fino al 50 % di quella consumata.

## **4. Le tecnologie di valorizzazione del siero di latte**

L'ENEA ha sempre considerato con interesse la possibilità di valorizzare il siero del latte attraverso l'applicazione delle tecnologie separative mediante membrana in maniera sistematica, cioè cercando di frazionare le sue componenti chimiche fra loro, per poi utilizzarle vantaggiosamente per la sempre maggiore qualificazione dei prodotti finali.

Lo schema di processo è riportato nella figura 2, in cui viene indicato il riutilizzo commerciale delle diverse componenti chimiche presenti nel siero di caseificazione.

Figura 1: Schema di frazionamento del siero per valorizzarne le sue componenti chimiche



Dalla separazione delle componenti chimiche fra loro; famiglie di siero proteine, lattosio, sali minerali ed acqua è possibile procedere ad una valorizzazione di ogni classe, sviluppando ipotesi di produzione altrimenti impensabili, con altre tecnologie, come l'ottenimento di una bevanda funzionale ottenuta interamente dal siero di latte.

La traduzione di questo schema in termini di processo è riportata nello schema a blocchi di figura 3, in cui vengono indicate le tecnologie specifiche di membrana che permettono di ottenere le categorie di prodotti sopra indicati (5).

La microfiltrazione tangenziale è una tecnica di membrana che impiega membrane, per lo più ceramiche, con una porosità dell'ordine di 0,8 µm, essa permette di eliminare il 99,7 % della carica microbica del siero, che spesso raggiunge i 3 milioni di ufc/ml, senza l'uso del calore (pastorizzazione), in modo da ottenere nel permeato soltanto SP che vengono concentrate con la tecnica di UF.

Questo processo viene ampiamente applicata anche nel trattamento del siero di scarsa qualità per ricavare un

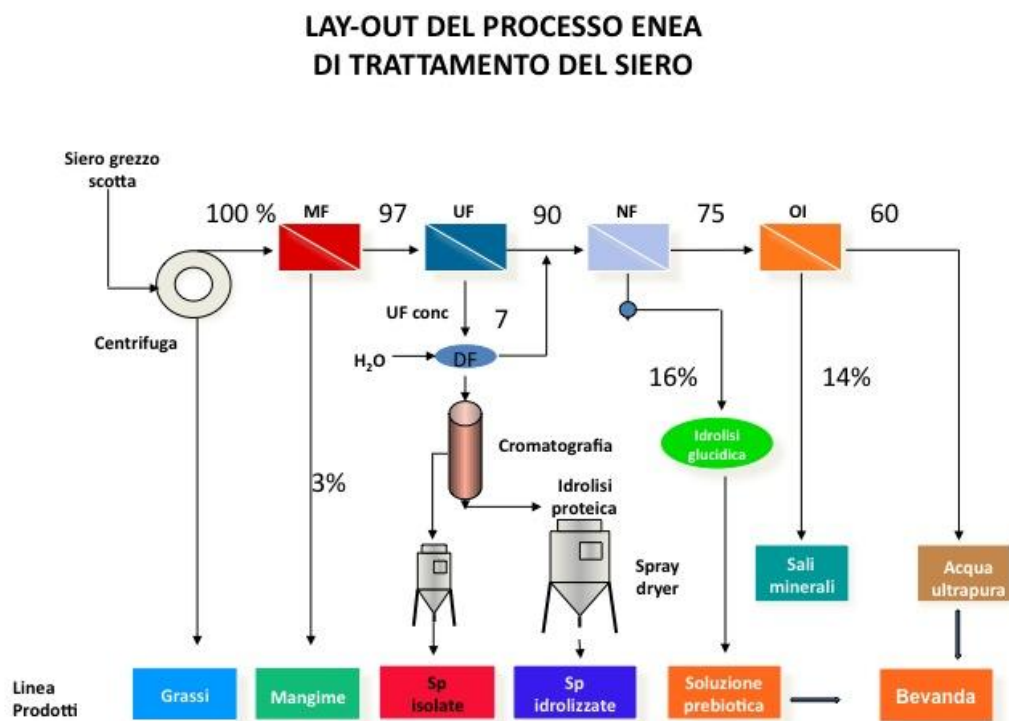
prodotto di basso valore commerciale. Il concentrato del processo di UF è costituito sostanzialmente da siero proteine che raggiungono concentrazioni superiori a 110 g/L, ed una frazione di lattosio, che dipende dal rapporto volumetrico di concentrazione raggiunto in questa sezione.

Invece, il permeato di UF è costituito sostanzialmente dal lattosio, circa 45 g/L, il maggiore componente chimico presente nel siero, insieme alla riboflavina, ai sali minerali e all'acqua.

Il permeato di UF viene quindi inviato al processo di nano filtrazione (NF) che permette di concentrare il lattosio fino a circa 200 g/L e di ottenere un permeato limpido e chiaro ricco di sali minerali monovalenti insieme all'acqua.

Infine il permeato di NF viene inviato alla sezione di osmosi inversa (OI), da cui si ottiene un concentrato salino fino a 20 g/L che può essere utilizzato nella salagione del formaggio, previa integrazione di NaCl, ed un permeato costituito da un'acqua ultrapura a basso contenuto salino e a basso carico inquinante, con un COD inferiore a 150 ppm di ossigeno.

Figura 2. Schema a blocchi del processo di frazionamento del siero con tecnologie di membrana.



Nella figura 3, partendo da 100 L di siero sono indicati i volumi indicativi che si ottengono dalle singole sezioni a membrana. Il 60 % in volume del siero in ingresso e fino al 70 % può essere trasformato in acqua ultrapura.

Qualora si utilizzasse la scotta invece del siero di latte, il volume di acqua ultrapura può salire leggermente oltre il 70 %, ma si riducono i volumi del concentrato di UF e solo leggermente quelli del concentrato di NF.

L'acqua ultrapura, cioè il permeato di OI, può essere imbottigliata come tale, previa autorizzazione normativa che oggi non esiste, oppure può essere aggiunta al concentrato di NF, previa idrolisi enzimatica del lattosio, per ottenere una bevanda funzionale con galattoso-oligo-saccaridi (GOS) molecole di grande interesse nutrizionale per le spiccate proprietà prebiotiche (8,9).

Come si vede, in questo processo la matrice siero viene completamente frazionata senza produrre inquinanti o sottoprodotti di lavorazione. E' tuttavia doveroso sottolineare che tutte le sezioni a membrana richiedono, dopo un turno di lavoro di 9-12 ore, una fase di lavaggio con acqua prima e soda poi. Gli effluenti di lavaggio delle membrane, dopo una fase di neutralizzazione chimica, ad esempio per acidificazione, possono essere

trattati con lo stesso impianto, nelle sezioni di NF e di OI per rigenerare l'85 % di acqua da riutilizzare nel ciclo produttivo, mentre solo il 15 % in volume è costituito da sali minerali ( concentrato di OI), che si può da aggiungere al precedente concentrato di OI, quindi da re-impiegare nella salamoia dei formaggi.

In alternativa a questa ipotesi, i lavaggi delle membrane possono essere smaltiti nel depuratore a fanghi attivi, che normalmente utilizzano i caseifici per smaltire le acque di lavaggio degli impianti.

### 5. Conclusioni

Non c'è dubbio che il siero di latte ha un valore biologico più interessante del latte stesso, e che tale valore dipende dai PB e dalla componente sieroproteica che dovrebbe essere mantenuta allo stato nativo, senza passare per la denaturazione (ricotta) che ne azzerava le funzioni enzimatiche.

Purtroppo il siero richiede molte attenzioni per il suo trattamento perché è facilmente e rapidamente deteriorabile per effetto fermentativo, quindi deve essere raffreddato e successivamente frazionato con tecnologie di membrana se si vogliono ottenere prodotti ad alto valore aggiunto.

Le SP ottenute con questo schema di processo sono perfettamente integre e non denaturate come quelle che si ottengono dalla semplice polverizzazione, quindi trovano applicazione nel segmento commerciale dei body building, ad alto valore commerciale.

Anche il lattosio, considerato un sottoprodotto scomodo per la sua recalcitranza alla depurazione aerobica a fanghi attivi, diventa un prezioso substrato per impieghi nel settore del beverage o anche farmaceutico, attraverso la cristallizzazione.

L'acqua ultrapura (permeato di OI) diventa un prezioso semilavorato per la formulazione di bevande funzionali, come già avviene con la Rivella, prodotta in Svizzera con il siero italiano.

Non è la tecnologia che manca per valorizzare il siero di latte, ma una organizzazione a livello territoriale che si faccia carico di mettere d'accordo i produttori di siero e contemporaneamente si deve attrezzare per sviluppare il marketing dei prodotti ricavati, come avviene da decenni nei paesi del Nord Europa (Francia, Germania, Olanda, Irlanda, Danimarca, etc.).

## 6. Bibliografia

- 1) G. Quaglia, J. Comendador, M. Pizzichini: Recupero e purificazione delle sieroproteine della scotta ovina per ultrafiltrazione e diafiltrazione. Istituto Nazionale della Nutrizione, Latte e Derivati tra Tecnologie e Tradizione, Ed. L. Pizzoferrato, pp217-220, (1997).
- 2) M. Pizzichini; Membrane Application in Food Industry; A. Caetano and al. (edts) Technology Application in Industry Wastewater Treatment, 151-174; Kluwer Ac. Printer in the Netherlands (1995).
- 3) M.Pizzichini ,G. Zeddità., Comendador F.J.,A. Bertone, and all.; Recupero di sieroproteine e acqua depurata dalla scotta ovina con tecnologie di membrana; Scienza e Tecnica Lattiero Casearia, 46 (6). 361-379 (1995).
- 4) M.Pizzichini, C. Russo. P.Feliziani; Sviluppo di Integratori Alimentari a base di siero di latte, Ricerche e Innovazione nell'Industria Alimentare; CISETA Volume VI, pag. 965-971, Chiriotti Ed. (2004).
- 5) M.Pizzichini; Tecnologie di processo per il recupero e la valorizzazione delle componenti del siero di latte, Prima Print. Ed., ENEA, Giugno (2006).
- 6) K. Marshall; Therapeutic Applications of Whey Protein, Alternative Medicine Review, Vol 9, number 2 (2004).
- 7) M. Pizzichini, C. Russo "Il siero di latte: da rifiuto zootecnico a materia prima per prodotti alimentari e farmaceutici." L'Informatore Agrario 16: 49-53,(2001).
- 8) M. Pizzichini, A.Iasonna , M.Rosi , F. Ruscio., and F. Erbisti.; Innovazione tecnologica nell'industria lattiero casearia, Energia Ambiente Innovazione, Ed. ENEA, 1/97, p. 43-57, (1997).
- 9) M. Pizzichini, C.Russo, D.Pizichini, F.Vittiglio; Studio di Marketing per il posizionamento sul mercato di una nuova bevanda a base di siero di latte; ENEA, RT/BAS 206/2006 (2006).

**Redazione e Amministrazione: EDIZIONI SCIENZA E DIRITTO S.a.s.**

**20129 MILANO - Via Ramazzini, 4 - Tel. 02/29.51.11.32 - Fax 29.40.80.03 -info@scienzaediritto.com -  
www.scienzaediritto.com**

**Abbonamento annuale 10 numeri euro 80 - Estero il doppio - Un numero separato euro 8  
Registrazione del Trib. di Milano n. 128 del 13.3.1993 - Stampato in proprio -**

**Garanzia di riservatezza per gli abbonati. L'Editore garantisce la massima riservatezza dei dati forniti dagli abbonati e la possibilità di rettificarli o di cancellarli a semplice richiesta. Le informazioni custodite saranno utilizzate al solo scopo di sottoporre agli abbonati proposte commerciali (L. 675/96 Tutela dati personali)**