

INDAGINE PRELIMINARE SULLA POSSIBILITÀ DI CONTROLLO DELLO SVILUPPO DI MUFFE SUPERFICIALI NEI FORMAGGI MEDIANTE L'APPLICAZIONE DI PROPOLI

G Zeppa^{1*}, P Dolci¹

INTRODUZIONE

Nella produzione di molti formaggi a media e lunga stagionatura il contenimento delle muffe superficiali costituisce uno dei principali problemi che il casaro si trova a dover risolvere. Particolarmente complesso risulta il contenimento del *Mucor* spp. (il cosiddetto "pelo di gatto") il cui fitto feltro superficiale oltre ad ostacolare la corretta formazione della crosta può, se toccato, macchiare irrimediabilmente la crosta. Benché sia evidente che la prevenzione dalle contaminazioni così come le cure di magazzino siano gli strumenti più efficaci per limitare lo sviluppo di queste muffe, in alcune situazioni le particolari condizioni di stagionatura o la scarsa disponibilità di manodopera ne impediscono l'applicazione. È il caso ad esempio del *Mucor* spp. il cui controllo richiederebbe un abbassamento dell'umidità ambientale, ma quest'operazione oltre a determinare un cambiamento strutturale del prodotto risulta impossibile da effettuarsi nei locali ad umidità ambientale ampiamente utilizzati nelle realtà produttive artigianali. In questi particolari casi si potrebbe fare ricorso a specifici prodotti antimuffa quali i sorbati o la pimaricina, ma il trattamento non è privo di controindicazioni sia sensoriali che igienico-sanitarie [1].

Inoltre l'utilizzo di additivi chimici è in contraddizione con lo spirito stesso delle produzioni a Denominazione di Origine che vedono proprio nella produzione 'leale e costante' uno dei loro elementi fondamentali. Non sempre applicabili risultano altresì alcuni trattamenti già utilizzati o sperimentati sui formaggi quali i fumiganti, le radiazioni ultraviolette, la paraffinatura ed i rivestimenti plastici [1, 2].

Nella ricerca di un mezzo efficace per il contenimento delle muffe superficiali dei formaggi che risultasse di facile utilizzo, di costo contenuto, utilizzabile sia dal grande caseificio di fondovalle che dal margaro in alpeggio e privo di controindicazioni dal punto di vista compositivo e sensoriale la nostra attenzione si è rivolta all'impiego della propoli.

La propoli è una miscela complessa di sostanze resinose, gommose e balsamiche raccolte dalle api sulla corteccia e sulle gemme di numerose piante (pioppi, betulle, salici, ippocastani, olmi, querce, pini, ontani ecc.) e

* *Corrispondenza ed estratti:* tel. +390116708550, fax +39011678549, giuseppe.zeppa@unito.it

¹ Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Università degli Studi di Torino. Via L. da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO).

miscelata con cere, pollini ed enzimi secreti dalle ghiandole ipofaringee delle stesse api [3, 4]. Il prodotto che ne deriva è una sostanza lipofila, dura e friabile a temperatura ambiente, gommosa e appiccicosa quando riscaldata. Possiede un piacevole odore ed in funzione dell'origine geografica e botanica e dell'età presenta una colorazione da giallo-bruna a marrone scuro [5-7].

Le sue proprietà farmacologiche, conosciute ed utilizzate fin dall'antichità, sono state oggetto negli ultimi anni di numerosi studi che hanno evidenziato come questo prodotto possa svolgere azioni antibiotiche, antivirali, antifungine, anestetiche, antinfiammatorie, ipotensive, immunostimolanti e citostatiche [8-10].

Particolarmente importanti per i loro risvolti igienico-sanitari sono risultate essere l'attività antimicrobica e quella antifungina. La prima, attribuita all'azione inibente dei flavonoidi pinocembrina e galangina nei confronti di una RNA polimerasi, si esplica a carico di numerosi batteri patogeni sia Gram positivi quali *Bacillus subtilis* [11], *Bacillus cereus* [12], *Streptococcus pyogenes* [13] e *Staphylococcus aureus* [14] sia Gram negativi come *Escherichia coli* [12]. L'attività antifungina, sinora poco conosciuta, è stata evidenziata nei confronti di funghi sia unicellulari quali *Candida albicans* che pluricellulari quali *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus flavus* e *Penicillium digitatum* [15].

La sua elevata efficacia, il suo vasto spettro di azione, l'assenza di effetti collaterali ed il suo facile utilizzo hanno così diffuso l'utilizzo della propoli in medicina sia per la sanitizzazione dei locali che per il trattamento localizzato di micosi ed infezioni varie.

Lo scopo di questo lavoro preliminare è stato quello di verificare se questa sostanza potesse svolgere una azione di contenimento anche nei confronti delle muffe superficiali dei formaggi ed in particolare del *Mucor* spp. senza peraltro determinare modificazioni strutturali, compostive e sensoriali nei prodotti trattati.

MATERIALI E METODI

Sono state effettuate cinque prove (Tab. 1) di cui due presso un'azienda agricola su formaggi da latte crudo a breve e media stagionatura (1A-1B) e tre in caseificio su formaggi da latte crudo e pastorizzato a media stagionatura (2A-2B-2C).

Per le diverse sperimentazioni sono stati utilizzati formaggi con almeno 10 giorni di stagionatura e comunque dopo due o tre giorni dalla salatura. Le forme utilizzate (tre per ciascun trattamento) provenivano tutte dallo stesso lotto di produzione.

Le soluzioni di propoli sono state sempre preparate il giorno precedente l'utilizzo sciogliendo in 20 mL di etanolo assoluto la quantità di propoli necessaria e portando ad 1 L con acqua deionizzata. Per la scelta delle

Tabella 1 - Schema delle prove effettuate.

Prova	Formaggio utilizzato	Trattamento	Stagionatura (giorni)
Test	Cheese	Treatment	Ripening (days)
1A	Toma piemontese DOP (latte crudo intero bovino, caglio bovino, cagliata non colata)	- Soluzione etanolotacqua (2%) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (1.5 g/L)</i>	60
	(raw cow milk, bovine rennet, not cooked curd)	- Soluzione idroalcolica di propoli (1.5 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (1.5 g/L)</i>	
		- Soluzione idroalcolica di propoli (6 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (6 g/L)</i>	
1B	Formaggio tipo robiola (latte crudo intero bovino, coagulazione acida)	- Testimone - <i>Nat treated</i>	15
	(raw cow milk, acid-precipitated curd)	- Soluzione etanolotacqua (2%) - <i>Hydro-alcoholic solution (2%)</i>	
		- Soluzione idroalcolica di propoli (6 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (6 g/L)</i>	
2A	Toma piemontese DOP (latte crudo intero bovino, caglio bovino, cagliata non colata)	- Testimone - <i>Nat treated</i>	60
	(pasteurized cow milk, bovine rennet, not cooked curd)	- Soluzione etanolotacqua (2%) - <i>Hydro-alcoholic solution (2%)</i>	
		- Soluzione idroalcolica di propoli (1.5 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (1.5 g/L)</i>	
2B	Bra tenero DOP (latte pastorizzato intero bovino, caglio bovino, cagliata non colata)	- Soluzione idroalcolica di propoli (1.5 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (1.5 g/L)</i>	60
	(pasteurized cow milk, bovine rennet, not cooked curd)	- Soluzione idroalcolica di propoli (6 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (6 g/L)</i>	
		- Soluzione idroalcolica di propoli (12 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (12 g/L)</i>	
2C	Toma piemontese DOP (latte pastorizzato intero bovino, caglio bovino, cagliata non colata)	- Testimone - <i>Nat treated</i>	60
	(pasteurized cow milk, bovine rennet, not cooked curd)	- Soluzione etanolotacqua (2%) - <i>Hydro-alcoholic solution (2%)</i>	
		- Soluzione idroalcolica di propoli (1.5 g/L) - <i>Hydro-alcoholic solution of propolis (1.5 g/L)</i>	

concentrazioni si sono considerati i risultati di un precedente lavoro [15] che indicavano in 1,5 g/L di propoli la dose minima attiva in piastra sulla maggioranza dei funghi di interesse medico ed agrario. Nella prova 1B non si sono superati i 6 g/L in quanto si operava su di un prodotto da consumarsi fresco e quindi con minori problemi di inquinamento fungino

superficiale. In ciascuna prova erano sempre presenti quali testimoni tre forme non trattate ed altrettante trattate con una soluzione idroalcolica al 2%. La propoli utilizzata nella sperimentazione era di produzione piemontese.

Il trattamento dei formaggi è stato effettuato lavando le forme con una spugna imbevuta di soluzione avendo cura di sostituire la spugna fra un trattamento ed il successivo.

I campioni sono stati stagionati nelle celle presenti presso le stesse Aziende dove si sono svolte le prove. La temperatura delle celle era di circa 10 °C e l'umidità relativa del 95%. Solo nel caso della prova 2C si è utilizzato un locale naturale con umidità del 100%.

Al termine della fase di stagionatura sui formaggi sono stati determinati il contenuto in sostanza secca, in grasso, in proteine, in azoto solubile ed il valore dell'acidità mediante i Metodi Ufficiali di analisi dei formaggi [16]. Le differenze compositive fra le diverse tesi a confronto sono state esaminate mediante analisi della varianza e successivi test di Duncan. L'elaborazione dei dati è stata effettuata con il software Statistica ver. 6.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). La microflora superficiale è stata valutata dopo prelievo superficiale e crescita su PCA (Plate Count Agar - Difco) e AM (Malt Agar - Difco).

È stato altresì eseguito un rilievo sensoriale al fine di evidenziare un effetto olfattivo e/o gustativo della propoli sul formaggio mediante un esame di comparazione a coppie [17] fra i prodotti testimone e quelli trattati a cui hanno preso parte 12 assaggiatori.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nel caso della Toma piemontese DOP prodotta in azienda agricola da latte crudo (1A) la crosta delle forme testimone e di quelle trattate con soluzione idroalcolica presentava un diffuso sviluppo di miceti appartenenti in particolare al genere *Mucor* (Fig. 1a, b). Le forme trattate con propoli presentavano invece uno sviluppo fungino lieve ad 1.5 g/L (Fig. 1c) ed assente a 6 g/L (Fig. 1d) ed a 12 g/L (Fig. 1e). La crosta risultava regolare e di colore biancastro con sfumature gialle molto tenui solo nei prodotti trattati con la soluzione a 12 g/L.

La composizione chimica dei formaggi trattati non ha evidenziato differenze statisticamente significative rispetto a quella dei prodotti non trattati, la pasta era regolare ed all'assaggio non è stato possibile rilevare né odori né aromi riconducibili al trattamento con propoli né differenze organolettiche statisticamente significative. Anche la stessa crosta non ha evidenziato alcun odore anomalo riconducibile al trattamento con propoli.

Risultati analoghi sono stati ottenuti anche nella seconda prova (1B) dove la formazione di muffe superficiali è risultata totalmente inibita dal trattamento con la soluzione di propoli. È da rilevare però la comparsa sulle croste delle forme trattate di una leggera colorazione giallo-paglieri-

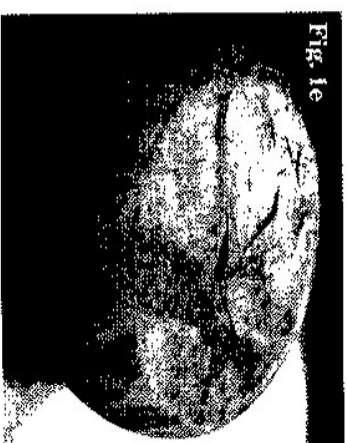


Figura 1 - Prova 1A: particolare di una delle forme testimone (a), di una forma trattata con soluzione idroalcolica (b), di una forma trattata con una soluzione ad 1,5 g/L di propoli (c), di una forma trattata con una soluzione a 6 g/L di propoli (d) e di una forma trattata con una soluzione a 12 g/L di propoli (e).

Figure 1 - Test 1A: rind details of not treated cheese (a), of cheeses treated with hydro-alcoholic solution (b), of cheese treated with propolis at 1.5 g/L (c), of cheese treated with propolis at 6 g/L (d) and cheese treated with propolis at 12 g/L (e).

no il che fa ritenere che 6 g/L siano la concentrazione massima utilizzabili nel caso di formaggi a maturazione breve.

Come già per la Toma piemontese DOP anche in questo caso il trattamento non ha però determinato alcuna variazione della composizione dei prodotti, della struttura della pasta, dell'odore o del sapore della stessa. Anche la crosta, nonostante la presenza di una tenue colorazione giallopaglierino, non presentava alcun odore od aroma riconducibile al trattamento con propoli.

Le prove effettuate in caseificio su Toma piemontese DOP (2A) e di Bra tenoro DOP (2B) hanno dato risultati tra loro analoghi e simili a quelli ottenuti presso l'azienda agricola. Nel caso del Bra tenoro DOP (Fig. 2), dopo 60 giorni di stagionatura, sulle croste delle forme testimone e di quelle trattate con la soluzione idroalcolica si rilevava un diffuso sviluppo superficiale di funghi appartenenti in prevalenza ai generi *Mucor* e



Figura 2 - Prova 2B: sviluppo superficiale di *Mucor* spp. e *Penicillium* spp. sulla crosta di una delle forme non trattate (sopra) e di una trattata con propoli (6 g/L, sotto) dopo 60 giorni di stagionatura.

Figure 2 - Test 2B: superficial growth of *Mucor* spp. and *Penicillium* spp. on the rinds of not treated (above) and treated cheeses with propolis (6 g/L, below) after 60 days of ripening.

Penicillium, mentre sulle croste delle forme trattate lo sviluppo fungino, seppure presente, era molto più contenuto. La maturazione si è svolta in modo regolare per tutti i prodotti senza evidenziare dal punto di vista compositivo o sensoriale alcun effetto riconducibile ai diversi trattamenti.

Nella prova 2C, al fine di esasperare le condizioni di stagionatura, le forme sono state poste in un locale con il 100% di umidità relativa e su scaffali con altre forme che evidenziavano un diffuso attacco fungino superficiale.

Nonostante ciò dopo 60 giorni di stagionatura le forme trattate con la soluzione di propoli presentavano uno sviluppo pressoché inesistente di funghi, mentre quelle testimone risultavano quasi completamente ricoperte di muffe con forte prevalenza di *Mucor*, *Aspergillus* e *Penicillium* (Fig. 3). Anche per questi formaggi non è stata però evidenziata né dalle analisi compositive né da quelle sensoriali alcuna differenza fra i prodotti trattati e quelli testimone.

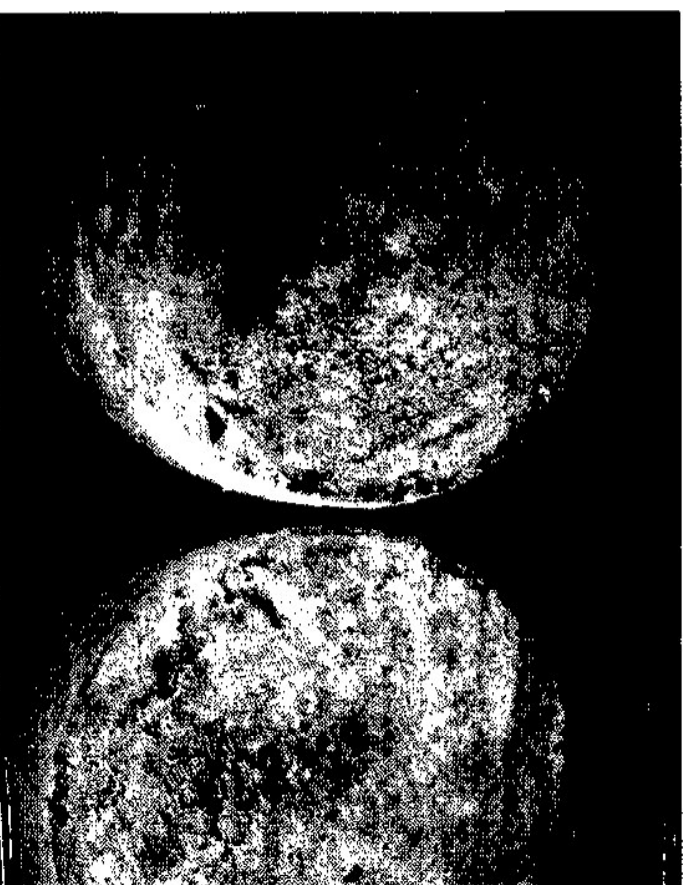


Figura 3 - Prova 2C: sviluppo fungino superficiale su di una forma non trattata (a sinistra) ed una trattata (a destra) dopo 60 giorni di stagionatura in cella con il 100% di umidità relativa.

Figure 3 - Test 2C: superficial growth of fungus in not treated (left) and in treated cheese (right) after 60 of ripening in a ripening room with 100% of humidity.

CONCLUSIONI

I risultati di questo studio preliminare hanno evidenziato che anche nel controllo delle muffe superficiali dei formaggi la propoli esercita una spiccata azione antifungina. I prodotti trattati con propoli evidenziano infatti uno sviluppo fungino superficiale molto contenuto anche nelle condizioni più sfavorevoli e questo oltre a consentire l'utilizzo di ambienti ad elevata umidità ambientale, rende quasi inutili le operazioni di colettatura prima della commercializzazione con evidenti risparmi di manodopera e di prodotto. Il trattamento con propoli non sembra però impedire lo sviluppo fungino, ma determinandone solo un rallentamento non ostacola la formazione della crosta e non modifica le caratteristiche visive e strutturali della crosta stessa. Il trattamento con propoli ha evidenziato un effetto esclusivamente superficiale e non ha determinato quindi alcuna modificazione delle caratteristiche strutturali e sensoriali del prodotto anche nel caso di formaggi freschi. Saranno però necessarie ulteriori e più approfondite indagini al fine di definire meglio la dose di utilizzo e valutare l'eventuale presenza di residui. L'applicazione della propoli è priva di controindicazioni per gli operatori e richiede per la sua esecuzione una manualità minima. È peraltro addirittura ipotizzabile che se il prodotto venisse autorizzato, il trattamento potrebbe essere effettuato per immersione diretta della forma così come avviene per la salatura, con una ulteriore riduzione della manualità necessaria e quindi dei costi.

RIASSUNTO - Nella produzione di molti formaggi il contenimento delle muffe superficiali costituisce uno dei principali problemi che il casaro si trova a dover risolvere poiché i prodotti antifungini, i fumiganti, le radiazioni ultraviolette o la paraffinatura non sono sempre utilizzabili. In questo studio è stato quindi sperimentato per il contenimento delle muffe superficiali di alcuni formaggi a breve e media stagionatura la propoli, un prodotto largamente conosciuto per le sue attività biologiche. Il trattamento superficiale dei formaggi con una soluzione idroalcolica di propoli ha evidenziato un effetto antifungino già ad una concentrazione di 1,5 g/L. Con concentrazioni superiori lo sviluppo fungino è molto modesto od assente. Il trattamento con propoli non ha evidenziato inoltre effetti sulla composizione né sulla struttura né sulle caratteristiche sensoriali dei formaggi anche nel caso di prodotti a breve stagionatura. Il trattamento è poco costoso e richiede un modesto impiego di manodopera soprattutto se le forme vengono immerse, come nella fase di salatura, direttamente nella soluzione di propoli. L'utilizzo di propoli consente inoltre di ridurre le ore lavorative e le perdite di prodotto per raschiatura e di utilizzare, se necessario, elevate umidità ambientali senza determinare un corrispondente aumento delle muffe superficiali.

Parole chiave: formaggio, muffe superficiali, propoli, *Mucor*

ABSTRACT - *Preliminary study on the control of superficial moulds of cheeses with propolis.* - In the production of many cheeses control of the superficial moulds is one of the main problems that the cheesemaker must resolve because antifungal products, fumigants, ultraviolet radiation or paraffin are not always useable. In this research propolis, a product widely known for its biological activities, was used for controlling the superficial moulds of short and medium ripening cheeses. The rind treatment with a hydro-alcoholic solution of propolis caused a slight fungus growth already at 1.5 g/L. With high concentrations the fungus growth was slight or absent. The propolis treatment produces no chemical texture or sensory modification of the cheeses even for products with a short ripening time. The treatment is inexpensive and time saving if the wheels are directly immersed, as for salting, in the propolis solution. With propolis there is also a reduction of labour and weight loss for superficial cleaning before marketing and it is possible, if necessary, to use high environmental humidity without a corresponding increase of the superficial moulds.

Keywords: cheese, superficial mould, propolis, *Mucor*

Ringraziamenti: Si ringraziano l'Azienda Agricola Terziano (Villarbasse, TO) ed il Caseificio Cooperativo "Valle Josina" (Peveragno, CN) per la collaborazione prestata nello svolgimento della sperimentazione.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Corradini C, Innocente N (2001). *Saggi preliminari di valutazione di sistemi alternativi per il controllo dello sviluppo di muffe superficiali nel formaggio Provolone Valpadana*. Sci. Tecn. Lat.-Cas., 52, 269-278.
- 2) Neviani E, Emaldi GC, Carini S (1981). *L'impiego di pimaricina come antifungino sulle croste dei formaggi: tecnologia e microflora di superficie*. Il Latte, 6, 335-343.
- 3) Park YK, Ikegaki M (1998). *Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 62(11), 2230-2232.
- 4) Simuth J, Trnovsky J, Jelokova J (1986). *Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonucleases by UV-absorbing components from propolis*. Pharmazie, 41, 131-132.
- 5) Greenaway W, Scaysbrook T, Whalley FR (1990). *The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford*. Bee World, 71, 107-118.
- 6) Marucci MC (1995). *Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity*. Apidologie, 26, 83-99.
- 7) Serra Bonvehi J, Ventura Coll F, Escola Jordà R (1994). *The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in diets*

- tics*. J. Am. Oil Chem. Soc., 71(5), 529-532.
- 8) Bankova VS, Popov SS, Marekov NL (1983). *A study of flavonoids of propolis*. J. Natural Prod., 46(4), 471-474.
 - 9) Ozcan M (1999). *Antifungal properties of propolis*. Grasas Y Aceites, 50(5), 395-398.
 - 10) Park YK, Koo MH, Abreu JAS, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL (1998). *Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms*. Curr. Micr., 36, 24-28.
 - 11) Bonvehi JS, Coll FV (2000). *Study on propolis quality from China and Uruguay*. J. Biosci., 55 (9-10), 778-784.
 - 12) Grange JM, Davey RW (1990). *Antibacterial properties of propolis (bee glue)*. J. Royal Soc. Med., 83, 159-160.
 - 13) Bosio K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino OI, Savoia D (2000). *In vitro activity of propolis against Streptococcus Pyogenes*. Letters Appl. Microbiol., 31, 174-177.
 - 14) Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S (1999). *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. J. Ethnophar., 64(3), 235-240.
 - 15) Detoma P, Ozino OI (1991). *Azione della propoli su microrganismi dell'ambiente ospedaliero*. Ann. Microbiol., 41, 231-236.
 - 16) Decreto Ministeriale 21 aprile 1986. *Approvazione dei metodi ufficiali di analisi dei formaggi*. Supplemento Ordinario Gazzetta Ufficiale n. 229 del 2 Ottobre 1986.
 - 17) UNI-ISO 5495:1987. *Analisi sensoriale – Metodologia – Esame per comparazione a coppie*.