



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

CESMA-Centro Servizi Metrologici Avanzati
Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo
Via Cintia - 80126 Napoli

Napoli, 05/05/2017

Spett.le
PANIFICIO BISCOTTIFICIO REGINA
Via De Gasperi 298
84016 Pagani (SA)

OGGETTO: *Valutazione preliminare delle fasi di gestione del lievito mediante diagrammi di flusso per la preparazione e il mantenimento della pasta acida e identificazione dei gruppi microbici*

A seguire si propone la relazione preliminare a valle del primo incontro (13 aprile 2017) tra l'Università di Napoli Federico II (a seguire UNINA) e il Panificio Biscottificio Regina (a seguire Panificio Regina) nell'ambito delle attività di consulenza richieste in seno a CESMA. L'incontro è avvenuto presso gli stabilimenti del committente e ha riguardato: 1) analisi preliminare di processo per la gestione della pasta madre e inquadramento dell'impianto produttivo; 2) prelievo di campioni superficiali con piastre da contatto; 3) prelievo di un campione di pasta madre.

1) Analisi preliminare di processo per la gestione della pasta madre e inquadramento dell'impianto produttivo

La diversità microbica è la principale responsabile dei meccanismi metabolici che portano all'*optimum* di fermentazione del lievito madre.

Al fine di disciplinare le fasi di gestione del lievito madre prodotto dal Panificio Regina, è necessario realizzare dei diagrammi di flusso e caratterizzare gli eventuali punti critici della produzione come a titolo di esempio riportato in Figura 1. L'obiettivo primario è quello dell'ottimizzazione delle ricerche sulla composizione e la lavorazione del prodotto. Come stabilito al **Punto 1) della proposta progettuale**, e in seguito al confronto tra UNINA e Panificio Regina il primo incontro ha messo in luce la necessità di recuperare una serie di informazioni base per la definizione e compilazione dei diagrammi di flusso, ed in particolare:

- Dati provenienza grano;
- Documentazione attestante tracciabilità della farina;
- Informazioni pellet utilizzato per la cottura degli impasti;
- Piantina del laboratorio (con suddivisione vari reparti);
- Scheda tecnica del fermentatore del lievito naturale e sonda manuale misurazione pH.



Pertanto, sarà indispensabile programmare un nuovo incontro presso il Laboratorio di produzione del Panificio Regina per acquisire le informazioni necessarie a valutare il processo produttivo, identificare i punti critici nella filiera e mettere a punto le eventuali strategie atte a migliorare le singole fasi di preparazione dei prodotti di lievitazione.

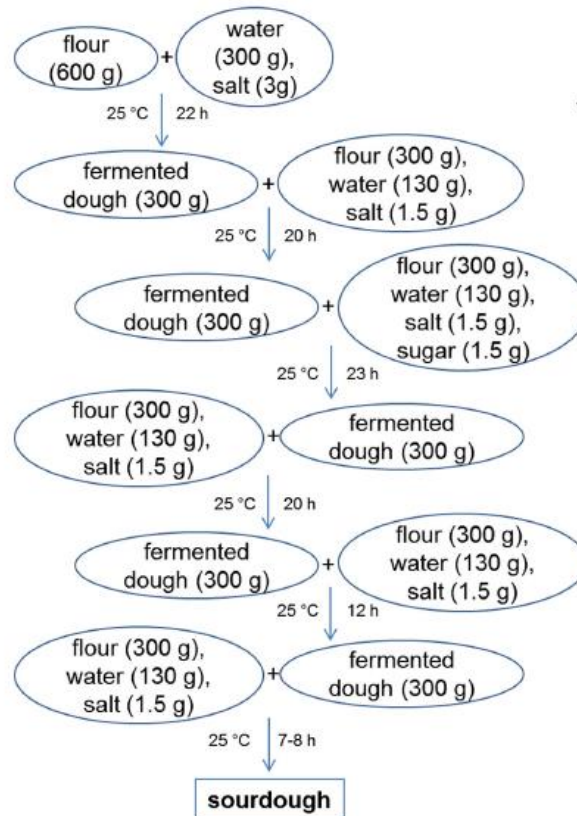


Figura 1 Diagramma di flusso per l'identificazione del protocollo di produzione (Minervini et al., 2014); flour = farina; water = acqua; salt = sale; sugar = zucchero; sourdough = pasta madre.

2) Prelievo di campioni superficiali con piastre da contatto

E' stata effettuata la raccolta di alcuni campioni preliminari per eseguire l'analisi dei consorzi microbiologici delle superfici degli ambienti e delle attrezzature dedicati alla preparazione e manipolazione degli impasti a base di lievito madre. Allo scopo si è proceduto all'utilizzo di di piastre da contatto. Il protocollo di valutazione dei campioni fa riferimento alle norme **ISO 18593:2004** (escluso par. 6 e 7) e **UNI EN ISO 4833-2:2013**. In particolare, i campioni sono stati prelevati da **3 punti critici del ciclo produttivo** (Figura 2):

1. Superficie d'appoggio dell'impasto;
2. Macchina sfogliatrice industriale;
3. Superficie d'appoggio dell'impasto post lavorazione.

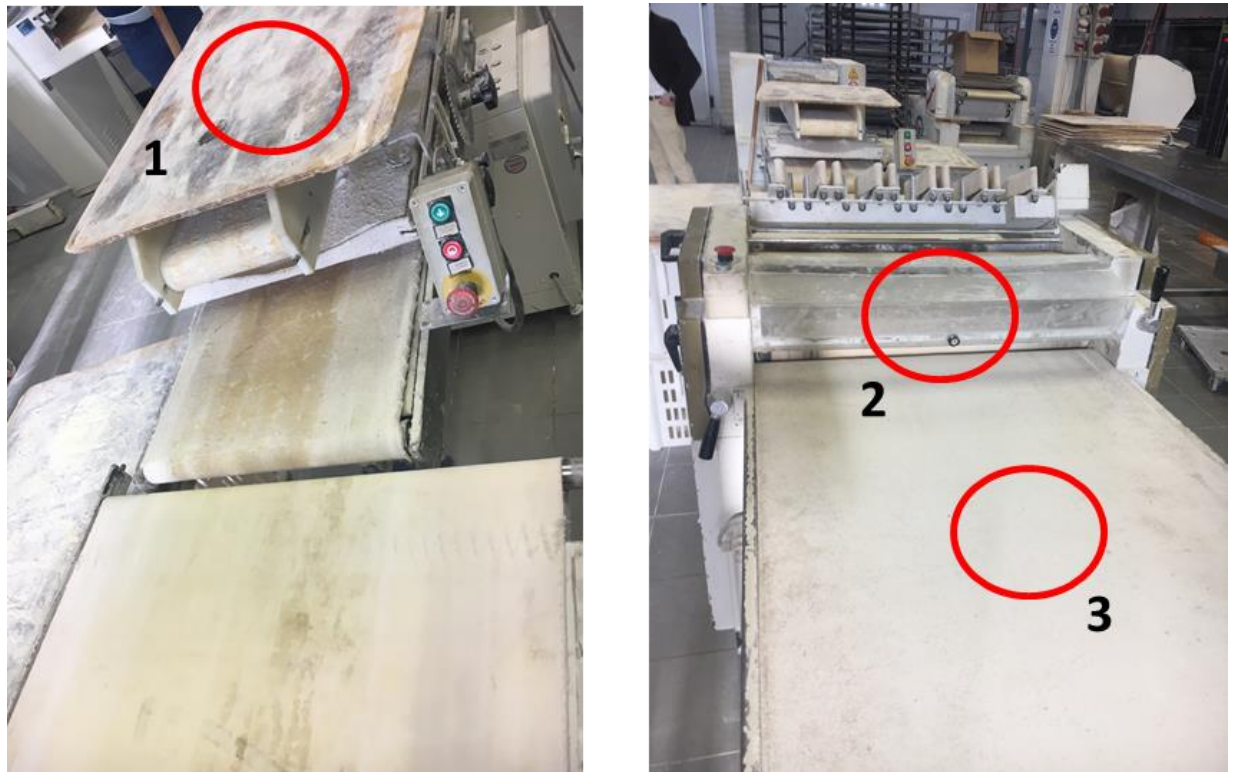


Figura 2 Identificazione ed analisi delle superfici di punti critici della filiera di produzione del lievito

I risultati prodotti hanno messo in luce una predominanza di lieviti, ed una presenza relativamente minore di batteri, classificabili morfologicamente come Bacilli: i microorganismi trovati, corrispondenti a quelli isolati dai campioni di lievito madre esaminati, non rappresentano, pertanto, un rischio per il consumatore.

3) Prelievo di un campione di pasta madre

Nell'ambito dello studio, come previsto dal **Punto 2) della proposta progettuale**, sono stati analizzati i campioni di LIEVITO MADRE, allo scopo di isolare ceppi di lieviti e batteri e valutare la composizione del suddetto prodotto.

Ciascun campione è stato precedentemente sottoposto ad arricchimento. Aliquote dei campioni sono stati inoculati in piastre di terreno generico e selettivo entro poche ore dall'arricchimento. Oltre alla determinazione degli organismi **Mesofili** – mediante l'ausilio di terreno generico – sono stati ricercati: **Bacilli, Lieviti e Muffe**. Le analisi sono state basate sui seguenti protocolli ISO:

DENOMINAZIONE DELLA PROVA	NORMA/METODO DI PROVA
Conta dei microrganismi mesofili aerobi	UNI EN ISO 4833-1:2013
Conta di Lieviti e Muffe	ISO 21527-2:2008
Ricerca e conta di Bacilli e <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932:2004



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

CESMA-Centro Servizi Metrologici Avanzati
Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo
Via Cintia - 80126 Napoli

Trattandosi di un'analisi preliminare atta a verificare il miglior approccio analitico da adottare nel corso del progetto, sono stati valutati differenti metodologie analitiche. Dunque, è stato stabilito un protocollo unico, basandosi sulla più rapida e pratica applicabilità delle analisi microbiologiche al fine di ottimizzare l'iter analitico.

Sono di seguito riportati i dati relativi alle **conte microbiologiche** dei campioni analizzati, in triplicato:

CODICE CAMPIONE	CONTA BATTERICA TOTALE [UFC/gr]	MUFFE E LIEVITI [UFC/gr]	BACILLI E <i>B. cereus</i> [UFC/gr]
Lievito R1	8740	6130	2208
Lievito R2	8660	6118	2170
Lievito R3	8730	6135	2196
Valore Medio	8753	6128	2191
Δs (Dev. Standard)	32,15	8,74	19,43

Il grafico di Figura 3 evidenzia la **composizione percentuale dei microorganismi** presenti nel lievito analizzato:

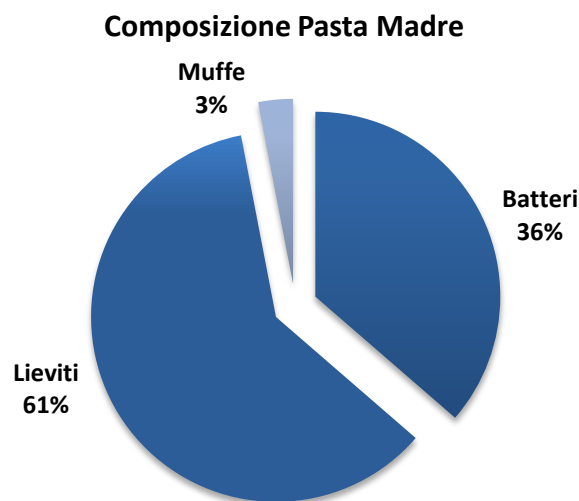


Figura 3 Distribuzione delle componenti microbiche isolate dalla pasta madre.

Sia su terreno generico, che su terreno selettivo per Bacilli, Muffe e Lieviti, è stata evidenziata la presenza di:

- Batteri: **12 microrganismi**
- Lieviti: **20 microrganismi**
- Muffe: **1 microrganismo**



La maggior parte dei microrganismi presenti, sulla base della valutazione della morfologia delle colonie, sono Lieviti, per le quali successive **analisi in biologia molecolare confermeranno l'appropriata classificazione.**

Dall'**osservazione al microscopio ottico** delle colonie di presunti **Lieviti** (Figura 4), è stato possibile confermarne la loro classificazione preliminare.

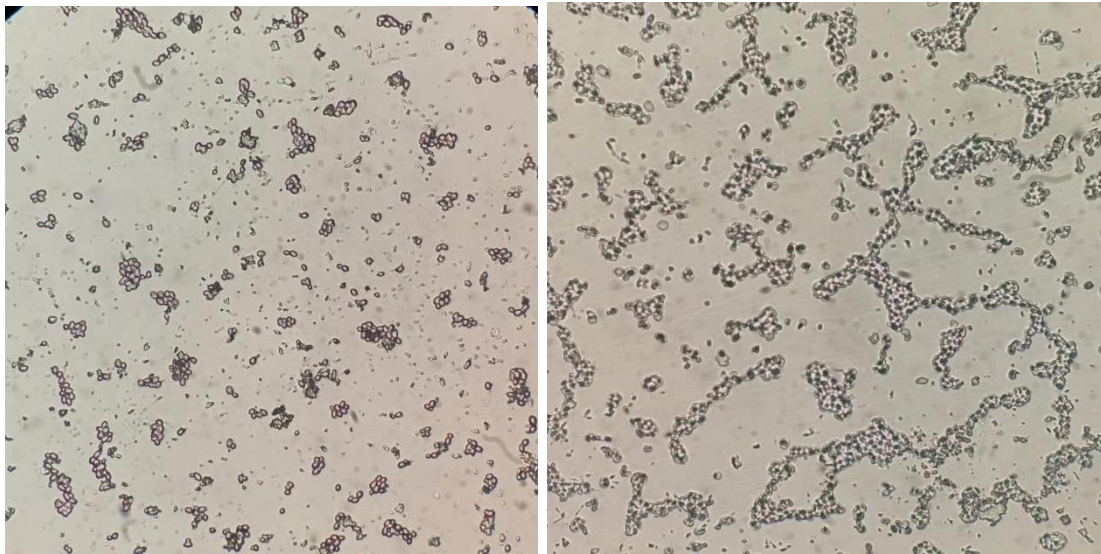


Figura 4 Osservazione al microscopio ottico di alcune colonie di sospetti Lieviti isolati dai campioni (40X).

La diversità microbica è risultata più evidente per quanto attiene ai Batteri osservati al microscopio ottico (ingrandimento 40X). Infatti, è stata possibile una preliminare identificazione di **Bacilli e Coccobacilli** (Figura 5).

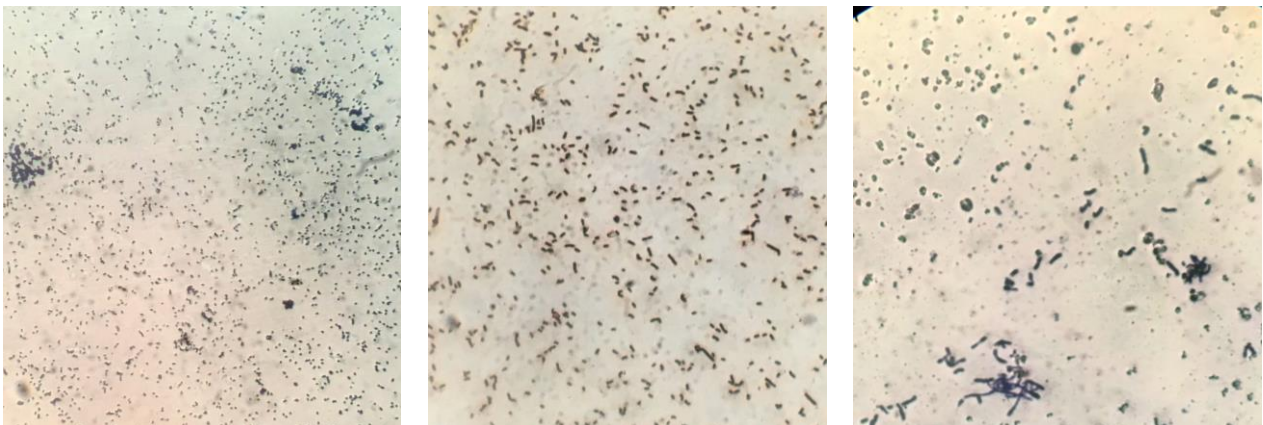


Figura 5 Osservazione al microscopio ottico di alcune colonie di sospetti Batteri isolati dai campioni (40X). Da sinistra a destra, sono classificabili Coccobacilli, Bacilli, e Bacilli filamentosi.



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO II

CESMA-Centro Servizi Metrologici Avanzati
Complesso Universitario di Monte Sant'Angelo
Via Cintia - 80126 Napoli

In funzione dei ceppi identificati, e nell'ottica del miglioramento dei diagrammi di flusso produttivi previsti dal progetto, potrebbe essere possibile ottimizzare la composizione del prodotto, bilanciando le specie in grado di contribuire positivamente alle fasi di fermentazione della pasta madre, anche allo scopo di ridurre la percentuale di lievito madre complessivamente impiegata negli impasti nonché migliorare l'intero processo produttivo.

Storcofide

Bibliografia

Minervini, F., De Angelis, M., Di Cagno, R., Gobbetti, M. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough (2014) *International Journal of Food Microbiology*, 171, pp. 136-146.

ISO 7932:2004. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* -- Colony-count technique at 30 degrees C. Disponibile su: <https://www.iso.org/standard/38219.html>

ISO 4833-1:2013. 2013. Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30°C by the pour plate technique. Disponibile su: <https://www.iso.org/standard/53728.html>.

ISO 4833-2:2013. 2013. Microbiology of the food chain -- Horizontal method for the enumeration of microorganisms -- Part 2: Colony count at 30 degrees C by the surface plating technique. Disponibile su: <https://www.iso.org/standard/59509.html>

ISO 18593:2004. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. Disponibile su: <https://www.iso.org/standard/39849.html>

ISO 21527-1:2008. 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0.95. Disponibile su: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail.htm?csnumber=38275/.