



Ricerca di Sistema elettrico

La tecnologia innovativa dei PEF per l'inattivazione microbica degli alimenti

Francesca Bonfà, Ilaria Bertini

Report RdS/2015/071

LA TECNOLOGIA INNOVATIVA DEI PEF PER L'INATTIVAZIONE MICROBICA DEGLI ALIMENTI

Francesca Bonfà, Ilaria Bertini

Settembre 2016

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

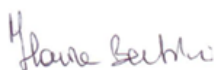
Piano Annuale di Realizzazione 2015

Area: "Efficienza energetica e risparmio di energia negli usi finali elettrici e interazione con altri vettori energetici"

Progetto: "Processi e macchinari industriali"

Obiettivo: F "La tecnologia innovativa dei PEF per l'inattivazione microbica degli alimenti"

Responsabile del Progetto: Ing. Ilaria Bertini, ENEA



Indice

SOMMARIO	4
FASE 1 – STABILIZZAZIONE ALIMENTARE.....	5
1 TRATTAMENTI DI INATTIVAZIONE	5
1.1 TRATTAMENTI TRADIZIONALI E INNOVATIVI	6
2 COMPLESSO MICRORGANISMO – ALIMENTO.....	7
BLOCCO A – MICRORGANISMI	7
2.1 CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE	7
2.2 METABOLISMO DEI MICRORGANISMI	9
2.2.1 <i>Condizioni e variabili di crescita</i>	10
2.1 CURVA DI CRESCITA E LEGGI DI DECADIMENTO DELLA POPOLAZIONE MICROBICA	18
BLOCCO B – SPECIFICITÀ DEI TRATTAMENTI DI INATTIVAZIONE MICROBICA E DEGLI ALIMENTI	20
2.2 TRATTAMENTI DI PASTORIZZAZIONE A CONFRONTO	20
2.2.1 <i>Parametri di processo dei trattamenti termici di pastorizzazione</i>	22
2.3 TRATTAMENTI TERMICO DI RISCALDAMENTO RESISTIVO (OHMICO)	22
2.4 CARATTERISTICHE CHIMICO - FISICHE DEGLI ALIMENTI.....	23
FASE 2	24
3 TRATTAMENTI DI INATTIVAZIONE MICROBICA MEDIANTE PEF.....	25
3.1 DIPENDENZA DAI PARAMETRI DI PROCESSO E DI PRODOTTO.....	25
3.2 DESCRIZIONE DEI PARAMETRI E VARIABILI DI PROCESSO.....	27
3.3 TRATTAMENTO PEF – STRUMENTAZIONE E INGEGNERIZZAZIONE	29
3.3.1 <i>Principio di funzionamento – schema d’impianto PEF</i>	30
4 SCHEMA IMPIANTO PILOTA	32
4.1 CARATTERISTICHE DEI COMPONENTI (LATO MICRORGANISMO)	32
4.2 CONTA DELLA POPOLAZIONE.....	34
4.3 APPLICAZIONI INDUSTRIALI – VINO, LATTE E SUCCHI DI FRUTTA.....	36
4.3.1 <i>VINO</i>	36
4.3.1.1 <i>Tecniche di stabilizzazione dei vini</i>	36
4.3.2 <i>LATTE</i>	38
4.3.2.1 <i>Tecnica alternativa alla pastorizzazione del latte</i>	38
CONCLUSIONI	39
RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	39

Sommario

Il presente lavoro riguarda l'applicazione di un sistema innovativo per l'inattivazione microbica, mediante campi elettrici pulsati (PEF). L'impiego dei PEF, documentata dalle analisi delle esperienze pregresse e dalla letteratura del settore suggeriscono che la tecnica sia efficace per abbattere la popolazione batterica di alimenti liquidi.

Ad oggi le ricerche, sono limitate all'impiego della tecnica di inattivazione mediante PEF su scala di laboratorio e applicata a pochi millilitri di campione alla volta. Nella letteratura scientifica del settore, sono presenti diversi esperimenti di impiego dei PEF per la pastorizzazione a freddo degli alimenti (succhi di frutta , vino et al.).

L'attività effettuata mira a individuare, non solamente, quali sono i parametri fisici e le caratteristiche chimiche alla base del fenomeno di inattivazione mediante PEF, ma soprattutto, quali sono i punti di forza e le criticità dell'applicazione. Ad es. eliminare o ridurre l'uso di aggressivi chimici che risultano dannosi per l'organismo umano, oppure, eliminare interventi termici di pastorizzazione che alterano le proprietà organolettiche di molti alimenti. Pertanto, nella prima fase del lavoro è stata effettuata una prima analisi dei microrganismi in funzione delle caratteristiche peculiari in base a cui vengono identificati le modalità di sopravvivenza e i loro meccanismi di crescita. A tal proposito, l'analisi è stata effettuata con un duplice obiettivo: comprendere sia quali sono le condizioni strutturali delle differenti tipologie di microrganismi (composizione e forma del tipo di cellula) e sia le condizioni ambientali che, oltre la sopravvivenza, influenzano la crescita e i suoi meccanismi.

Questa fase dell'indagine è complementare a quella che ha portato a individuare le caratteristiche chimiche degli alimenti (PH, conducibilità, contenuto di acqua, resistenza, ecc...) che favoriscono l'inattivazione microbica mediante campi elettrici pulsati.

Al termine dell'analisi, è stato possibile definire le fasi e le procedure di applicazione del blocco A/B (complesso microrganismo-alimento) del presente lavoro.

I risultati, della fase precedente, sono stati fondamentali per definire i parametri e le variabili di controllo che consentono di ottenere dei risultati ottimali, sia riguardo l'efficienza tecnico - energetica dell'applicazione e sia riguardo l'efficacia del trattamento di inattivazione microbica. Poiché, presumibilmente, l'applicazione richiede di impegnare potenze elettriche notevoli, l'orientamento privilegiato per la generazione dei PEF è quello dell'impiego della scarica capacitiva, con impulsi da 20 kV a decremento esponenziale di durata tra una e due decine di microsecondi. In alcune esperienze analizzate [1]¹, i sistemi sul profilo della generazione degli impulsi sono molto complessi e presumibilmente anche costosi, basti pensare ai dispositivi di commutazione necessari per scaricare i condensatori.

Nell'ottica di un impiego dei PEF, oltre che su piccola scala, anche su una scala allargata al settore industriale, le attività future saranno finalizzate all'eliminazione dei batteri col metodo PEF e a verificare e/o escludere eventuali produzione di sostanze nocive a seguito del processo di abbattimento batterico. A tal proposito, sarà fondamentale procedere al riconoscimento e alla conta della popolazione batterica prima e dopo ogni intervento di abbattimento.

L'aspetto di rilievo dei futuri sviluppi, riguarderà la fattibilità tecnica - economica e la progettazione della strumentazione per produrre gli impulsi PEF e per la loro gestione, nei dispositivi sperimentali. Partendo dai risultati già ottenuti in Italia e all'estero, si intenderebbe pervenire ad un improvement delle tecniche di produzione degli impulsi PEF, sia sul piano dell'efficienza che del costo degli impianti.

¹ Generatore da 40 kV e 10 kA

FASE 1 – Stabilizzazione alimentare

1 Trattamenti di inattivazione

La sicurezza alimentare rappresenta per il mondo industriale e per la collettività uno degli aspetti intrinseci della vita quotidiana a interesse sempre crescente. Di fatto, funzionalmente potrebbe essere considerata una cartina di tornasole della qualità e del modo di vivere, che ha un'elevata risonanza nell'opinione pubblica. L'incidenza sull'economia del paese è duplice, riguarda sia il produttore e sia il consumatore finale; per l'utente la sicurezza alimentare rappresenta un costo diretto da sostenere per l'acquisto di prodotti di qualità e per esigenze e/o eventuali conseguenze igienico-sanitarie.

Il presente lavoro mira ad analizzare, tra le tecnologie innovative, l'applicabilità dei PEF per abbattere i microrganismi di prodotti aventi determinate caratteristiche chimico-fisiche, cercando di garantire e preservare le caratteristiche sensoriali del prodotto finito.

La sanificazione degli alimenti, per la maggioranza dei prodotti, viene effettuata mediante tecniche e trattamenti consolidati come ad es. quelli termici e chimici. Nella **Figura 1**, si riporta una panoramica dei trattamenti di conservazione utilizzati [2].

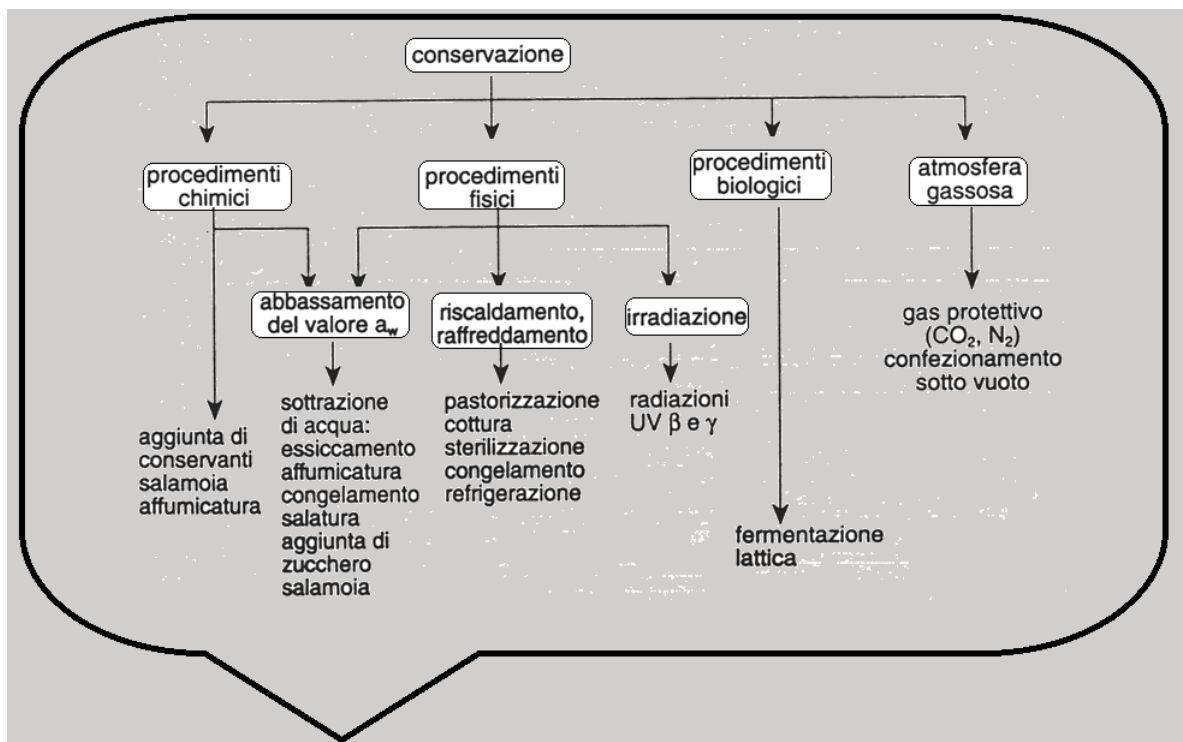


Figura 1. Processi di conservazione alimentare

Nella **Figura 1**, i metodi sono stati messi a confronto in funzione del risultato che si intende ottenere. Come si evince dalla stessa, il medesimo risultato si può conseguire mediante processi che si basano su meccanismi di azione differenti; ad es. la riduzione del l'acqua libera a_w si può ottenere sia con un metodo chimico (aggiunta di sale o zucchero) o mediante un metodo fisico (riscaldamento).

1.1 Trattamenti tradizionali e innovativi

I trattamenti tradizionali vengono effettuati con i metodi riportati in Tabella 1, [2],[3]. Si osserva nella stessa, che i metodi fisici si basano principalmente sull'azione termica del calore. In particolare, schematizzandoli in funzione del valore della temperatura in gioco e del tipo di inattivazione, si distinguono in trattamenti:

- a bassa temperatura → refrigerazione e congelamento
- a alta temperatura → pastorizzazione e sterilizzazione
- di disidratazione → concentrazione, essiccamento, liofilizzazione
- a variazione di atmosfera → confezionamento sottovuoto e ambiente modificato
- a radiazione → radiazioni ionizzanti

Per quanto riguarda invece, i metodi chimici si differenziano a secondo del tipo di conservante addizionato. In base alla natura del conservante utilizzato, si distinguono:

- conservanti naturali → salagione, alcol, aceto, zucchero e olio
- conservanti artificiali → additivi chimici

Tabella 1. Metodi tradizionali di conservazione alimentare

Metodi tradizionali			
Metodi fisici	Metodi chimici	Metodi fisico-chimici	Metodi biologici
Basse Temperature	Conservanti naturali	Affumicamento	Fermentazioni
Alte Temperature	conservanti artificiali	Active packaging	Uso di enzimi
Disidratazione			
Variazione di atmosfera			
Radiazione			

Infine, nella Tabella 2 si riportano altri metodi di conservazioni di tipo fisico-chimici e biologici, molto utilizzati nella catena alimentare sia della grande distribuzione e sia del privato consumatore.

Tabella 2. Metodi tradizionali di conservazione alimentare

Metodi di conservazione	
Metodi fisico-chimici	Metodi biologici
Affumicamento	Fermentazioni
Active packaging	Uso di enzimi

Per quanto riguarda i procedimenti innovativi , si riportano nella Tabella 3 sia quelli che hanno raggiunto una maturità tecnologica e sono largamente applicati come ad es. il riscaldamento ohmico e, sia quelli ancora in fase di definizione sperimentale, come I PEF.

Tabella 3. Metodi innovativi di conservazione alimentare

Metodi innovativi	
Metodi fisici	Metodi chimici
Alte pressioni	Batteriocine
Ultrasuoni	chitosani
Riscaldamento ohmico	
Campi elettrici pulsati	

2 Complesso microrganismo – alimento

A partire dalle analisi di dettaglio delle singole componenti e variabili, che caratterizzano la catena di formazione e controllo dell'attività microbica, è stata effettuata la suddivisione dell'intero processo, nelle fasi strutturali di sperimentazione, scindendolo in due macro-blocchi A e B sia dal punto di vista quantitativo e sia qualitativo. Nel blocco A sono state inserite le operazioni fondamentali che riguardano l'analisi predittiva microbica. Mentre nel Blocco B sono state considerate l'insieme degli elementi strutturali e dei componenti strumentali necessari per l'esecuzione e riuscita del processo di inattivazione microbica in base al trattamento scelto.

BLOCCO A ⇒ Analisi microbiologica suddivisa in:

- classificazione delle diverse popolazioni microbiche;
- esame delle caratteristiche strutturali del microrganismo (composizione, grado di resistenza, PH, ecc.);
- individuazione del mezzo di coltura;
- parametri chimico-fisici dei trattamenti antimicrobici.

BLOCCO B ⇒ Analisi chimico- fisica alimenti e dei trattamenti

Blocco A – Microrganismi

2.1 Caratteristiche fisico-chimiche

Nelle prima fase dell'attività si è ritenuto indispensabile riconoscere e classificare i microrganismi, per meglio comprendere e facilitare l'inattivazione delle differenti specie microbiche responsabili delle alterazione organolettiche degli alimenti. A tal fine, si evidenzia per i microrganismi che determinano l'alterazione degli alimenti, definiti "dannosi", possono anche essere letali; mentre, alcuni di essi sono utilizzati nell'industria alimentare (ad esempio nella fabbricazione di yogurt, di pane, di birra) e per tale ragione sono detti "utili". In questo lavoro è stata effettuata una prima classificazione dei microrganismi in funzione dei seguenti fattori: forma, colore, condizioni e modalità di sopravvivenza, meccanismi di

riproduzione. I microrganismi esaminati sono: *batteri, germi, lieviti, muffe, protozoi e funghi*, che in determinate condizioni possono alterare le proprietà organolettiche degli alimenti [4],[5]. Essi non sono visibili ad occhio nudo a causa delle piccole dimensioni, dell'ordine dei millesimi di millimetro, tranne nel caso in cui si moltiplicano e formando le "colonie" diventano visibili anche ad occhio nudo, per esempio la muffa di frutta e verdura. Generalmente, se opportunamente isolati sono osservabili al microscopio. L'invisibilità può diventare pericolosa, in quanto può portare alla contaminazione di ambienti, superfici, attrezzature e alimenti, senza avere la percezione se non quando è manifesta l'alterazione. Ad es. un alimento contaminato non manifesta immediatamente la variazione del gusto e dell'odore, ma solo quando la carica batterica raggiunge valori elevati si notano modificazioni organolettiche e/o sensoriali. Per i microrganismi visibili ad occhio nudo, l'aspetto può rappresentare una caratteristica della specie che consente di individuarne la tipologia, come per i *miceti*. Questi ultimi sono esseri unicellulari e comprendono lieviti e muffe. Le muffe visibili al microscopio hanno l'aspetto di ramificazioni composte da più cellule unite tra loro, mentre quando sono visibili a occhio nudo assumono l'aspetto cotonoso ovvero di colonie colorate dal bianco al nero e dal verde all'azzurro. I lieviti, invece, possono assumere un aspetto cremoso e molli e sembrare anche mucillagini (crescita in colonia). I batteri sono caratterizzati da dimensioni leggermente inferiori ai miceti; essi trasformano le sostanze nutritive, necessarie alla loro sopravvivenza e crescita, rilasciandone i prodotti del metabolismo nell'ambiente in cui vivono, che a volte possono essere utili (ad es. l'acido lattico, gli aromi dello yogurt e dei formaggi) o dannosi come le tossine.

E' noto che gli alimenti costituiti da sostanze a bassa massa molecolare (M.M.) sono più facilmente degradabili dai microrganismi, rispetto alle sostanze più complesse a struttura polimerica. La trasformazione degli alimenti e la sua manifestazione, avviene con rapidità differente per le componenti proteiche, grasse e a base di carboidrati [6], [7], [8],[9].

Batteri

I batteri sono degli organismi unicellulari procarioti, è questa origine cellulare a differenziarli dagli organismi più "evoluti" come i funghi, le piante, gli animali che invece sono formati dalla cellula eucariota. La cellula procariota, più semplice e primitiva dell'eucariota non è costituita dal "classico" nucleo e il DNA è libero nel citoplasma. La membrana cellulare è circondata da una struttura rigida detta *parete cellulare*. Quest'ultima è formata da una sostanza costituita da zuccheri complessi (*peptidoglican*), che protegge e conferisce la forma alla cellula. Tra le caratteristiche più importanti che influenzano l'applicazione, si evidenziano le caratteristiche della membrana cellulare e la sua morfologia. Questo rappresenta un limite per il campo di applicabilità.

In base alla forma, i batteri si distinguono in:

- *cocchi* sono di forma sferica e tendono a unirsi in gruppi (*diplococchi*, *streptococchi*, *stafilococchi*). Ad es. *l'acetobatterio*, di forma sferica è responsabile della trasformazione del vino in aceto.
- *spirilli* sono a spirale. Ad es. il *Treponema denticola*, che produce la placca dentaria nell'uomo;
- i *bacilli* sono cilindrici. Ad es. la specie *Escherichia coli*;
- i *vibrioni* sono a virgola.

In base al colore, che i batteri assumono dopo la colorazione con il colorante di "Gram" si distinguono in:

- *gram-positivi* o *gram+* che diventano viola;
- *gram-negativi* o *gram-* che diventano rossi.

La differente risposta alla colorazione dipende dalla struttura della parete cellulare. Ad es. la parete cellulare dei batteri *gram +* è formata da uno spesso strato di *peptidoglicano*, che assorbe il colore diventando viola; mentre la parete cellulare dei *gram-* essendo più sottile è più permeabile ai coloranti e, il citoplasma assume la colorazione rossa. I batteri sono presenti ovunque in quantità enormi, perché si riproducono facilmente e velocemente per semplice **scissione**.

La scissione è una riproduzione asessuata, molto comune negli organismi unicellulari (batteri, alghe e protozoi), in cui la cellula si divide in due mediante una strozzatura o un setto trasversale, dando origine a due cellule più piccole.

Funghi

I funghi sono organismi viventi unicellulari e pluricellulari, eterotrofi, che si nutrono per assorbimento di materiale organico in decomposizione (saprofiti) o di sostanze nutritive sottratte ad altri organismi (parassiti). Appartengono al regno dei funghi organismi microscopici quali lieviti e muffe.

Lieviti

I lieviti, in natura, vivono sulla superficie dei frutti o in altre condizioni simili; sono funghi unicellulari eucarioti il cui corpo è una cellula tondeggianti di circa 5-10 micron di diametro.

Si riproducono generalmente per gemmazione, ovvero, una nuova cellula si estroflette da una cellula matura, finché si stacca per diventare indipendente quando ha raggiunto le dimensioni della cellula madre.

I lieviti o fermenti del vino e della birra hanno una grande importanza pratica perché sono capaci di compiere la fermentazione grazie a numerosi enzimi che contengono; questi enzimi degradano gli zuccheri (maltosio dell'orzo, glucosio e fruttosio dell'uva) in anidride carbonica e alcol. Tale reazione chimica libera energia che la cellula del lievito può usare per i propri processi vitali. I lieviti vengono anche utilizzati nella panificazione, poiché hanno la caratteristica di sviluppare dagli zuccheri l'anidride carbonica, che fa lievitare la pasta, mentre l'alcol presente si allontana, per evaporazione, nel calore del forno.

Su questo processo metabolico chiamato "**fermentazione alcolica**" è basata quindi, la preparazione del pane, del vino, della birra e in genere di tutte le bevande alcoliche non distillate.

In alcuni casi, i lieviti possono essere agenti di alterazioni degli alimenti, mentre, in altri possono essere responsabili dello sviluppo di gas e di colorazioni anomale.

Muffa

La muffa, come detto, è comunemente identificata dallo strato più o meno consistente e di vario colore che varie specie di funghi saprofiti, o più raramente parassiti, formano sulla superficie degli alimenti su cui si sviluppano. Si espandono meglio al freddo che al caldo e soprattutto in ambiente acido, utilizzando gli zuccheri delle sostanze alimentari. Per questo motivo si ritrovano negli alimenti con abbondante residuo secco e più alta acidità, come marmellate, gelatine e sciroppi, le cui soluzioni zuccherine sono assai concentrate. Alcune muffe (es. quelle verdi appartenenti al genere *Penicillium* e *Aspergillus*) possono provocare alterazioni a: pane, farine, burro, yogurt alla frutta, carne, verdure e latte.

2.2 Metabolismo dei microrganismi

Lo sviluppo dei microrganismi è influenzato da numerosi fattori: *la temperatura, l'umidità, la presenza o meno di ossigeno* [10],[11]. La temperatura è uno dei fattori principali per lo sviluppo in quanto influisce sulle condizioni della loro riproduzione; in genere, il calore viene utilizzato per uccidere i microrganismi, questi non sopravvivono per lungo tempo a temperature intorno a 60-65°C, al contrario, le basse temperature (freddo) rallentano la crescita.

Tutti i microrganismi necessitano di nutrimento (*specifiche condizioni ambientali*) e questo può essere costituito, oltre che da alimenti veri e propri, anche dai residui alimentari e dallo sporco presente nelle

attrezzature e sugli utensili. Per questo motivo l'applicazione di buone regole di igiene generale può evitare l'insorgenza di patologie.

Si distinguono, oltre che per le temperature a cui si riproducono, anche in relazione alla necessità di vivere in presenza o in assenza di ossigeno, ad es. le muffe hanno assoluto bisogno di ossigeno per vivere (aerobie strette). Tra i microrganismi anaerobi, che vivono in assenza di ossigeno, il più pericoloso per l'uomo è il *Clostridium botulinum*. Un altro dei fattori influenti sulla capacità di crescita e di sviluppo dei microrganismi è l'acidità; maggiore è il suo valore minore sarà la capacità di crescere che, invece, risulterà ottimale a pH neutro. I batteri hanno un metabolismo mediante il quale, attraverso la trasformazione chimica delle sostanze chimiche, viene prodotta l'energia necessaria alla sopravvivenza e riproduzione. In base al metabolismo cellulare, i batteri si distinguono in *autotrofi* che vivono utilizzando solo sostanze inorganiche e in *eterotrofi* che ricavano l'energia dalla demolizione di sostanze organiche. Alcune forme di batteri sono immobili, altre possono muoversi attivamente in un ambiente liquido, perché possiedono *flagelli* in numero e disposizione che risulta variabile da specie a specie. Molti batteri sopravvivono a condizioni ambientali sfavorevoli formando *spore*, cioè forme di resistenza, arrestando il proprio metabolismo e circondandosi con una robusta parete. Tali forme di resistenza possono mantenersi per anni e, non appena le condizioni ambientali migliorano, la spora si risveglia e germina, cioè dà origine ad una nuova cellula batterica. Le spore batteriche resistono alle normali temperature di cottura degli alimenti, per cui se non vengono prese adeguate precauzioni si possono verificare gravi tossinfezioni alimentari.

L'elevata presenza e diffusione dei batteri in natura (aria, suolo, acque, polvere e organismi vari) è dovuta principalmente: alle piccole dimensioni, all'alta velocità di riproduzione, alla loro resistenza a condizioni sfavorevoli, all'elevata capacità di adattamento, alle diverse forme di nutrizione. Le cellule batteriche sono costituite per l'80% di acqua, si evince che un grado di umidità elevato è indispensabile per la loro sopravvivenza, mentre muffe e lieviti si sviluppano su alimenti con umidità inferiore. In particolare, le spore delle muffe sono resistenti all'essiccamento e possono quindi sopravvivere a lungo. I batteri crescono meglio al buio mentre se esposti alla luce ultravioletta muoiono; per tali ragioni, durante certe lavorazioni alimentari spesso si utilizza questa fonte di luce.

I batteri trovano in alcuni cibi o bevande un ottimo terreno per il loro sviluppo e per la produzione delle loro tossine. In relazione a quanto detto, gli alimenti liquidi o di consistenza semiliquida sono i più favorevoli alla crescita batterica avendo un alto grado di umidità. Gli alimenti particolarmente a rischio sono: latte e derivati, prodotti di pasticceria alla crema, carne manipolata (in particolare se tritata), sughi, zuppe e salse e in genere tutti i cibi che vengono consumati crudi. Nei cibi freschi la moltiplicazione batterica e la conseguente produzione di tossine può avvenire anche molto rapidamente, in alcuni casi anche in meno di 12 ore, mentre nei cibi conservati lo sviluppo di eventuali batteri patogeni è assai più lento.

2.2.1 Condizioni e variabili di crescita

L'individuazione dei parametri fisici che caratterizzano la crescita dei microrganismi è prioritaria per il controllo, per la progettazione del banco strumentale e la buona riuscita delle future sperimentazioni dal punto di vista dell'efficacia dell'inattivazione microbica.

I fattori che influenzano il metabolismo e la crescita sono raggruppabili nei seguenti parametri caratteristici degli alimenti: potenziale redox, attività dell'acqua, pH, nutrienti e antimicrobici naturali [10][11]. Il loro effetto dipende dalle condizioni e dalle modalità di incidenza, più specificatamente possono manifestarsi separatamente o congiuntamente; questi in termini di caratteristiche d'influenza per i microrganismi e per gli alimenti, possono essere differenti a secondo dei meccanismi di azione.

Il comportamento dei microrganismi nei confronti dell'ossigeno è differente, generalmente, quando è assorbito dalla cellula viene ridotto dalla stessa, dando origine a sostanze tossiche per la cellula. Tuttavia, gli enzimi presenti nella cellula svolgono un'azione protettiva per i microrganismi. Tra gli enzimi protettivi dei batteri le catalasi sono estremamente efficienti nella loro azione protettiva contro il perossido di

idrogeno (H_2O_2). Le catalasi scindono l' H_2O_2 , prodotto molto reattivo, in acqua e ossigeno. Le catalasi sono presenti nei batteri aerobi, anaerobi facoltativi e microaerofili. Dall'attività biologica dei microrganismi con l'ossigeno, deriva la definizione di potenziale redox (E_{redox}), che individua la tendenza di un substrato ad acquisire elettroni si parla di fase di "riduzione" oppure a cedere elettroni, ovvero, fase di ossidazione. Nello stato ossidato le sostanze manifestano una ddp (differenza di potenziale) positiva (mV), mentre, nello stato ridotto risulta un valore negativo (-mV). Il potenziale di riduzione di un microrganismo in un alimento può variare, influenzando lo sviluppo degli altri microrganismi presenti. Questi, in base al loro valore iniziale del E_{Redox} non avrebbero avuto un successiva crescita [12][13]. In Tabella 4, si riporta il potenziale di riduzione di alcuni alimenti di largo consumo.

Tabella 4. Potenziale di ossidoriduzione

Tipo di Alimento	E_{redox} [mV]
Fegato	-200
Carni intere (potenziale interno)	
Formaggi	[- 20÷ -200]
Carne in scatola	[- 20÷ -150]
Carne tritata	200
Latte	[200÷ 340]
Burro	[290÷ 350]
Alimenti di origine vegetale	[300÷ 400]
Succo d'uva	409
Uovo non fecondato	500

Il PH misura l'acidità o la basicità di una sostanza; la sua scala di misura è compresa tra 0 e 14 unità pH, più una soluzione è acida minore è il suo valore di pH, al contrario più una soluzione è basica maggiore è il suo valore di pH. Analizzando, allora, la scala pH, possiamo dire che una *sostanza* è acida se il pH è minore di 7, neutra se il pH è uguale a 7 e basica se il pH è maggiore di 7 [12].

Gli alimenti non trattati risultano *debolmente acidi*, nella **Figura 2** sono riportati i valori di PH dei microrganismi. In base alla loro capacità di crescita ad uno specifico pH si distinguono in acidofili, neutrofilo e alcalofili [13], [14] . In letteratura, come riporta la **Figura 3** si riscontra che il PH ottimale per la crescita dei microrganismi *neutrofilo* rientra nell'intervallo compreso tra 5 e 9. Altri microrganismi, gli *acidofili* possono crescere a valori molto bassi $PH < 4,5$, mentre, i *basofili* a valori alti intorno a 10 , tuttavia il valore ottimale è quello a valori PH neutro pari a 7.

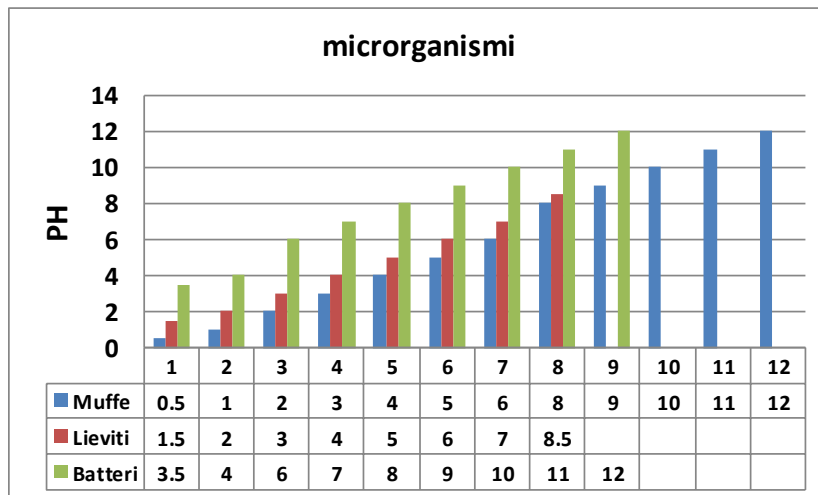


Figura 2. Microrganismi a confronto in funzione di pH

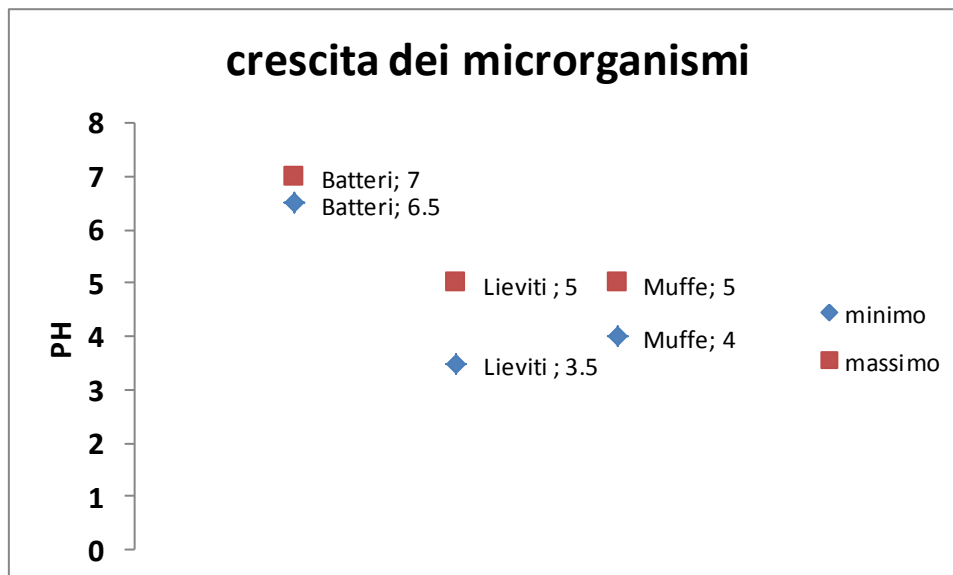


Figura 3. Valori minimi e massimi di pH

In **Tabella 5** si riportano i valori di pH i valori minimi e massimi per la crescita dei microrganismi. Essi dipendono dalle condizioni di acidità dell'ambiente e dal grado di dissociazione. Infine, nella stessa si riporta il pH ottimale del mezzo di coltura per la crescita di alcuni microrganismi, che verranno selezionati per le applicazioni sperimentali future, come si vedrà al §4.1.

Le altre condizioni che permettono ai microrganismi di vivere e ne favoriscono la crescita sono la **temperatura, l'acqua e l'aria**.

La temperatura è uno dei parametri che determina le condizioni favorevoli e/o sfavorevoli alla sopravvivenza e alla crescita batterica, e quindi risulta essere determinante per tutte le trasformazioni che possono verificarsi negli alimenti. Come detto, le temperature basse rallentano tutte le reazioni biologiche e chimiche, che potrebbero modificare gli alimenti rendendoli inutilizzabili, tuttavia alcuni batteri detti *psicrotropsi* sono capaci di resistere alle basse temperature.

Tabella 5. Valori di pH

microrganismo	minimo	range ottimale	massimo
<i>Escherichia coli</i>	4.3	6÷8	9
<i>Acetobacter aceti</i>	4	5.4÷6.3	9.2
<i>Batteri lattici</i>	3.2	5.5÷6.5	10.5
<i>Pseudomonas</i>	5.6	6.5÷7.5	8
<i>Enterobatteri</i>	5.6	5.8÷6.6	9
<i>Staphylococcus</i>	4.2	6.8÷7.5	9.3
<i>Bacillus</i>	5	6.8÷7.5	9.4÷10
<i>Clostridium</i>	4.6÷5.0	6.5÷7.5	9
<i>Fusarium spp.</i>	1.8	3÷3.5	11.1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2.35	4.5	8.6

Nelle [Figura 4](#), [Figura 5](#), [Figura 6](#), [Figura 7](#) per ogni specie microbica è riportato l'optimum di temperatura individuato per lo sviluppo e la crescita. Più precisamente, nelle [Tabella 6](#) e [Tabella 7](#) stesse sono indicati gli intervalli della temperatura ottimale di crescita. Tuttavia, al di sopra e sotto questi valori limiti esistono degli intervalli nei quali la crescita microbica, anche se più lentamente, può continuare. Si evidenzia inoltre che l'attività enzimatica e l'attività dell'acqua alle basse temperature sono ridotte, mentre alle alte temperature sono le proteine ad alterarsi.

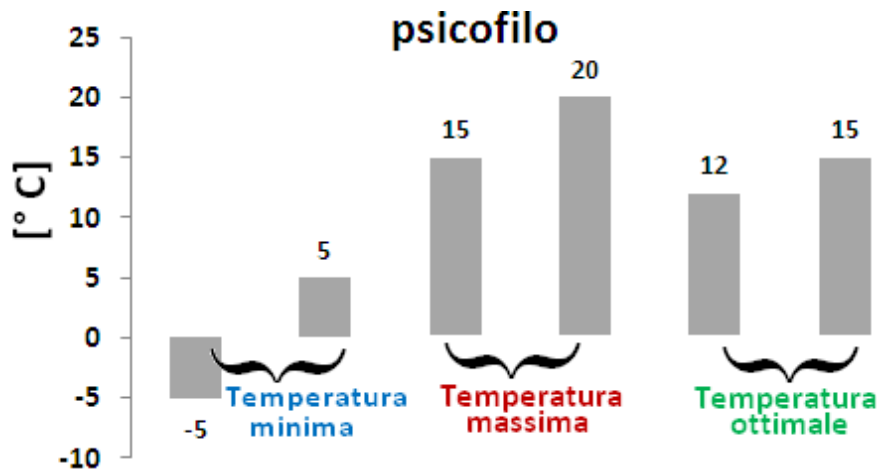


Figura 4. Intervalli di temperatura per i microrganismi psicofili

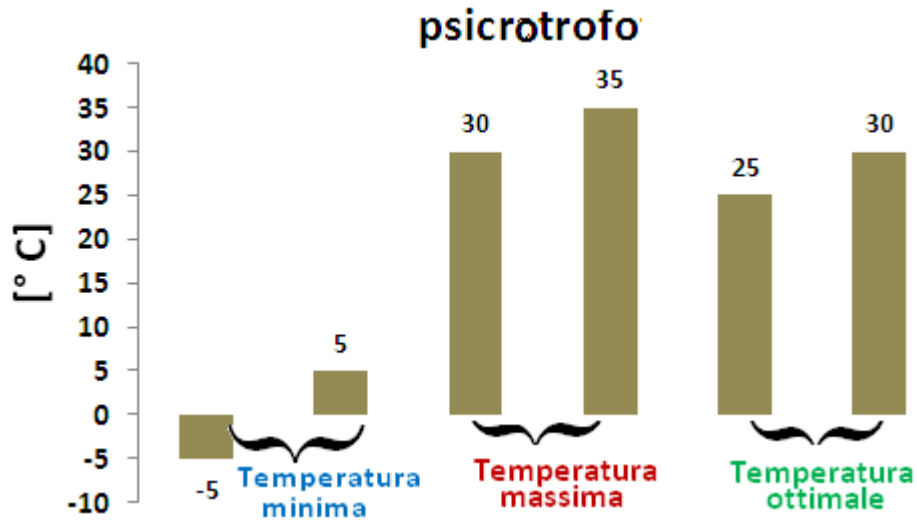


Figura 5. Intervalli di temperatura per i microrganismi psicrotrofi

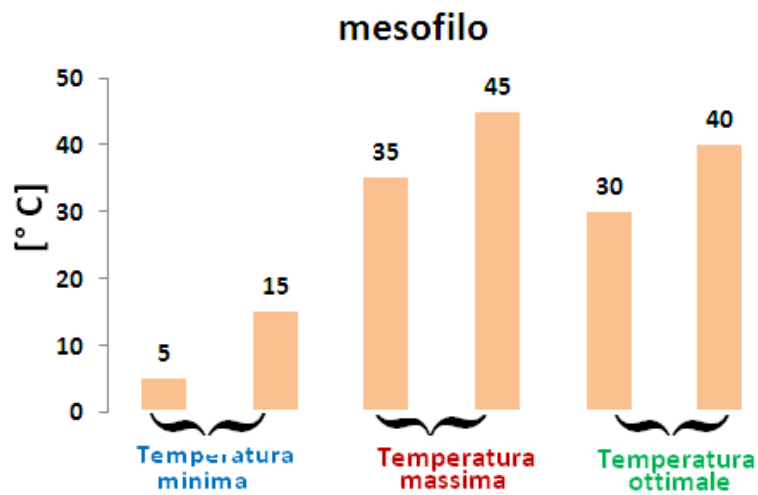


Figura 6. Intervalli di temperatura per i microrganismi mesofili

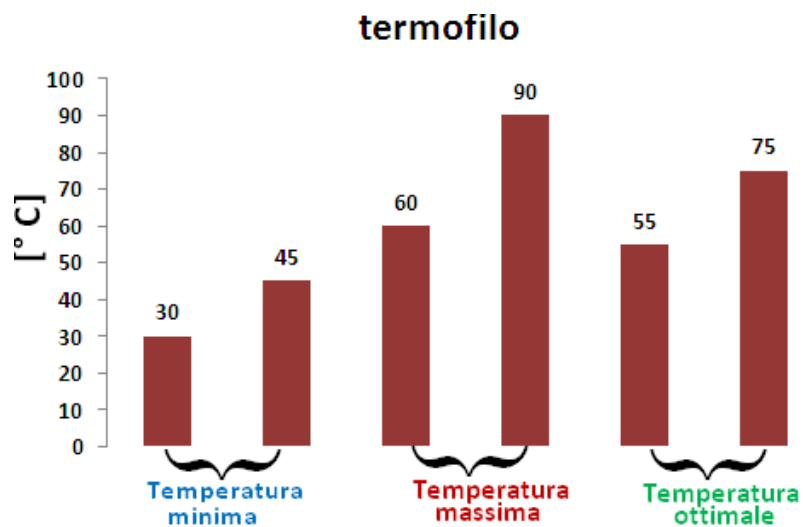


Figura 7. Intervalli di temperatura per i microrganismi termofili

Tabella 6. Temperatura per microrganismi mesofili

Batteri mesofili	
Organismi	Temperatura
Clostridium perfringens	12-15 °C
Clostridium perfringens Gruppo I	11-15 °C
Vibrio parahaemolyticus	>10 °C
Plesiomonas shigelloides	8-10 °C
Salmonelle	6-10 °C
Staphylococcus aureus	6-7 °C
- Produzione di tossine	18-20 °C
- Produzione di tossine	10-16 °C

Tabella 7. Temperatura per microrganismi psicrotrofi

Batteri psicrotrofi	
Organismo	Temperatura
Clostridium botulinum	3,0-3,3 °C
Gruppo II	
Listeria monocytogenes	0 °C
Yersinia enterocolitica	-2 °C
Aeromonas hydrophila	-2 °C
Bacillus cereus*	1-4 °C
E. coli (ETEC)*	1-4 °C
* Ceppi psicrotrofi di solito mesofili	

Altro parametro da considerare per il metabolismo, la crescita e la riproduzione dei microrganismi, come accennato, è il fabbisogno di ossigeno, in base al quale si distinguono in: *anaerobi facoltativi*, *anaerobi obbligati*, *ossigeno tolleranti*, *microaerofili* e *aerobi*. Gli anaerobi facoltativi crescono sia in assenza e sia in presenza di O₂, mentre quelli obbligati crescono solo in assenza di O₂, in questo caso utilizzano per la loro crescita l'energia derivante dalla fermentazione di altri processi. Gli aerobi crescono solo in presenza di O₂, così come i microaerofili, anche se con una quantità minore della percentuale di ossigeno contenuta nell'aria (< del 20%). Gli ossigeno-tolleranti, crescono sia in assenza e sia in presenza di O₂, sviluppando in entrambi i casi la stessa quantità di energia e di metaboliti [15].

Infine, l'ultimo elemento da cui dipende la crescita di un microrganismo è l'acqua. Affinché essa, possa contribuire alla crescita deve trovarsi nell'alimento sotto forma libera a_w. Si definisce "acqua libera" quella effettivamente disponibile per la crescita batterica che differisce da quella *naturalmente* presente negli alimenti cioè l'umidità. È definita dal rapporto tra la tensione superficiale p del vapore d'acqua sopra l'alimento e la tensione del vapore d'acqua allo stato di acqua pura p₀, per una data temperatura T (a T=0 °C la pressione di vapore dell'acqua pura vale circa 4,6 mmHg, mentre, a T= 25 °C vale circa 23.8 mmHg).

Le cause che rendono l'acqua indisponibile sono differenti, tra le più diffuse rientrano: il contenuto di sali o zuccheri disciolti, la sua presenza sotto forma di ghiaccio, quella derivante da fenomeni di idratazione o di assorbimento dalle superfici [15]. Ovviamente, per bloccare la crescita è necessario sottrarre l'acqua presente. La riduzione di a_w può ottenersi in due modi: mediante processi termici (come il congelamento, essiccamento), oppure, mediante l'aggiunta di sostanze che si legano chimicamente all'acqua.

Generalmente, negli alimenti l'acqua viene legata da alcuni componenti quali lo zucchero, il sale e le proteine, e proporzionalmente alla concentrazione di tali componenti si riduce la tensione superficiale del vapore acqueo p₀. I processi metabolici dei microrganismi sono influenzati diversamente dall'aria e dall'acqua presente a secondo della temperatura. Per rendersi conto dell'influenza dei parametri sopra descritti sul metabolismo e la crescita, nella [Figura 8](#) si riporta per il *Staphylococcus aureus*² l'andamento del contenuto di acqua al variare della temperatura in presenza d'aria (condizioni aerobiche) e in assenza d'aria (condizioni anaerobiche).

² che porta alla formazione dell'enterotossina A

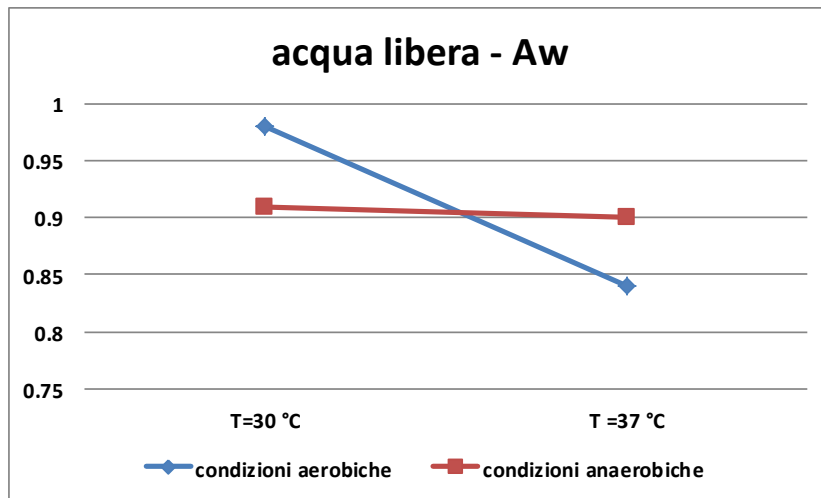


Figura 8. Andamento di aw in presenza e assenza di O₂

Il valore di aw, compreso tra 0 e 1, fornisce importanti indicazioni sulla deperibilità che aumenta all'aumentare di aw. Questi valori si verificano solo in determinate condizioni estreme e/o di laboratorio. Poiché, occorre tenere conto dell'umidità atmosferica, aw risulta direttamente proporzionale all'umidità relativa.

Tuttavia, il caso di p pari a zero può verificarsi nella materia secca, all'interno della quale non ci sono molecole di acqua in grado di esercitare una pressione di vapore, ovvero, la p è nulla.

Come si evince dalle Tabella 9 e Tabella 8 il valore minimo di aw per la crescita del microorganismo è pari a 0.60, pertanto negli alimenti caratterizzati da un valore di aw < 0.60 è scongiurata la loro crescita. Al di sotto dei loro valori minimi di aw, la crescita dipende dalla modalità di rimozione della stessa. Come visto, si può abbassare il contenuto di acqua aggiungendo sale o zuccheri; in questi casi si verificano fenomeni osmotici che provocano la morte della cellula del microorganismo sia per gli eventuali danni causati alla membrana e ai suoi enzimi, oppure, per i danni provocati agli enzimi citoplasmatici.

Tabella 8. Intervalli di aw per specie di microrganismi

intervallo di aw	microrganismo
0,97-0,96	Bacilli gramnegativi
0,95-0,91	Maggior parte dei batteri
0,94-0,87	Lieviti
0,90-0,86	Cocchi grampositivi
0,93-0,80	Muffe
0,80-0,75	Batteri alofili
0,65-0,60	Lieviti osmotolleranti
0,78-0,60	Muffe Xerotolleranti

Tabella 9. Acqua libera a_w per alcuni microrganismi

Gruppi	Valore minimo a_w	Microrganismi
Bacilli gramnegativi	0,97	<i>Pseudomonas</i>
<i>C. botulinum</i> tipo E	0,96	<i>Acinetobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Shigella</i> <i>C. botulinum</i> tipo E
Maggior parte dei batteri	0,95	<i>Salmonella</i> e altre <i>Enterobacteriaceae</i> <i>Bacillus</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Microbacterium</i>
	0,94	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i>
Lieviti	0,94	<i>Candida utilis</i>
	0,88	Maggior parte dei lieviti patogeni
	0,87	<i>Debaryomyces</i>
Cocchi grampositivi	0,90	<i>Micrococcus</i>
	0,86	<i>Staphylococcus aureus</i>
Muffe	0,93	<i>Rhizopus nigricans</i>
	0,83	<i>Penicillium expansum</i>
	0,81	<i>P. patulum</i>
	0,80	Maggior parte delle muffe patogene
Batteri alofili	0,75	<i>Halobacterium halobium</i>
Lieviti osmotolleranti (-fili)	0,62	<i>Saccharomyces rouxii</i>
Muffe Xerotolleranti (file)	0,78	<i>Aspergillus flavus</i>
	0,77	<i>A. ochraceus</i>
	0,70	<i>A. glaucus</i>
	0,69	<i>Chrysosporium fastidium</i>
	0,60	<i>Xeromyces bisporus</i>

Nella Tabella 10, sono riportati per molti alimenti il valore di acqua libera e, in alcuni casi anche l'intervallo del valore minimo .

Tabella 10. Acqua libera a_w per alcuni alimenti

alimento	a_w	alimento	a_w
Frutta secca	0.70	Fragole	0,65 - 0,75
Verdure disidratate	0.70	Patate	0,64-0,75
Latte magro in polvere	0.70	Carote	0,64-0,75
Farina	0.70	Cavolo	0,64-0,75
Zucchero	0.10	Salame fresco	0,99
Crackers	0.10	Carne di manzo	0,94
Latte condensato zuccherato	0.833	Pane	0,96
Miele	0.75	Formaggio fresco	0,97
Marmellate e gelatine	0.82-0.94	Uova	0,97
Macedonia in scatola	0.988	Succhi di frutta	0,97
Pomodori interi in scatola	0.993	Frutta fresca	0,97
Succo di pomodoro	0.975	Verdure fresche	0,97

2.1 Curva di crescita e leggi di decadimento della popolazione microbica

Quando un microrganismo colonizza un nuovo ambiente, il suo modo di moltiplicarsi non è costante ma dipende dalle caratteristiche dell'ambiente, dalla temperatura e dal tipo di microrganismo.

Riportando su un grafico cartesiano **Figura 9** in ascissa il tempo ed in ordinata il numero di cellule vitali, si ottiene la curva di crescita batterica, che ci dà un'indicazione dell'andamento della crescita in una popolazione batterica [16]. La curva può essere divisa in quattro parti, ognuna delle quali corrisponde alle fasi di seguito elencate:

- **fase di latenza** rappresenta il periodo di tempo impiegato dal microrganismo ad adattarsi all'ambiente.
- **fase di crescita esponenziale** rappresenta la fase in cui il microrganismo si moltiplica rapidamente. È possibile mantenere le colture in questa fase, effettuando una coltura continua, ovvero, trasferendo i batteri in nuovi terreni;
- **fase stazionaria** rappresenta la fase in cui il microrganismo arresta la sua crescita e nella quale si ottiene l'equilibrio tra i batteri che si dividono e quelli che muoiono;
- **fase di morte** rappresenta la fase in cui il numero di microrganismi comincia a diminuire, in quanto le cellule morte iniziano a superare quelle in divisione o in latenza. La pendenza della curva è diversa se si contano le cellule vive oppure corpi cellulari, infatti nella **Figura 9**, la pendenza di questa fase è minore rispetto alla pendenza della fase di crescita.

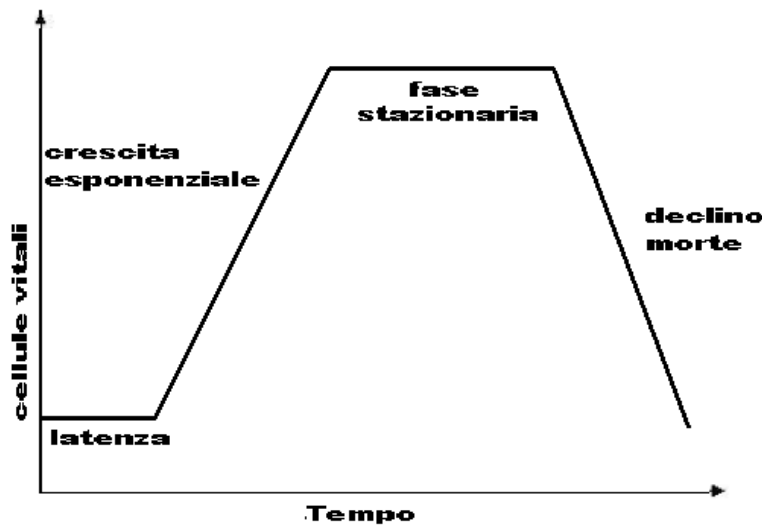


Figura 9. Fasi di crescita microorganismo

Altre condizioni strettamente legate ai meccanismi di produzione e alla diffusione delle tossine batteriche (da parte dei batteri nell'ospite) sono la patogenicità del batterio e le condizioni ambientali favorevoli. La patogenicità dipende dalla capacità di moltiplicarsi e di produrre tossine, per essa sono stati esaminati i sistemi per distruggere i batteri e non per bloccare e/o arrestare lo sviluppo come avviene ad es. una terapia antibiotica. A riguardo, il rispetto delle norme igieniche e di legge contribuiscono a garantire l'atossicità degli alimenti e degli oggetti. Ad es. per eliminare dal latte i batteri patogeni, prima della

commercializzazione viene sottoposto a pastorizzazione, così come gli strumenti medici vengono sterilizzati prima dell'uso. I modelli e le leggi di inattivazione considerati sono descritti nel report dell'università [25]. L'effetto della crescita dei microrganismi si riscontra nell'aumento dimensionale della cellula batterica e/o aumento della popolazione batterica nel caso in cui l'organismo si divide in due cellule. Il meccanismo di riproduzione, detto scissione, rappresenta la modalità per cui una cellula batterica si divide in due cellule figlie, identiche alla cellula madre. Le modalità di riproduzione dei microrganismi dipendono dalla tipologia, si parla di scissione apicale per i funghi, di gemmazione per i lieviti o di scissione binaria per i batteri. Nelle [Figura 10](#), [Figura 11](#), [Figura 12](#), [Figura 13](#) sono rappresentate la crescita microbica dei microrganismi appena citati.

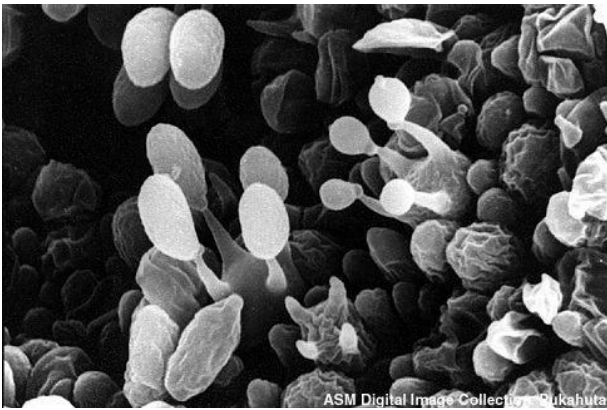


Figura 10. Riproduzione Basidiomiceti

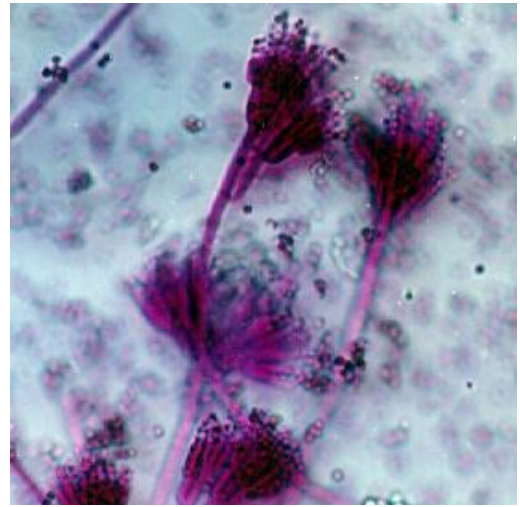


Figura 11. Riproduzione Penicillium

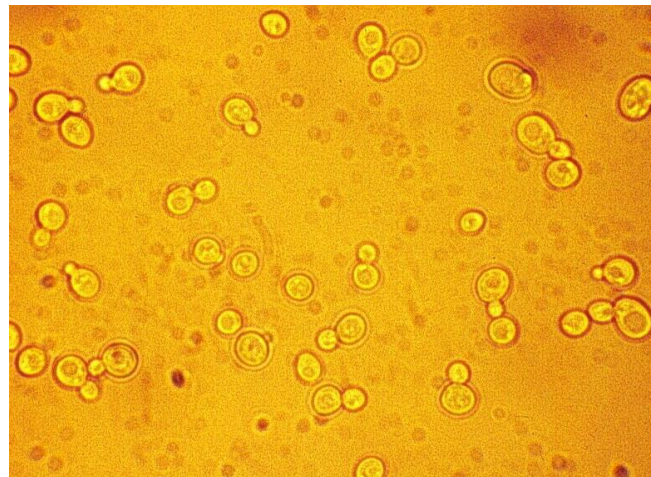


Figura 12. Gemmazione –Lieviti

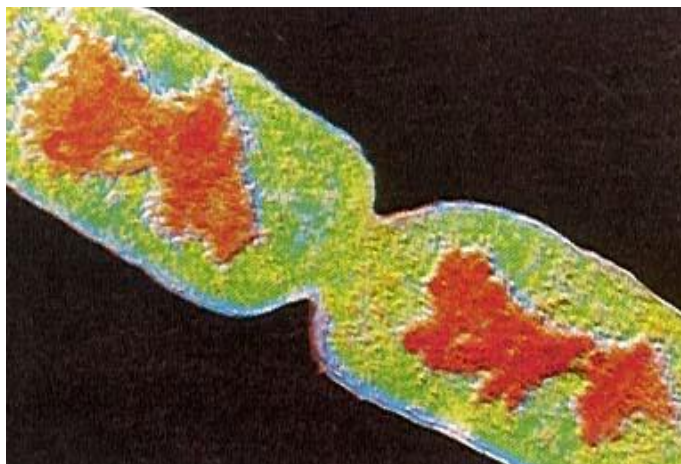


Figura 13. Scissione binaria – E.coli
(in verde–citoplasma, in rosso–nucleoide)

Blocco B – Specificità dei trattamenti di inattivazione microbica e degli alimenti

2.2 Trattamenti di pastorizzazione a confronto

Il risultato del processo di inattivazione della carica batterica dipende dalle caratteristiche intrinseche degli alimenti. Di fatto, sono queste che individuano il tipo di trattamento più idoneo e adatto all'alimento a cui sarà destinato. Per valutare quindi sia la fattibilità tecnica e sia l'efficienza del trattamento, occorre individuare e definire i parametri di processo e le caratteristiche di funzionamento dei singoli trattamenti.

In questa trattazione, verranno analizzati i trattamenti termici di pastorizzazione [17], [18] [19] con i quali verrà effettuato il confronto, essendo il meccanismo di inattivazione mediante PEF definito un processo di pastorizzazione a "freddo". L'obiettivo comune tra la pastorizzazione a freddo e quella termica è rappresentato e viene realizzato, nel primo caso grazie all'interazione degli impulsi elettrici con la materia da cui si ottiene la rottura della membrana cellulare degli alimenti, come ad es. nelle cellule microbiche vegetative, mentre nel secondo viene realizzato al raggiungimento di temperature ben definite e adatte al tipo di microrganismo da abbattere. La differenza fondamentale tra i due tipi di trattamento risiede nel fatto che i campi elettrici pulsati consentirebbero di distruggere i microrganismi patogeni presenti negli alimenti, senza causare cambiamenti delle loro proprietà nutrizionali ed organolettiche che potrebbero essere compromesse impiegando la pastorizzazione termica.

La tecnologia PEF è considerata un processo di pastorizzazione non termico, che soddisfa il concetto di "minimo trattamento tecnologico", ovvero, soddisfa la richiesta da parte del consumatore di alimenti salutari e "freschi" non contenenti additivi chimici.

Dall'analisi degli studi su trattamenti mediante i PEF è emerso che i punti di forza sono principalmente:

- la stabilizzazione di alimenti liquidi con conseguente mantenimento degli attributi di qualità;
- efficace inattivazione di molti microrganismi, in particolare, i lieviti ma anche batteri gram positivi e gram negativi, mentre, le spore batteriche risultano più resistenti.

Mentre, le criticità emerse che, saranno valutate ed esaminate nelle future attività, sono direttamente correlate all'efficienza energetica globale del sistema.

In particolare, occorrerà effettuare delle valutazioni:

- sull'inattivazione degli enzimi alimentari;
- sulla loro efficacia su alcune forme vegetative di batteri in presenza di ossigeno;

- sulla loro efficacia in processi combinati, ovvero, che considerano l'applicazione integrativa dei PEF come trattamento preliminare di alcuni processi, come ad es. l'essiccamento o la pastorizzazione delle uova, per la quale i PEF non sono in grado di inattivare completamente i batteri della salmonella. Pertanto, è necessario effettuare un successivo trattamento termico a 60°C, per eliminare la totalità della carica batterica.

Si evidenzia che la pastorizzazione non ha lo scopo di uccidere tutti i microrganismi presenti nel cibo, ma di ridurre il numero in modo da impedire lo sviluppo di effetti patogeni. Generalmente il trattamento viene effettuato a una Temperatura < 100°C, distruggendo quasi tutte le forme vegetative, come ad esempio muffe, lieviti, virus e batteri, quali gli agenti del tifo. Diversamente dalla sterilizzazione, che ha come scopo di uccidere tutti i microrganismi presenti negli alimenti, e per questa ragione la differenza principale risiede nella temperatura che si raggiunge nel processo, generalmente risulta > 120°C. Pertanto con la sterilizzazione si riescono ad eliminare anche le forme sporigene.

Si conclude quindi, che la durata del *periodo di conservazione* nel caso dei prodotti pastorizzati è più breve rispetto a quelli sterilizzati. Spesso, per inibire lo sviluppo dei microrganismi residui i prodotti pastorizzati sono sottoposti ad un rapido raffreddamento, ecco, perché sono necessari altri trattamenti di conservazione ad integrazione dello stesso. Per questa ragione ad es. il latte pastorizzato deve essere conservato in frigorifero e consumato entro pochi giorni. Alcuni prodotti, invece, possono essere sottoposti ad altre tecniche di conservazione, come il confezionamento sottovuoto o l'aggiunta di sostanze chimiche.

La pastorizzazione non viene applicata su larga scala a tutti gli alimenti, poiché potrebbe indurre alterazioni degustative e/o di qualità dei prodotti. La pastorizzazione mira a ottenere una completa o quasi disinfezione del prodotto senza alterare le sue caratteristiche chimico fisiche. Tale condizione di "qualità sensoriale" del prodotto pone dei limiti sulla temperatura e sul tempo di esposizione necessari a realizzare la salubrità ed integrità del prodotto.

La pastorizzazione ha il pregio di conservare il gusto dei prodotti, ma comporta anche alcuni svantaggi, come già detto, interrompe solo temporaneamente la crescita dei batteri e può indurre a distanza di tempo lo sviluppo di forme batteriche nocive, nel caso di assenza di proprietà battericide dell'alimento.

A secondo della durata del trattamento e delle temperature raggiunte si distinguono i seguenti tipi di processo:

- *pastorizzazione bassa* utilizzata per vino e birra, latte per produzione di formaggio che viene effettuata a T compresa tra 60°C e 65°C per un tempo di 30 secondi;
- *pastorizzazione alta* applicata al latte ad una T compresa tra 75°C e 85°C per un tempo di 2 o 3 minuti. Attualmente questo processo è stato sostituito quasi completamente dalla pastorizzazione rapida;
- *pastorizzazione rapida* o HTST (High Temperature Short Time) applicata ad alimenti liquidi ad una T compresa tra 75°C e 85°C per un tempo di 15-20 secondi. L'alimento liquido scorre nello spazio sottile compreso tra due parti metalliche riscaldate.

Si evidenzia, che sia la durata del trattamento e sia la temperatura raggiunta nel processo dipendono dal tipo di prodotto e dal suo grado di contaminazione.

2.2.1 Parametri di processo dei trattamenti termici di pastorizzazione

Il metodo di pastorizzazione alimentare classico, si basa unicamente sulla trasmissione del calore per convezione. A tale modalità sono dovute alcune criticità, poiché il calore si propaga per convezione nell'alimento stesso e si diffonde lentamente verso l'interno del prodotto dalle parti maggiormente sottoposte al flusso (cioè quelle più esterne) che risulteranno quindi più sollecitate termicamente. Per avere all'interno del prodotto la temperatura atta ad eliminare gli agenti patogeni, potrebbe essere utile impiegare una fonte esterna di calore "superiore". Tuttavia, l'aumento indiscriminato della temperatura per ottenere l'eliminazione desiderata della carica batterica, causa un riscaldamento eccessivo del prodotto trattato, che verrebbe quindi irreparabilmente deteriorato. Pertanto, si può affermare che potrebbe non essere possibile ottenere una pastorizzazione completa di molti alimenti senza danneggiare il prodotto stesso e/o questo sistema potrebbe non essere applicabile nel caso in cui l'alimento fosse composto da più fasi.

Alcuni studi effettuati su alcune tipologie di frutta, alimenti liquidi e solidi hanno evidenziato quali sono i possibili effetti del trattamento sul prodotto finale e di conseguenza la non consigliata applicabilità. Ad es. il semilavorato di fragola impiegato per produrre lo yogurt, è un alimento sensibile alle escursioni termiche e soprattutto il deterioramento del prodotto dovuto alle $T > 100^{\circ}\text{C}$ causa la perdita di consistenza e delle caratteristiche aromatiche. Tra gli alimenti solidi, per i quali non sono certi gli effetti benefici della pastorizzazione, rientrano i composti finali di alcune farine. Come le focacce, che possono essere costituite da più fasi solide³ senza soluzione di continuità tra loro e proprio la struttura del prodotto impedisce la corretta trasmissione del calore. Anche per alcuni alimenti liquidi non sempre è garantita la buona riuscita della pastorizzazione, in particolare per quelli che hanno in sospensione parti solide come i brodi, le polpe e alcuni tipi di succhi poiché a causa dell'eterogeneità strutturale il calore viene trasferito prima alla parte liquida e da questa alla parte solida. In pratica, non si raggiunge la temperatura richiesta per eliminare i microrganismi e i batteri della loro componente solida e inoltre accade che la parte liquida giunga a surriscaldarsi. Il processo richiede molto tempo ed è inevitabile quindi che il surriscaldamento non causi in alcuni casi addirittura l'evaporazione.

La pastorizzazione tradizionale basata unicamente sul trasferimento di calore dall'esterno è limitata solo ad alimenti in forma liquida come il latte, la birra e prodotti similari, per i quali il trattamento è efficace.

Nel corso del tempo sono stati studiati dei sistemi di pastorizzazione endogeni, nei quali cioè il calore viene generato direttamente all'interno del prodotto, dei quali il più conosciuto è il riscaldamento ohmico. Negli ultimi anni sono stati condotti degli studi sulla tecnologia del riscaldamento a radiofrequenza al fine di migliorare i processi termici di pastorizzazione tradizionali.

2.3 Trattamenti termico di riscaldamento resistivo (ohmico)

La pastorizzazione mediante il riscaldamento ohmico si basa sulla propagazione del calore, all'interno del prodotto, effettuata mediante una corrente elettrica alternata. Il calore si manifesta per effetto Joule ad opera della dissipazione potenza elettrica. Il prodotto da sanificare è contenuto nello spazio compreso tra due elettrodi, ai quali viene applicata ai loro estremi una tensione alternata [19].

La rapidità di riscaldamento dipende dall'intensità del campo elettrico, dalla conducibilità e dalla composizione chimica del prodotto. Generalmente, per cambiare e/o regolare la forza del campo elettrico si varia la distanza tra gli elettrodi. Questo trattamento termico di tipo resistivo viene utilizzato per trattare cibi acidi ($\text{pH} < 4.5$). Precisamente, innalzando la temperatura dell'alimento fino a $90 - 95^{\circ}\text{C}$ per $30 - 90$ secondi, si riescono ad eliminare la maggior parte dei batteri e dei microrganismi nocivi. I parametri di

³ grasse e glucidiche

processo, che caratterizzano questo trattamento termico, sono rappresentati dalle caratteristiche intrinseche degli alimenti come la conducibilità elettrica e il calore specifico.

La conducibilità elettrica è una misura della facilità con la quale la struttura interna dell'alimento si lascia attraversare da una corrente. In pratica, nel caso del riscaldamento ohmico essa rappresenta una misura delle specie ioniche contenute nell'alimento. In virtù di detta definizione, l'elemento ionico più diffuso negli alimenti è il sale (NaCl). Più alta è la quantità di sale che è disciolta nel materiale, più alta è la sua conducibilità. La capacità termica è una misura della quantità di calore necessaria per aumentare di 1 °C la temperatura di un'unità di massa (generalmente un grammo o un chilogrammo) del materiale.

Rispetto al sistema convenzionale il riscaldamento ohmico permette di ottenere un'azione riscaldante volumetrica e non superficiale, in tempi molto ridotti.

In teoria si può pastorizzare qualunque alimento: gli alimenti in forma solida devono essere opportunamente trattati in modo da poter essere finemente suddivise e dispersi in un altro materiale (di solito un liquido) ottenendo così una sospensione.

Però l'efficacia del trattamento dipende soprattutto dalle caratteristiche dell'alimenti, più precisamente dalla loro conduttività, in base alla quale, si distinguono in:

- 1) buoni conduttori come le uova e i succhi di frutta;
- 2) medi conduttori ad esempio le marmellate e la margarina;
- 3) cattivi conduttori come i surgelati e i grassi.

Minore è la conducibilità dell'alimento e maggiore è il tempo a cui deve essere sottoposto al trattamento termico.

Gli alimenti più difficili da riscaldare sono quelli che al loro interno hanno una maggiore quantità di lipidi . In particolare se i lipidi sono concentrati in zone estremamente conduttive, le linee di corrente possono trovare percorsi alternativi per richiudersi, non passando mai attraverso di essi. In pratica, la composizione chimica dell'alimento è tale creare al suo interno delle zone più conduttive, che di conseguenza si riscaldano più rapidamente e delle zone meno conduttive o addirittura isolanti, che impiegheranno molto tempo per riscaldarsi; si parla del fenomeno "il problema della sovratemperatura localizzate".

In questo caso, è difficoltoso realizzare la pastorizzazione poiché per fare in modo che tutto il prodotto raggiunga la temperatura desiderata, si dovrebbe aumentare il tempo di trattamento, ciò si contrappone all'esigenza di ridurlo al fine di evitare delle bruciature superficiali o danneggiamenti delle zone più conduttive, che ovviamente si riscaldano prima.

2.4 Caratteristiche chimico - fisiche degli alimenti

Dalla precedente analisi risulta quanto sia rilevante l'azione dei microrganismi, nella loro complessa varietà, nel mantenimento ma anche nella alterazione degli alimenti in generale. La problematica si complica ulteriormente quando si tratta di latte, succhi di frutta , vino ed altro . Sono tutti alimenti di origine naturale che però devono essere elaborati per essere utilizzati e/o essere conservati . I processi di elaborazione o conservazione sono quasi sempre gestiti da dinamiche batteriche che si generano e/o si sviluppano durante le varie fasi. Pasteur se ne era occupato per quanto riguardava il latte ed il vino tant'è che i processi di mantenimento nel tempo di questi si chiamano Pastorizzazione. Nel tempo il bisogno di pastorizzare si è reso necessario per altri alimenti ed ha assunto particolare rilevanza nel caso di vini. Questo ,anche, perché per produrre un buon vino e mantenerlo inalterato nel tempo bisogna raggiungere un accordo con i microrganismi (batteri e lieviti, ma anche muffe) che sovrintendono alla fase di fermentazione dai mosti e, poi, a quella della conservazione dei vini. Le organizzazioni interessate (

produttori e studiosi di vino) hanno prodotto delle ipotesi di classificazione dei batteri in base al ruolo da essi espletato nei diversi processi .

Dalla lettura [20] di settore è emersa una suddivisione in due grandi gruppi:

- 1) batteri della Fermentazione Malolattica , sostanzialmente i LAB (Lactic Acid Bacteria);
- 2) batteri di alterazione come i batteri acetici che metabolizzano l'alcol etilico in acido acetico .

Fermo restando che la fase di fermentazione malolattica deve svolgersi in presenza di LAB ,sono necessarie condizioni al contorno che sono abbastanza importanti come si evince dalla tabella 2 dello stesso lavoro , cioè pH compreso tra 3.1 e 3.4; alcol tra 13% e 15% ; SO₂ totale tra 30 e 50 e temperatura compresa tra 14 e 26 gradi. Mentre in tabella 3 sono elencate le alterazioni dei vini e i batteri corrispondentemente responsabili spesso immessi nel volume del liquido trattato durante i processi di ottenimento dei mosti e dagli inquinamenti ambientali.

Gli enologi considerano gli attacchi all'integrità dei vini come malattie e le distinguono tra :

malattie che si manifestano in presenza di ossigeno :

Fioretta, causata da lieviti come la candida vini ed altri che, in presenza di ossigeno lo alterano trasformando l'alcol in etanale acqua e anidride carbonica. La scomparsa della malattia si ottiene mediante la solfitazione.

Spunto acetico viene prodotta un'ossidazione dell'alcol in acido acetico. Questa trasformazione è indicata come fermentazione acetica e viene operata da batteri acetici . Analogamente alla Fioretta, la scomparsa della malattia si ottiene mediante un'energica solfitazione.

In assenza di ossigeno si generano :

Girato, causato da batteri (lactobacillus plantarum e brevis) che attaccano l'acido tartarico producendo acido acetico e succinico, la scomparsa del Girato si ottiene con la solfitazione.

Amaro, causata da batteri lattici oltre a Mannite e Filante o Grassume . Anche per queste si usano imponenti dosaggi di solfiti.

Si nota quanto siano chiamati in causa i solfiti che invece , per altri motivi fanno male alla salute degli umani. Questo fatto ha stimolato l'interesse di ricercatori ed organizzazioni enologiche verso ipotesi di pastorizzazioni non chimiche . In particolare, senza dover ricorrere ai solfiti.

Di questa problematica si occupa anche questo lavoro con l'intento di contribuire alla soluzione del problema.

FASE 2

Nella fase 2 del presente lavoro è stata sviluppata la “ struttura d'insieme “ dei componenti strumentali idonei sia all' esecuzione “efficiente” del trattamento e sia alla buona riuscita dell'inattivazione microbica.

Altro aspetto importante, da analizzare per le future attività sperimentali, riguarda la riproduzione dei meccanismi di crescita dei batteri in ambito artificiale. Per tale ragione, preliminarmente verrà definita la modalità di coltura dei batteri, per la loro sopravvivenza in laboratorio.

In base all'indagine svolta, la scelta della strumentazione e delle condizioni operative di processo, per lo sviluppo dello schema d'impianto può schematizzarsi, in base alla sequenza di esecuzione, nelle presenti attività di sviluppo:

1. conteggio “ della popolazione batterica”;
2. attività primaria che riguarda la modalità di generare gli impulsi ed applicazione degli stessi;
3. verifica e controllo dell'inattivazione microbica mediante la valutazione della popolazione sopravvissuta al trattamento.

3 Trattamenti di inattivazione microbica mediante PEF

La tecnica dei PEF consiste nell' applicare un campo elettrico E di determinata intensità al materiale da trattare [21], [22]. Il lavoro illustrato, ha riguardato l'indagine a partire dalle caratteristiche chimico – fisiche del complesso microorganismo – alimento per diverse specie e tipologie. Detta analisi è stata prioritaria, al fine di individuare e determinare le correlazioni parametriche tra le leggi fisiche dell'elettricità e la natura del fenomeno di inattivazione. Preliminarmente è stata effettuata una clusterizzazione degli alimenti in funzione della resistività elettrica, parametro che determina la potenza necessaria W per l'inattivazione microbica del volume di alimento da trattare.

3.1 Dipendenza dai parametri di processo e di prodotto

L'efficacia dipende dall'intensità del campo elettrico, dalla durata dell'impulso (tempo di trattamento), dalla forma dell'onda degli impulsi, dalla grandezza e dalla forma dei microrganismi, dalla conduttività, dal pH e dalla forza ionica dell'alimento. L'impianto è costituito da un generatore di impulsi ad alta tensione in corrente continua ed una camera di trattamento dove scorre il prodotto. In pratica, la tecnica PEF consiste nell'applicare una tensione V al " campione da trattare" compresso tra due elettrodi di superficie A posti ad una distanza d ; si genera quindi, un campo elettrico di intensità (Volt/d) nel volume di campione (Ad) che verrà attraversato dalla corrente (EA/ρ) da cui la potenza richiesta ($E \times Ad/\rho$). I parametri da valutare e controllare per ottimizzare i risultati nelle applicazioni di inattivazione con questa tecnologia riguardano sia quelli caratteristici del processo quali l'intensità del campo elettrico (kV/cm), numero e durata degli impulsi, forma degli impulsi, temperatura iniziale e sia del prodotto quali la composizione, forza ionica, attività dell'acqua libera, conduttività.

Le prime ricerche riguardanti l'impiego dei PEF erano basate su applicazioni ad alimenti liquidi di *impulsi di tensione*. Questi applicati alle cellule, sono in grado solo di permeabilizzare la membrana cellulare esterna.

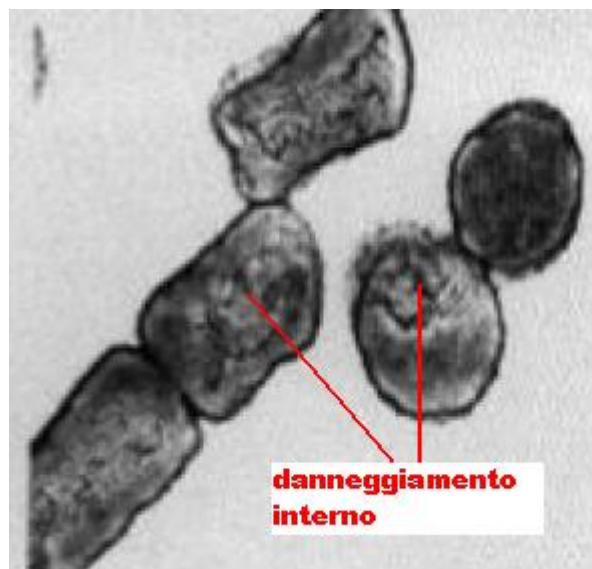


Figura 14. Danneggiamento interno cellula per l'elettroporazione

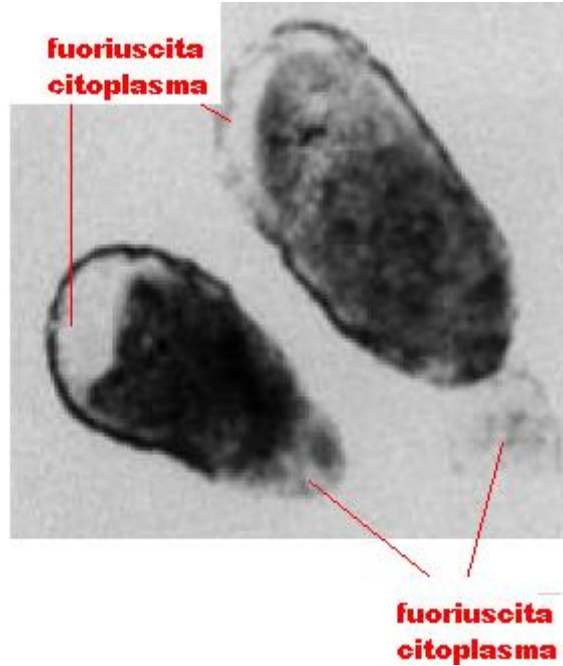


Figura 15. Effetto dell'elettroporazione sulla cellula

Le *impulsi elettrici* possono essere quadre, a decadimento esponenziale, bipolari e oscillanti; le prime sono più letali delle seconde.

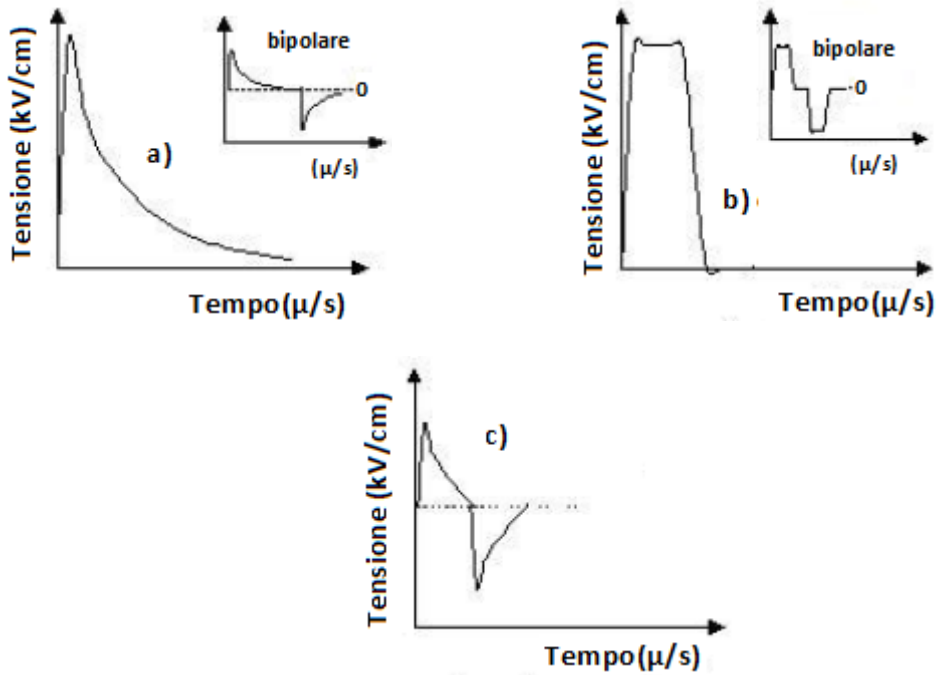


Figura 16. Forma d'onda impulsi elettrici (a) esponenziale, b)quadra, c) oscillante)

I segnali di tipo esponenziale sono i più facili da generare e quelli più facilmente applicabili a un vasto range di alimenti (succhi di arancia, latte, uova liquide) [23][24]. Le onde quadrate sono più efficienti da un punto di vista energetico ma richiedono circuiti più complessi. Al fine di valutare gli effetti dei PEF

sull'inattivazione microbica e correlare i parametri teorici con quelli fisici caratteristici dei microrganismi sono stati analizzati i modelli matematici di *Hülsheger* and *Niemann*, di *Bigelow*, di *Peleg* e di *Weibull* [25]

3.2 Descrizione dei parametri e variabili di processo

L'analisi puramente qualitativa delle differenti tipologie microbiche è necessaria per definire i parametri di controllo per l'applicazione del trattamento mediante PEF.

Il trattamento PEF risulta tra le tecnologie più promettenti per conservare le proprietà organolettiche e nutrizionali degli alimenti. Sono stati riscontrati buoni risultati per i microrganismi presenti in alimenti liquidi caratterizzati da una bassa conducibilità, senza provocare l'innalzamento della temperatura.

Nella Tabella 11 si riportano i risultati ottenuti dal confronto di numerose ricerche sperimentali. Per ogni tipologia di microrganismo sono riportati l'effetto sull'inattivazione, in termini di riduzione logaritmica $\log(S)^4$, la durata del trattamento e i corrispondenti campo elettrico applicato e numero di impulsi [25].

Tabella 11. Intensità di campo elettrico, tempo di trattamento per microrganismi

Categoria di appartenenza	Microorganismo	Riduzione Logaritmica	Campo elettrico [kV/cm]	Numero impulsi	Tempo di trattamento [ms]
LIEVITO	Saccharomyces_cerevisiae	1,3÷7	5,4÷50	2÷175	0,01÷28
	Candida albicans	4,5	20	30	1,08
	Brettanomycesbruxellensis	3,5	20	400	4
Gram -	Escherichia Coli	3,5÷6	20÷32	30÷180	1,08÷0,03
	KlebsiellaPneumoniae	3	20	30	1,08
	Pseudomonasaeruginosa	3,5	20	30	1,08
	Pseudomonasfluorescens	2,7÷6	25÷50	20	0,04
	Salmonella serovardublin	4	35	164	0,16
	Salmonella typhimurium	5÷5,9	83÷90	20÷50	0,02÷0,10
	Salmonella Dublin	4	36,7	40	1,44
Gram +	Bacillus subtilis	4÷5,5	16÷33	13÷50	0,06÷12,50
	Lactobacillusdelbrueckii	4,5	16	40	10
	Listeria(innocua,monocytogenes,brevis)	0,2÷9	20÷50	6÷400	0,01÷9,20
	Oenococcusoeni CRBO (9303, 9304)	1÷4	20	400	4
	Pediococcusparvulus	1	20	400	4
	Staphilococcus aureus	1÷5	16÷60	10÷600	0,40÷15

Dalla tabella emerge, che la maggior parte dei microrganismi dei lieviti, gram- e gram + vengono inattivati applicando un campo elettrico mediamente intorno a 35 kV/cm per un tempo di trattamento medio minore di 6 ms.

⁴logaritmo del rapporto tra la concentrazione dell'agente microbico al termine del trattamento e la sua concentrazione iniziale.

Parametri di processo per alcuni tipi di microrganismi

Il risultato del processo di inattivazione mediante PEF è fortemente correlato alle caratteristiche chimico – fisiche del complesso microrganismo - alimento (pH, contenuto di acqua e temperatura) [26] [27].

In particolare, per meglio comprendere il legame tra detti parametri sono state analizzati i risultati di alcune applicazioni condotte su alcuni microrganismi. Al fine di organizzare le esperienze future, si riportano i risultati di alcune applicazioni PEF, dalle quali sono state dedotte le dipendenze tra alcuni parametri caratteristici [28],[29],[30].

In alcune delle esperienze esaminate risulta che:

1. le cellule *monocytogenis* sono più sensibili ai PEF quando crescono a temperatura di 4 ° C, piuttosto che a 37° C e, in condizioni di acidità; sono più resistenti invece a bassi valori di A_w e quando si trovano nella fase di crescita stazionaria piuttosto che in quella logaritmica;
2. applicando un campo elettrico E compreso [30 ÷ 50] [kV/cm] a 50 °C si è ottenuta per *E. Coli* , *L. innocua* una riduzione sino a 5 unità logaritmiche, mentre, applicando alla stessa temperatura il valore max del range (50kV/cm) per le acospore di *S. Cerevisiasiae* si è ottenuta una riduzione di 2,5 unità logaritmiche al massimo (l'applicazione è stata effettuata sul succo d'arancia);
3. in un' altra applicazione effettuata su succo d'arancia fresco impiegando un campo elettrico di (80 kV/cm), 20 impulsi, pH 3,5 e con l'aggiunta di Nisina⁵ e Liozima⁶ , è stata ottenuta una riduzione del valore della conta aerobia in piastra di 6 cicli logaritmici.
4. in un altro studio effettuato, sempre sul succo d'arancia, applicando un E di 90 [kV/cm, 50 impulsi a 55 °C si è ottenuta una riduzione di 5,9 unità logaritmiche di *S. Typhimurium*;
5. se all'applicazione del p.to 4 si aggiunge nisina e liozima si ottiene un'ulteriore un'ulteriore riduzione di 1,37 unità logaritmiche.
6. applicando un E di 80 kV/cm , 30 impulsi a 42 ° C è stata ottenuta una riduzione di 5,35 unità logaritmiche di *E. Coli O157:H7*. Effettuando l'applicazione per un minor tempo (soli 10 impulsi) alle stesse condizioni di temperatura (42 °C) ma aumentando l'intensità di E a 90 kV/cm è stata ottenuta a una riduzione di 5,91 unità logaritmiche di *E. Coli O157:H7*. Infine, si evidenzia, come quest'ultima applicazione svolta nelle medesime condizioni con l'aggiunta di cannella in polvere (2%) o nisina (2,5%) porta ad una riduzione di 6-8 unità logaritmiche. L'esperienza è stata condotta su sidro di mela;
7. utilizzando latte scremato crudo, il valore di APC è stato ridotto di 7 unità logaritmiche con 80 kV/cm, 50 impulsi a 52 °C e con l'aggiunta di nisina (38UI/ml) e liozima (1638 UI/mL).

Infine, si evidenzia come i risultati del trattamento con PEF sia migliorabile con l'aggiunta di composti stabili quali nisina e liozima.

L'efficacia dell'azione sinergica dei PEF con detti conservanti è confermata da altre applicazioni : ad es. in un mezzo simulante il latte, avente un a_w pari a 0.95, l'applicazione combinata di E di 5 kV/cm con l'aggiunta di 1200 UI/ml di *nisina* ha consentito una riduzione di 5 unità logaritmiche di *E. coli O157:H7*. Infine, in un'altra esperienza effettuata applicando alle cellule vegetative di *Bacillus cereus*, un E di 16,7 kV/cm, 50 impulsi (della durata di 2 microsecondi) si ottiene con l'aggiunta di 0.06 ppm di *nisina* una riduzione di 1,8 unità logaritmiche in più rispetto a quella ottenuta con PEF e *nisina* da soli.

L'impiego più diffuso della *nisina* è quello di additivo alimentare come conservante; essa non viene sintetizzata artificialmente ma è ottenuta partendo da substrati naturali quali il latte. Essendo un composto

⁵ è un [polipeptide policiclico](#) costituita da 34 amminoacidi. È una [batteriocina](#) prodotta da *Lactococcus lactis*.

⁶ è un [enzima](#) presente in tessuti animali dotato di attività battericida.

stabile ad un pH acido (3,5-6,5) viene utilizzato in particolari tipi di formaggio, nello yogurt, in condimenti quali maionese e ketchup oltre che in carne e pesce.

Il *lisozima* viene spesso utilizzato come conservante nell'industria alimentare, agisce su alcuni batteri (**Gram +**) attaccando la parete batterica. Il lisozima è un enzima presente in tessuti animali dotato di attività battericida, che legandosi alla superficie batterica, ne riduce la carica elettrica negativa superficiale, rendendo più facile la fagocitosi del batterio, prima che intervengano le opsonine del sistema immunitario. È abbondantemente presente in numerose secrezioni animali e umane come le lacrime (fanno eccezione quelle dei bovini) e nella saliva. Inoltre, è presente nell'albume d'uovo in concentrazioni anche elevate e nel latte equino (cavalla e asina). A livello quantitativo, i dati disponibili sembrano piuttosto limitati: Hatzipanagiotou et al. (1998), attraverso misure di attività, hanno verificato variazioni quantitative nel corso della lattazione; secondo Greppi et al. (1996) il latte equino contiene maggiori quantità di lisozima (0.99 g/L) rispetto a quello asinino (0.76 g/L); secondo quanto riportato da Solaroli et al. (1993) per il latte di cavalla, la concentrazione presenta ampie variazioni (tra 0,4 e 1 g/L).

3.3 Trattamento PEF – Strumentazione e ingegnerizzazione

Lo studio delle esperienze pregresse, così come appaiono dalla letteratura del settore, suggeriscono che l'impiego della tecnica dei PEF sia efficace per abbattere la popolazione batterica dei succhi di frutta e dei vini. Per questa via si ritiene di potersi fare a meno di interventi termici di pastorizzazione che alterano le proprietà organolettiche di molti alimenti ed anche dell'uso di aggressivi chimici che risultano dannosi per l'organismo umano.

Le ricerche si sono, ovviamente, limitate all'impiego della tecnica su scala di laboratorio trattando pochi decilitri di campione alla volta. Sembra, però, che si possa procedere al passo successivo cioè alla possibilità di impiego oltre che su piccola, anche su più vasta scala. Rimangono ancora molte perplessità nella comprensione dei meccanismi fisici che portano all'eliminazione dei batteri col metodo PEF. Su questi bisognerà indagare al fine, anche, di tranquillizzare su eventuale produzione di sostanze nocive a seguito del processo di abbattimento batterico. Di questo dovranno occuparsi i microbiologi insieme al controllo di tutte le fasi in cui risulta necessario riconoscere i batteri presenti nei vari campioni, contarli prima e dopo ogni trattamento e, se possibile, analizzarne i "resti".

Nella sostanza questa ricerca, partendo dai risultati già ottenuti da altri ricercatori in Italia e all'estero, intenderebbe pervenire ad un improvement delle tecniche di produzione degli impulsi PEF, sia sul piano dell'efficienza che del costo degli impianti.

L'altro aspetto di rilievo, come già accennato, riguarda la strumentazione per produrre gli impulsi PEF e la loro gestione nei dispositivi sperimentali. Nella letteratura scientifica il tentativo di aggredire con PEF le cellule biologiche sembra distinguersi in due grandi settori:

- medico biologico sintetizzabile nella tecnica di elettroporazione;
- batteriologico da impiegare per 'pastorizzare' alimenti liquidi.

Sono finalità molto diverse da raggiungere con tecniche di attacco differenti, anche se fanno riferimento ad una modalità di produzione ed uso degli impulsi elettrici necessari, che è dialetticamente comune e nota col nome di '*scarica capacitiva*'. Però gli impulsi necessari all'impiego nei due casi sono molto differenti fra loro ed hanno in comune solo il nome.

Nell'elettroporazione medica lo scopo da raggiungere è, sostanzialmente, quello di consentire l'accesso allo spazio intracellulare biologico a liquidi medicali esterni. Per farlo, vengono praticati dei canali di dimensione nanometrica (pori) sulle pareti cellulari dai quali i medicinali possono accedere all'interno della cellula ed intervenire sui suoi contenuti. *L'elettroporazione consiste proprio in questo ed utilizza le proprietà elettriche delle cellule per indurre breackdown locali ed aprire canali (pori) nella parete cellulare.* Si parla di elettroporazione irreversibile della membrana cellulare nel caso in cui essa causa la perdita dell'omeostasi cellulare che può portare all'abbattimento globale dei microorganismi indesiderati.

3.3.1 Principio di funzionamento – schema d'impianto PEF

Le variabili e i parametri, dai quali dipende l'inattivazione microbica mediante PEF, sono legati sia alla natura del microorganismo e sia alle caratteristiche elettriche del sistema di abbattimento. Quelli legati strettamente al processamento elettrico sono sostanzialmente: l'ampiezza del campo elettrico, il numero degli impulsi elettrici applicati, la forma d'onda, il tempo di applicazione ovvero la durata del singolo impulso. Mentre, i parametri legati alle caratteristiche dell'alimento sono il pH, il contenuto di acqua e l'insieme delle variabili che definiscono la composizione del microorganismo a seconda della specie.

Tra i risultati dei lavori analizzati emergono delle applicazioni interessanti. Ad es. in campo medico (in ambito oncologico) sono stati ottenuti risultati incoraggianti "irradiando zone di tessuto biologico" con impulsi elettrici di altezza e frequenza suggeriti dalla tipologia dei tessuti interessati alla cura. Dalla letteratura consultata [24] sembra che la condizione utile sia ottenibile con impulsi rettangolari di altezza dell'ordine delle centinaia di volt (700 volt nel lavoro citato) e durata di qualche decina di microsecondi. La tecnica per produrli è stata quella della scarica capacitiva conseguita caricando a voltaggio $V = 700$ Volt un condensatore di capacità piccola (circa 1nF). Durante la scarica di un condensatore la tensione ai suoi capi varia con legge esponenziale decrescente producendo un impulso di tensione a 'decadimento esponenziale'. Se la forma dell'impulso deve essere rettangolare bisogna elaborarlo sottoponendolo al necessario processing elettronico (vedi [24]).

Anche gli impulsi PEF (Pulsed electric field) usati per abbattere i batteri nei liquidi si possono ottenere da tecniche a scarica capacitiva. In questo caso, però, non devono ferire cellule biologiche ovvero forare la pelle, devono 'uccidere' (fare esplodere) batteri. Lo shock elettrico deve essere molto più imponente e più impegnativo dal punto di vista energetico. Sembra, sempre dalla letteratura del settore [1], [22] che gli impulsi utili debbano essere di tensione maggiori di 20 kV in un intervallo fino a circa 40 kV. E che le energie richieste per trasferire energia dal campo elettrico impulsato a quello disruptivo batterico debbano essere dell'ordine di 500 kJ per litro di liquido irradiato. Ora l'energia W è fornita al campo elettrico dalla scarica di un condensatore di capacità adeguata C caricato con una tensione V , in base alla legge $W = CV^2/2$, se il trasferimento di energia dall'uno all'altro avviene con rendimento $\eta = 1$. Nel lavoro citato il condensatore, di capacità $C = 200$ nF ($2 \cdot 10^{-7}$ Farad) era caricato con una differenza di potenziale $V = 20 \cdot 10^3$ Volt. Quindi, ad ogni scarica del condensatore, con $\eta = 1$, si rendevano disponibili 80 Joule di energia trasportata dall'impulso al campo elettrico nel liquido. Pur non emergendo esplicitamente i tempi per il completamento di un ciclo da 500 kJ/litro, è stato calcolato che per mettere insieme 500 kJ ($5 \cdot 10^5$ Joule) erano quindi necessari un numero N di impulsi pari a circa 6000. Assumendo una velocità di produzione (frequenza) degli stessi di $f = 0.5$ impulsi al secondo (cioè un impulso ogni due secondi) che richiederebbe un tempo di applicazione $t^* = 12000$ sec pari a 3,3 h; al quale si aggiunge un'ulteriore dilatazione dei tempi di processo se si considera un'interruzione degli impulsi ogni 50, necessaria per raffreddare il sistema se si tiene conto delle modalità di produzione degli impulsi. In base ai dati dichiarati in questo lavoro e in tutti quelli analizzati [22], come in quello citato di elettroporazione, emergerebbe che il condensatore venisse caricato alla tensione di esercizio e, poi, scaricato sugli elettrodi di campo del sistema (solo così l'energia inviata agli elettrodi poteva avere il valore alto riferito dagli autori). Se fosse vero così, gli autori avrebbero dovuto disporre di un alimentatore con tensione di uscita di almeno 20 kV dc e adeguata corrente. E, in effetti, ne disponevano. Per ogni carica dovevano connettere, con un qualche

dispositivo (interruttore), l'uscita dell'alimentatore (20 KV) con i morsetti del condensatore (0 V) Con queste modalità nell'istante della chiusura dell'interruttore si generano fenomeni (extracorrenti di chiusura) di un certo rilievo che tendono a riscaldare i contatti , spesso con perdita di materia e quindi a ' corroderli '. La stessa cosa accade alla riapertura dell'interruttore , e spesso in maniera ancora più vistosa. Fenomeni analoghi si manifestano anche tra i contatti dell'interruttore che gestisce la scarica del condensatore. Sono di importante rilievo e non meraviglia che gli autori debbano provvedere a raffreddare queste parti. Ed anche spesso.

Di contro , nella scala di laboratorio l'idea di sottoporre i liquidi da pastorizzare ai PEF sembra funzionare . E' legittimo chiedersi se sia possibile realizzare un metodo pratico che contemperisca la validità dei PEF con il loro impiego pratico su scala sociale ed economica .

In linea di principio l'impiego della scarica capacitiva non presenta grandi difficoltà. E' stato utilizzato diffusamente in numerosissimi casi , principalmente per rendere disponibile , impulsivamente, una grande quantità di energia raccolta in un contenitore, il condensatore, caricato durante un intervallo di tempo molto più lungo. Dal punto di vista concettuale si tratta di caricare il condensatore di capacità C operando in modo da stabilire ,tra le sue armature, una differenza di potenziale V fornita da un apposito generatore di corrente continua.

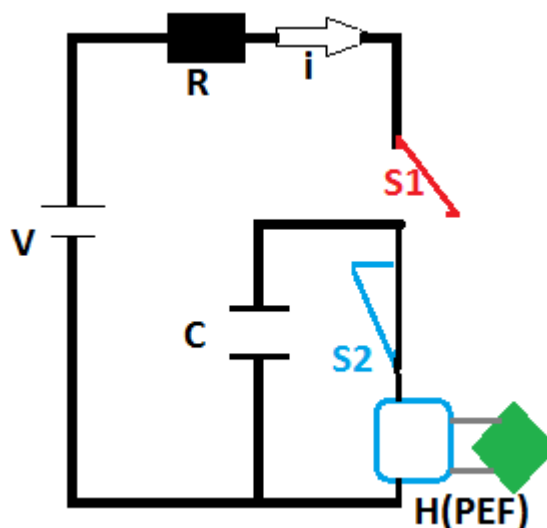


Figura 17. SCHEMA CIRCUITO PEF

Con riferimento alla **Figura 17**, chiudendo l'interruttore S1 e lasciando aperto quello S2, la corrente i fornita dal generatore di tensione V attraverso la resistenza R caricherà il condensatore C. Il condensatore per caricarsi e per stabilire sulle sue armature una differenza di potenziale pari alla tensione V dell'alimentatore impiegherà un certo tempo t^* pari , in pratica, a cinque o sei volte τ , essendo la costante di tempo di carica $\tau = RC$, determinata dal prodotto dei valore della resistenza R e del condensatore C. In queste condizioni la tensione alle armature al passare del tempo t, sale con la legge : $V(t) = V(1- e^{-t/\tau})$. Anche la corrente di carica varia nel tempo con la legge : $i(t) = (Ve^{-t/\tau})/R$. Si capisce quindi perché gli autori citati abbiano potuto disporre di frequenze di ripetizione degli impulsi così basse (0.5 sec^{-1}): essendo V dell'ordine di 20 o 30 KV, se R fosse piccola la corrente iniziale di carica dovrebbe essere dell'ordine delle decine di migliaia di ampere. Con la necessità, quindi di un grosso alimentatore; nell'applicazione esaminata veniva usato uno

da 7 mila Ampere. Gli obiettivi futuri saranno rivolti a comprendere, se esiste un'alternativa che consenta di superare il grosso limite dovuto alla notevole differenza di potenziale $V > 20$ KV necessaria alla carica del condensatore. In base ai calcoli e alle valutazioni effettuate, si ritiene sia necessario cambiare l'approccio fin ad oggi utilizzato. Per rendere l'applicazione sostenibile sia energeticamente e sia economicamente, il condensatore C dovrà essere caricato con una ΔV di qualche centinaio di volt dc. (Sembra che si possa e si debba continuare a lavorarci sopra cercando di trovare una risposta alla domanda: ma il condensatore deve essere caricato per forza alla differenza di potenziale $V > 20$ KV. Noi riteniamo che si debba cambiare l'approccio : che C debba essere caricato con V di qualche centinaio di volt dc). Aprendo l'interruttore S1 e chiudendo S2, il condensatore si scaricherà. Ne conseguiranno impulsi della stessa tensione massima che verrebbero poi elaborati dal dispositivo di figura 1 in blu. Questo riceve in ingresso la scarica impulsiva a bassa tensione, la elabora e la rende disponibile per i PEF. L'elettronica moderna consentirebbe di farlo e il gruppo di ricerca del presente lavoro ritiene che siano possibili e ragionevoli le prospettive di successo anche in ambito alimentare analogamente a quanto accade in ambito medico oncologico. Infine, in base alle esperienze condotte, si riporta di seguito una sintesi dei vantaggi e degli svantaggi del trattamento con PEF:

- tecnica di stabilizzazione che non modifica le caratteristiche organolettiche e nutrizionali dell'alimento;
- utilizzata per risanare gli alimenti in superficie;
- aumentando la durata e l'intensità del trattamento i danni indotti sui microrganismi sono irreversibili, pertanto, il processo è adatto per la stabilizzazione degli alimenti;
- i PEF sono applicabili agli alimenti allo stato fluido;
- la durata degli impulsi varia da pochi microsecondi ad alcuni millisecondi;
- uso di membrane conduttrici ioniche ed immersione in soluzioni elettrolitiche;
- durante il trattamento non si verifica nessun aumento significativo di temperatura;
- alterazione della parete cellulare, denaturazione degli enzimi e formazione di pori (elettropori a livello della membrana cellulare);
- l'efficacia del trattamento dipende come più volte detto, dalle caratteristiche degli impulsi, dal substrato (pH, forza ionica e conducibilità elettrica), tipo di microrganismo e caratteristiche delle camere di trattamento;
- applicabile ai succhi di mela, latte e zuppa di piselli;
- riduzione di calcio, potassio e magnesio;
- non disattiva le spore e richiede successivo trattamento di refrigerazione.

4 Schema impianto pilota





4.1 Caratteristiche dei componenti (lato microrganismo)

Una volta individuate la natura e tipologia dei microrganismi (vedi § 1.2) le fasi sperimentali ipotizzate sono:

- Coltura batterica mediante preparazione del terreno selettivo e non selettivo
- Semina o inoculazione del microorganismo batterico
- Controllo al microscopio della coltura
- Conteggio della popolazione batterica e relativa curva di crescita
- Antibioγραμμα e colorazione di Gram
- Conta della popolazione batterica

Si precisa che una volta che viene definito il microrganismo o meglio la popolazione di microrganismi, per la preparazione dell'ambiente di vita del microrganismo, si ricorre a terreni di coltura che contengono le sostanze nutritive necessarie al metabolismo e alla riproduzione degli stessi.

Le condizioni chimiche e fisiche ambientali che si ritiene debbano essere inizialmente considerati, per la fase sperimentale della crescita dei microrganismi, sono:

-  PH del mezzo di coltura ;
-  temperatura di crescita;
-  tensione di ossigeno;
-  pressione osmotica.

La conoscenza dei meccanismi di sopravvivenza e di azione dei microrganismi è indispensabile ; come ad es. per i batteri, è fondamentale per poter isolare in laboratorio il batterio specifico che ha provocato la *degenerazione cellulare* del così detto "ospite", ovvero, l'organismo infetto. Il terreno di coltura può essere liquido oppure solido, preventivamente sterilizzato prima dell'uso, in modo da escludere la presenza di batteri contaminanti. Inoltre, per una completa e ottimale crescita del batterio, il terreno di coltura deve essere perfettamente pulito. Per una capillare classificazione delle tipologie di batteri e terreni di coltura si rimanda al Report dell'università di Torvergata [25].

Ad es. per la coltura batterica dell' *Escherichia coli*, si riporta di seguito sinteticamente quali sono gli elementi per la preparazione del mezzo :

- Terreno Mackonkey che rappresenta il terreno selettivo per *Escherichia coli*
- brodo di lattosio che rappresenta il terreno non selettivo per i *Lactobacilli*
- NaCl
- lievito comune
- acqua distillata

La fase successiva alla coltura batterica, riguarda l'identificazione delle specie. Le metodologie che possono essere usate sono il riconoscimento a microscopio ottico o elettronico, analisi del DNA, la colorazione di Gram, analisi della morfologia della colonia, mobilità, capacità a produrre spore, acido-resistenza e fabbisogno di ossigeno.

Come precedentemente detto , la colorazione di Gram si basa sulla distinzione delle caratteristiche della parete batterica:

- una struttura con più peptidoglicani si colora e il batterio è Gram-positivo;
- una minor presenza di peptidoglicani contraddistingue i batteri Gram-negativi.

Altro aspetto da tenere in considerazione riguarda la condizione vitale. I batteri si possono trovare, sotto forma di spore, in forma di vita latente, molto resistente a condizioni estreme. Si evidenzia che i batteri sporigeni sono specie che, trovandosi in scarsità di nutrimento o in un habitat a loro ostile, producono delle spore, ossia delle cellule resistenti agli agenti esterni; il più delle volte sono dei bacilli Gram-positivi e clostridi.

4.2 Conta della popolazione

La conta della popolazione batterica sopravvissuta al trattamento PEF permette sia di definire l'efficienza del processo e sia di individuare i parametri da variare per ottimizzare il risultato.

Al fine di comprendere le interdipendenze tra le caratteristiche peculiari del microrganismo, l'intensità del campo elettrico e la durata del trattamento sono stati valutati i risultati di interessanti applicazioni scientifiche [4]. Si ritiene che possano essere considerate delle traiettorie di riferimento per le sperimentazioni future.

Nelle **Figura 18 e Figura 19** sono diagrammati i risultati della popolazione microbica sopravvissuta S , applicando un'intensità di E compresa tra $[15 \div 80]$ (kV/cm), dopo il trattamento PEF []. Precisamente, nella **Figura 18** è riportato l'andamento di S in funzione dell'intensità del campo elettrico applicato misurata, si presume, a parità di tempo e quindi di numero di impulsi applicati. Nella **Figura 19**, invece, è riportato l'andamento di S in funzione del tempo (Lnt) a parità di intensità del campo elettrico applicato.

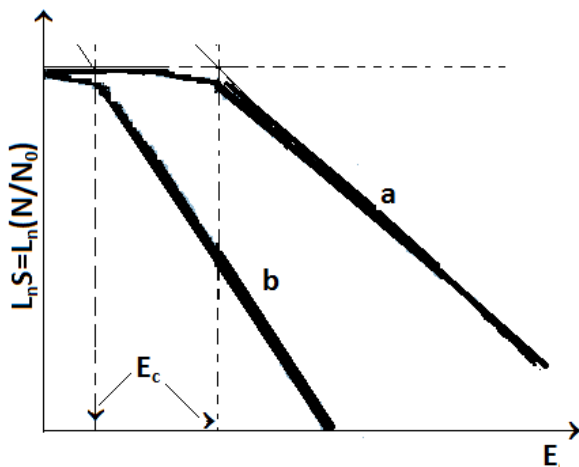


Figura 18. Effetto dell'elettroporazione sulla cellula

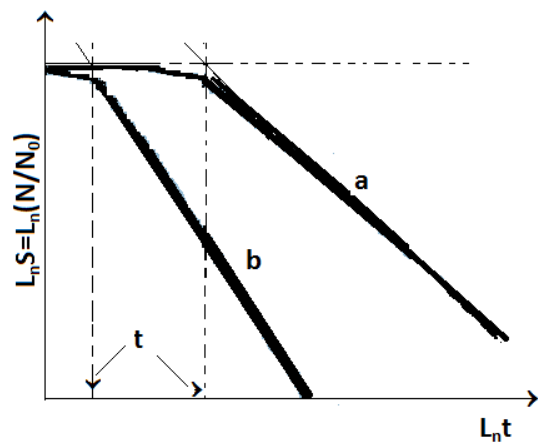


Figura 19. Effetto dell'elettroporazione sulla cellula

Le curve a e b si riferiscono a due diversi batteri (non citati) e mostrano efficacemente le differenti tipologie di resistenza agli agenti esterni. I batteri di tipo b appaiono più deboli e vengono abbattuti già a campi applicati più modesti. Si noti che , al valore E_c della curva a, dove ancora sopravvivono tutti i batteri di tipo a, quelli di tipo b sono stati abbondantemente abbattuti. Lo stesso dalla figura 19 da dove si nota che, presumibilmente a parità di impulsi elettrici applicati , cioè stessa altezza e stessa energia per ogni impulso, la popolazione batterica di tipo b sia fortemente ridotta mentre la popolazione di a è ancora integra.

Infine [4] si riportano, nella figura 20, gli andamenti dell'energia specifica richiesta, per 10 tipologie di microrganismi, in funzione dell'intensità del campo elettrico, i quali andamenti sono individuati dalla seguente corrispondenza numerica:

1. *B. subtilis, vegetative cells;*
2. *Lb. Brevis*
3. *Lb. Plantarum*
4. *L. monocytopogenes*
5. *E. coli*
6. *E. coli (cont.)*
7. *S. senftenberg*
8. *Y. enterocolytica*

9. *S. cerevisiae*
10. Potato tissue cells

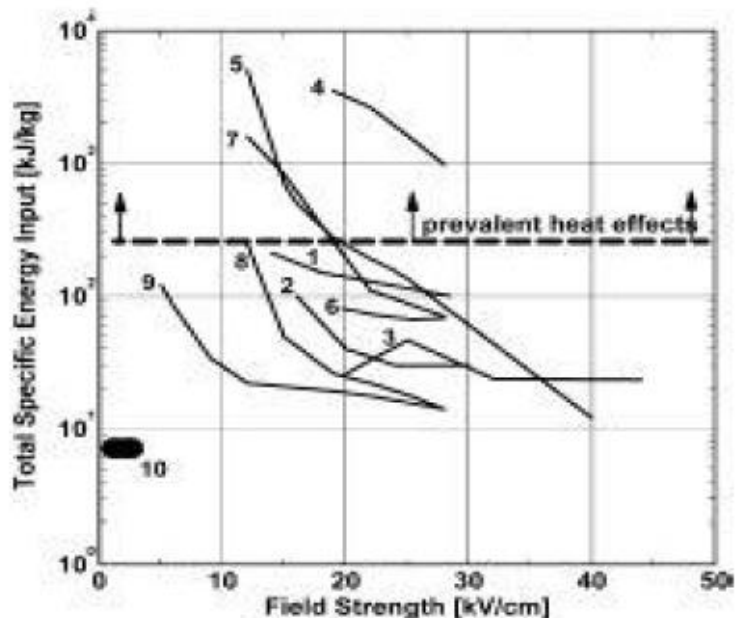


Figura 20. Energia specifica di inattivazione

Dall'analisi delle curve di **Figura 20** emerge:

Curva 9 con campo E compreso [5-28] (kV/cm) in pratica per basse $E < 12$ (kV/cm) è necessario applicare un numero di impulsi crescente, mentre per $E > 12$ (kV/cm) la curva è quasi orizzontale e quindi risulta quasi indipendente dal numero di impulsi ma la tensione è crescente. Il batterio 9 presenta una curva che mostra che per una $E > 10$ (kV/cm) si verifica che l'energia in input è quasi costante varia poco con E . Questo significa che sia possibile per $E > 10$ qualsiasi il microorganismo è molto sensibile, per cui se aumento la E tipo a 20 kV/cm il tempo si riduce proporzionalmente con il suo quadrato.

Curva 8 con campo E compreso [12-28] (kV/cm)

Per $E < 15$ bisogna applicare un numero di impulsi crescenti (la curva è quasi verticale vuol dire che risulta una bassa tensione ma molti impulsi) significa che si ottiene lo stesso risultato applicando $E < 15$ con impulsi ripetuti più volte. Per $E [15-20]$ (kV/cm) si possono applicare bassi $E < 20$, però ripetuti più volte, oppure aumentare di poco E a circa 28 e mantenere costante il numero di impulsi. In sintesi per valori di $E > 20$ durata del trattamento può ridursi sembra che $E = 20$ (kV/cm).

Curva 5 con campo E compreso [12-28] (kV/cm)

In pratica, per $E < 20$ sono necessari molti impulsi mentre per $E > 20$ è necessario aumentare la tensione invece del numero di impulsi che sembrano ridotti.

Curva 7 con campo E compreso [12-22] (kV/cm) devo applicare molti impulsi la curva è molto ripida. Mentre per E tra 22 e 28 il numero d'impulsi è basso e costante.

4.3 Applicazioni industriali – Vino, latte e succhi di frutta

4.3.1 VINO

4.3.1.1 Tecniche di stabilizzazione dei vini

Stabilizzazione microbica

Durante la conservazione il vino rosso può subire delle alterazioni [30], [31] dovute alla crescita di microrganismi indesiderati quali batteri lattici e lieviti come *Brettanomyces*.

La crescita dei lieviti è favorita dalle condizioni di alto PH, bassa anidride solforosa che in condizioni aerobiche provocano il deterioramento dei serbatoi in legno. Generalmente si effettua la sanificazione dai contaminanti mediante il metabisolfito.

Per quanto riguarda invece i batteri acido lattici quali *Pediococcus* e *Lactobacillus* possono svilupparsi anche dopo la fermentazione malolattica producendo metaboliti che causano odori sgradevoli del vino (come carne e cuoio).

Per la conservazione dei vini rossi, generalmente vengono utilizzate le aggiunte di anidride solforosa che in condizioni aerobiche, se viene somministrata in basse dosi, può causare la crescita di batteri acetici e di lieviti ossidativi. Nei vini conservati con basse dosi di SO₂ e in presenza di ossigeno, non è raro osservare lo sviluppo di batteri acetici e di lieviti ossidativi. Tali formazioni indesiderate possono essere evitate mediante il controllo della temperatura e del tenore di ossigeno. Tuttavia ad oggi, l'inattivazione della crescita microbica viene affrontata e superata, nella maggior parte dei casi, mediante trattamenti fisici o con l'aggiunta di sostanze chimiche per evitare la diffusione della contaminazione.

Stabilizzazione della frazione fenolica

I polifenoli nei vini rossi sono stati estratti durante la macerazione, ammorbiditi e stabilizzati durante l'invecchiamento. Ma una messa a punto finale, alla fine del processo, si può rendere necessaria per ottenere un miglior equilibrio.

Durante la fase di macerazione vengono estratti i polifenoli che verranno stabilizzati nella fase di invecchiamento del vino. La stabilizzazione fenolica può essere eseguita mediante l'eliminazione dei fenoli oppure mediante l'aggiunta di sostanze che impediscano un'eventuale ossidazione e/o precipitazione. La prima si può ottenere utilizzando elementi come la caseina, le proteine vegetali, la gelatina, l'albumina dell'uovo. Per la seconda, generalmente, si utilizzano dei tannini enologici che svolgono una funzione antiossidante, in quanto reagiscono con l'ossigeno proteggendolo da fenomeni di ossidazione.

Spesso vengono impiegati preparati di lievito, che aumentano il contenuto in polisaccaridi, o di polisaccaridi come la gomma arabica che possono ridurre la precipitazione dei colloidali nel vino.

Stabilizzazione tartarica

Nei vini che presentano un contenuto di bitartrato superiore al punto di saturazione, alle basse temperature possono essere caratterizzati da precipitazioni tartariche che si manifestano nel fondo del contenitore come residui.

La stabilità del vino può ottenersi sia eliminando il tartrato e il potassio (in modo che la loro concentrazione sia inferiore al prodotto di solubilità) e sia aggiungendo un coadiuvante che inibisca la

formazione dei cristalli di tartrato. Oppure effettuando il raffreddamento del vino (con tecniche discontinue o continue) e infine l'elettro-dialisi che elimina in parte gli ioni in eccesso.

Fermentazioni vinarie

Durante il processo di trasformazione del mosto d'uva in vino, i lieviti fermentano gli zuccheri dell'uva originando l'etanolo, l'anidride carbonica e diversi metaboliti [30].

Per avere un'idea della complessità del processo biochimico si riporta la citazione di Fleet (1993). Egli sostiene che *“la fermentazione del mosto d'uva e la produzione di vini di qualità costituiscono un complesso interdipendente e unitario di processi biochimici ed ecologici giustificati dalla complessa costituzione chimica dei mosti e dall'intervento simultaneo di microrganismi fisiologicamente, biochimicamente e zimotecnicamente differenti.*

I microrganismi che possono essere presenti sono: lieviti, funghi a micelio, batteri lattici, batteri acetici e perfino dai batteriofagi”. I lieviti sono i principali responsabili della fermentazione del mosto d'uva. Il risultato del processo fermentativo dipendono dalla composizione del mosto, dalla struttura enzimatica dei lieviti e dalle condizioni metaboliche degli stessi. La reazione biochimica principale alla base della conversione del mosto d'uva è la fermentazione alcolica, tuttavia avvengono altre reazioni biochimiche, che costituiscono la durante la fermentazione vinaria e che conferiscono le caratteristiche organolettiche al vino. Per comprendere la vastità delle possibili conversioni del mosto d'uva basti pensare che la sua composizione è ricca: di zuccheri monosaccaridi (come il glucosio e il fruttosio) facilmente fermentescibili, di fosfati, di solfati, di composti del potassio, del magnesio, del calcio e di vitamine idrosolubili, quali la biotina, acido pantotenico, piridossina, tiamina, ecc. Tuttavia, nonostante tali fattori favorevoli, il pH rappresenta il fattore frenante lo sviluppo dei microrganismi. Il mosto d'uva è caratterizzato da valori di pH compresi [3÷3.5] che solo alcuni microrganismi sono in grado di tollerare. In particolare, si precisa che:

- i lieviti (che presentano un PH ottimo compreso tra 4 e 4,5) sono favoriti nello sviluppo dalla composizione del mosto;
- i batteri acetici che, pur avendo ottimo a valori superiori a 3, riescono a tollerare valori di pH di 3; così come i batteri lattici quali *Oenococcus oeni* e alcune specie di *Lactobacillus*;
- le muffe sono influenzate da valori di pH compresi in un range molto ampio.

Si evidenzia infine, che in fase di riempimento dei serbatoi, i lieviti (che possono essere sia aerobi che anaerobi facoltativi) reagiscono con l'ossigeno creando delle condizioni di anaerobiosi tali da impedire la sopravvivenza di quei microrganismi (quali i batteri acetici e le muffe) che sono caratterizzati da un metabolismo ossidativo.

Si può concludere che i lieviti sono i microrganismi metabolicamente facilitati dalle condizioni, appena richiamate anche se, per un tempo limitato, in quanto dopo 24 h dal riempimento del serbatoio, comincia la fermentazione alcolica.

Ritornando alla conversione biochimica del mosto in vino, si sottolinea che nella **fermentazione spontanea**, la conversione dello zucchero dell'uva ad etanolo, a CO₂ ed altri metaboliti avviene mediante i lieviti presenti sull'uva e a quelli provenienti dall'ambiente tecnologico (impiantistica e cantina, a cominciare dalla pigiadiraspatrice fino ai vasi vinari). Le diverse specie di lieviti che si sviluppano durante la fermentazione, il loro numero e le dimensioni di crescita dipendono dall'area di produzione (Amerine e Kunkee, 1968), dalla tecnologia di produzione (Cuinier, 1978) e dal tipo di vino prodotto (Poulard, 1984).

Gli altri microrganismi predominanti sulla superficie dei grappoli d'uva sono *Kloeckera* (es. *Kloeckera apiculata*) ed *Hanseniaspora* (es. *Hanseniaspora uvarum* che rappresentando il 50-75% circa della popolazione blastomicetica totale (Fleet, 1993).

Numericamente meno prevalenti sono la specie di *Candida* (es. *C. stellata* e *C. pulcherrima*), *Brettanomyces* (es. *B. intermedius*, *B. lambicus* e *B. custeri*), *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* (es. la forma sessuata di *C. pulcherrima*), *Pichia* (es. il cosiddetto lievito filmogeno, *P. membranaefaciens*) così come quelle specie che un tempo erano considerate appartenere al genere *Hansenula* (es. *H. anomala*) e il lievito rosa *Rhodotorula* (es. *R. minuta*) (Fleet, 1998).

Infine, il lievito *S. cerevisiae* è abbondantemente presente nel succo d'uva e nel mosto, mentre, è poco presente nelle cellule dell'uva. Ai fini pratici, è importante considerare la sua incidenza nell'ambito della contaminazione delle vasche, apparecchiature e ambienti impiegati in cantina.

Si evidenzia infine, che esistono una molteplicità di ceppi *differenti S. cerevisiae* che dipendono sia dalle condizioni territoriali locali e sia dagli agenti presenti nella fermentazione dei mosti (ad es. i solfiti) che contribuiscono a conferire al prodotto caratteristiche locali di tipizzazione.

Infine, alcune ricerche "Le Jeune et al. (2006)" hanno dimostrato che i *S. cerevisiae* coinvolti nelle fermentazioni spontanee originano sia dal vigneto che dagli ambienti di cantina.

A tal proposito, si precisa che nella fermentazione spontanea del mosto d'uva oltre al contributo di microrganismi presenti in cantina, sono determinanti per l'inizio della fermentazione alcolica gli apiculati, asporigeni e sporigeni, mentre la seconda fase della fermentazione è dovuta ai lieviti ellittici e in particolare quelli appartenenti alla specie *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3.2 LATTE

4.3.2.1 Tecnica alternativa alla pastorizzazione del latte

Un altro alimento che presenta delle caratteristiche adatte per l'applicazione dei PEF è il latte [32].

Fino ad oggi, il trattamento più diffuso utilizzato per l'inattivazione microbica del latte è stato la pastorizzazione. L'obiettivo della ricerca di individuare soluzioni tecnologiche innovative, nasce dall'esigenza di aumentare le garanzie per i consumatori e di ridurre lo spreco di latte nei Paesi in via di sviluppo.

In particolare, il trattamento PEF potrebbe divenire un processo di "eccellenza" tecnologica a sostegno della solidarietà di queste popolazioni aiutandoli ad eliminare gli agenti patogeni che rendono difficile "la conservazione del latte" nei luoghi dove non è disponibile l'energia elettrica, per effettuare trattamenti di pastorizzazione o per effettuare la refrigerazione dopo la pastorizzazione.

In particolare, da numerose pubblicazioni scientifiche la tecnica dei PEF viene proposta come una delle soluzioni tecniche emergenti nel settore dell'industria alimentare, la cui efficacia contro i microrganismi è stata dimostrata come alternativa non termica al processo di pastorizzazione.

In base ai risultati delle ricerche analizzate, il processo di "elettroporazione irreversibile", assicura l'eliminazione dei batteri e impedisce la loro proliferazione garantendo un aumento della durata di conservazione. Questo permetterebbe di abbassare i costi soprattutto per gli agricoltori dei paesi a basso reddito che in base ai dati disponibili, per circa un miliardo e mezzo di persone è necessario dopo la pastorizzazione effettuare la refrigerazione, per prevenire la moltiplicazione dei batteri. Alcuni di essi sono patogeni - come la *Listeria monocytogenes* - poichè sono poco sensibili alle basse temperature e possono proliferare durante il trasporto o lo stoccaggio del latte anche dopo esser stato raffreddato. La refrigerazione "rallenta il metabolismo dei batteri ma il campo elettrico pulsato li uccide.

L'approccio della tecnica dei PEF per il controllo dei microrganismi, durante la conservazione del latte, è totalmente differente da quello utilizzato fino ad oggi nelle tecniche tradizionali. Nel modello illustrato

nella ricerca [del dottor Golberg] è stata considerata una richiesta di energia elettrica per l'alimentatore di sole cinque ore e mezza al giorno, la cui fornitura può essere affidata a fonti di energia solare.

Conclusioni

Si è visto, nel corso di questa analisi delle problematiche inerenti alla conservazione del latte, dei succhi di frutta e dei vini che appare delinearsi la possibilità, che ci appare concreta, di eseguirla con metodi non chimici. In sostanza senza uso di bisolfiti o altri composti similari. Si è visto anche che le tecniche usate fanno male alla salute ma costano poco circa da 3 a 10 grammi di bisolfito ad ettolitro di liquido.

Di contro l'uso dei PEF pretenderebbe un costo energetico di $500\text{KJ/litro} * 100 \text{ litri}$, di energia elettrica; cioè immaginando trasformazioni e processi con resa energetica del 100/100 varrebbero $50 * 10^6 = 50 \text{ MJ}$ che, porterebbero ad un consumo di comprensibilità sociale di $14 \text{ kWh}/100 \text{ litri}$. Al costo di $30 * 10^{-2} \text{ euro/kWh}$. Cioè, trattare 100 litri di vino costerebbe 4.2 euro. Cioè 4.2 centesimi al litro. Superiore al costo dei solfiti, ma non certo proibitivo e con meno problemi per la salute degli utenti. Se poi si considera che gli impianti di stabilizzazione PEF sono gestibili impiegando l'energia solare si valuta che i costi sarebbero molto più bassi.

Una ovvia conclusione di questa relazione è che: da come è stato presentato in letteratura l'uso dei PEF stabilizza latte, succhi di frutta e vini sottraendoli alle alterazioni indotte dai batteri. Allo stato attuale dell'arte l'uso pratico è limitato dalle difficoltà di produrre ed iniettare, in maniera utile e corretta, i necessari impulsi elettrici. Durante lo studio di fattibilità di questa ricerca, gli autori hanno ritenuto di avere individuato percorsi di semplificazione dei processi con importanti ricadute sulla utilizzabilità di questa tecnica di pastorizzazione. Gli sviluppi futuri delle attività di ricerca, dopo una inevitabile fase di *acclimatamento tematico*, procederanno proprio con lo studio di processi alternativi o complementari a quelli già sperimentati da altri autori per la produzione e gestione della tecnologia PEF su una più ampia scala.

Riferimenti bibliografici

1. *Impact of pulsed electric field and high-voltage electrical discharges on red wine microbial stabilization and quality characteristics.* C. Delsart, N.Grimi, N. Boussetta, C. Miot Sertier, R. Ghidossi, E. Vorobirv and Mietton Peuchot
2. *I trattamenti di sanitizzazione del latte.* Zeppa G Università degli Studi di Torino
3. *Nuovi processi per stabilizzare gli alimenti preservandone la qualità".* Prof. Roberto Massini-Università degli Studi di Parma "
4. *Tecnologia 5.* Luciano NETTUNO - ASL Napoli 1 Centro - Servizi Veterinari
5. *I microrganismi .* Enciclopedia Treccani
6. *Inattivazione dei microrganismi.* Antonio Casolari
7. *Manuale di laboratorio di microbiologia degli alimenti* Prof. Francesco Villani
8. *LA CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI-* Marina Mariani
9. *La conservazione degli alimenti* Zanichelli
10. *Lezioni e-learning di microbiologia degli alimenti* Prof. Francesco Villani villani@unina.it
11. *Fattori che controllano lo sviluppo microbico degli alimenti* - <http://www.ceaedizioni.it/pdf/13217anteprima.pdf>

12. Approfondimento "La scala del PH". Zanichelli
13. Crescita e genetica microbica
14. Chimica e certificazione degli alimenti: Il parte. - Dott.ssa Arianna Calistri - Dip. di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche, sez. di Microbiologia e Virologia (Padova).
15. Appunti di microbiologia prof. Antonio Farris
16. Curva di crescita microrganismo -Treccani
17. Corso di fisica Aniello (Daniele) Mennella- Dipartimento di Fisica UniMi
18. TECNOLOGIE EMERGENTI DI SANITIZZAZIONE Prof.ssa Angela Carlucci- Università degli Studi della Basilicata
19. Metodi di inattivazione termica http://tesi.cab.unipd.it/25117/1/TESI_FINALE.pdf
20. Il controllomicrobiologico in vinificazione: i batteri. Fabio Fracchetti, Giovanna Felis, Antonio Del Casale, Sandra Torriani Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona
21. PULSED ELECTRIC FIELDS PROCESSING OF FOODS:AN OVERVIEW. Gustavo v. Barbosa-Canovas and Bilge Altunakar
22. Pulsed electric fields for food microbiological stabilization GIORGIO DONSI - GIOVANNA FERRARI -
23. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice. Part I: Impact on overall quality attributes- R.A.H. Timmermans, H.C. Mastwijk, J.J. Knol, M.C.J. Quataert, L. Vervoort, I. Van der Plancken, M.E. Hendrickx, A.M. Matser
24. Studio e Simulazione di un Generatore di Impulsi per Elettroporazione. Tesi di laurea Laerte SCARPARO - UNIVERSITA' DI PADOVA DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA ELETTRONICA
25. Report PAR 2015 TorVergata
26. Comparative study on shelf life of orange juice processed by high intensity pulsed electric fields or heat treatment Pedro Elez-Mart'inez · Robert C. Soliva-Fortuny · Olga Mart'in-Belloso
27. Pulsed Electric Fields for Food Processing Technology Maged E.A. Mohamed and Ayman H. Amer Eissa
28. Tesi Application of Pulsed Electric Field (PEF) Techniques in Food Processing Francesca De Vito- UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
29. GIANPIERO PATARO Dipartimento di Ingegneria Chimica e Alimentare e Centro Regionale di Competenza sulle Produzioni Agroalimentari - Università di Salerno –
30. I MICRORGANISMI DEL VINO Adriano Sofo - UNIVERSITA' DEGLI STUDI DELLA BASILICATA POTENZA
31. IDENTIFICAZIONE MOLECOLARE DI LIEVITI RICORRENTI NELLA FERMENTAZIONE SPONTANEA DI ALCUNI VINI DELL'ITALIA MERIDIONALE . Dott. ssa Elena Di Maro . Tesi di Dottorato di ricerca in SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI AGRO-ALIMENTARI XIX CICLO UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLIFEDERICO II
32. Campi elettrici pulsati - G.Coppola R.Pierro L.Silvestro