



Ricerca di Sistema elettrico

Campi Elettrici Pulsati - PEF sperimentazioni primarie

Francesca Bonfà, Ilaria Bertini, Anna Salama

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

Francesca Bonfà, Ilaria Bertini, Anna Salama (ENEA)

Settembre 2018

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

Responsabile del Progetto: Ing. Ilaria Bertini, ENEA

Ilaria Bertini

Indice

SOMMARIO.....	4
1 PROVE SPERIMENTALI.....	4
FASE 1	5
1.1 FILTRAZIONE DEL MOSTO D’UVA E DEL VINO.....	5
1.2 ANALISI MICROBIOLOGICA - MOSTO D’UVA E VINO	7
1.2.1 <i>Analisi quantitativa della carica microbica e caratteristiche chimico – fisiche</i>	7
1.2.2 <i>Le caratteristiche chimico-fisiche</i>	12
FASE 2	12
2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER L’INOCULO DEI MICRORGANISMI	12
2.1 LA POPOLAZIONE MICROBICA - COLTURA IN LABORATORIO.....	13
2.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.....	16
2.2.1 <i>Mosto e Vino – preparazione dei microrganismi per l’inoculo</i>	16
FASE 3	16
3 PARAMETRI SPERIMENTALI	17
3.1 TEST DI PROVA.....	17
3.2 APPLICAZIONE DEI PEF.....	19
3.2.1 <i>Prove iniziali per il vino</i>	19
3.2.2 <i>Prove finali per il vino</i>	22
3.2.3 <i>Prove iniziali per il Mosto</i>	24
3.3 CONDIZIONI AL CONTORNO – ANALISI QUALITATIVA.....	26
4 RISULTATI SPERIMENTALI	29
CONCLUSIONI	30
APPLICAZIONI FUTURE.....	31
BIBLIOGRAFIA	31

Sommario

L'obiettivo principale della presente attività riguarda l'applicazione dei PEF, per il trattamento di inattivazione batterica del mosto di vino e del latte crudo.

Per la sperimentazione dei PEF, tra i microrganismi individuati, sono stati selezionati alcuni dei ceppi analizzati nella precedente annualità, nella tipizzazione microbiologica degli alimenti liquidi.

In particolare, per il vino e il mosto d'uva, sono state considerate le varie tipologie di reazioni e trasformazioni biochimiche, come la fermentazione spontanea del mosto d'uva in vino, con cui avviene la conversione spontanea degli elementi principali. Come già illustrato, nell'annualità precedente, nella fermentazione spontanea i "lieviti, muffe e batteri" fermentano gli zuccheri del mosto, trasformandoli in etanolo, CO₂ e altri metaboliti. Pertanto, per l'attività sperimentale, sono stati selezionati anche, i lieviti *Schizosaccharomyces* e *Brettanomyces*, poiché la loro eventuale presenza, potrebbe determinare la formazione di condizioni aromatiche sgradevoli nel vino.

Nella sperimentazione sono state esaminate e sviluppate tutte le fasi del ciclo di vita del microrganismo. Partendo, dalla coltura in laboratorio dei ceppi acquistati, per ciascuno, sono state analizzate le curve di crescita alle condizioni standard. Successivamente, è stato effettuato l'inoculo dei campioni di liquido, con una serie fissata di quantità di contaminante. Infine, con le modalità e i parametri descritti nel presente lavoro, sono state condotte le sperimentazioni di applicazione dei PEF. Dall'analisi dei risultati si evidenzia che, in tutte le prove sperimentali, l'applicazione dei PEF sia sul vino e sia sul mosto d'uva ha avuto esito positivo, mentre, l'applicazione sul latte ha portato ad un risultato non soddisfacente ma atteso.

I risultati attesi, sono stati valutati sia dal punto di vista microbiologico (caratteristiche della carica batterica) e sia dal punto di vista tecnologico-funzionale [intensità dei PEF (kV/cm), tempo di applicazione (s), energia trasferita (kJ)].

1 Prove sperimentali

La sperimentazione è stata condotta, presso i laboratori del dipartimento di microbiologia della facoltà di chimica e il laboratorio di elettronica di potenza della facoltà di ingegneria, e sviluppata in tre fasi. Al fine di determinare, quantitativamente e qualitativamente, la carica presente nei campioni¹, nella prima fase è stata condotta l'analisi microbiologica dei liquidi filtrati-campioni prima di effettuare l'inoculo di inquinante.

Nelle foto di Figura 1, Figura 2, Figura 3, Figura 4, Figura 7 sono riportate le operazioni di preparazione dei campioni di vino e di mosto. In particolare, sono raffigurate le fasi di filtrazione dei campioni, di inoculazione con i microrganismi cresciuti nei terreni mostrate nelle matrici.

In base ai risultati ottenuti, nel primo biennio dell'attività, è stata effettuata la caratterizzazione dei campioni con i microrganismi, ai quali verranno applicati i PEF per la loro inattivazione.

Inizialmente, in questa fase sono state determinate le caratteristiche della carica batterica presente, naturalmente, nei campioni C_{ip} . Nella trattazione che seguirà sono stati distinti i seguenti stati:

- C_{ip} che identifica lo stato 0, ovvero, quello in cui la carica batterica deriva dalla composizione dell'uva e da un'eventuale contaminazione nella fase di trasformazione di pigiatura;
- C_{im} che identifica i campioni nei quali sono stati inoculati i microrganismi selezionati e acquistati; C_{ipPEF} che identifica lo stato dopo aver applicato i PEF.

Si precisa che, ciascun campione c , sarà identificato in base alla natura del liquido, con m per il mosto d'uva, V per il vino, L per il latte.

¹ di vino, di mosto d'uva e di latte.

FASE 1

1.1 Filtrazione del mosto d'uva e del vino

La prima fase di lavoro, necessaria per la buona riuscita della sperimentazione e, anche per la qualità del vino, è stata quella della filtrazione con un separatore centrifugo. Spesso, la filtrazione centrifuga del mosto estratto dall'uva, ricco di sostanze in sospensione² è sostituita dalla chiarificazione spontanea che risulta molto lenta e a volte non molto efficace. Poiché, alcune di esse possono rimanere nella parte superiore, mentre, le altre, grazie alla forza di gravità, andranno a depositarsi nel fondo.

Il prodotto ottenuto con la filtrazione principale, è stato sottoposto a successive filtrazioni, mediante dei filtri più fini, come rappresentato nelle Figure 1-3. Infine, il prodotto è stato sottoposto ad una centrifuga refrigerata nella macchina rappresentata in Figura 4. Precisamente, il vino ed il mosto sono stati sottoposti a 2 filtrazioni (utilizzando inizialmente dei filtri da 4-5 μm e successivamente dei filtri da 0,45 μm) e trasferiti in bottiglie sterili dove poi sono stati inoculati con i ceppi selezionati.

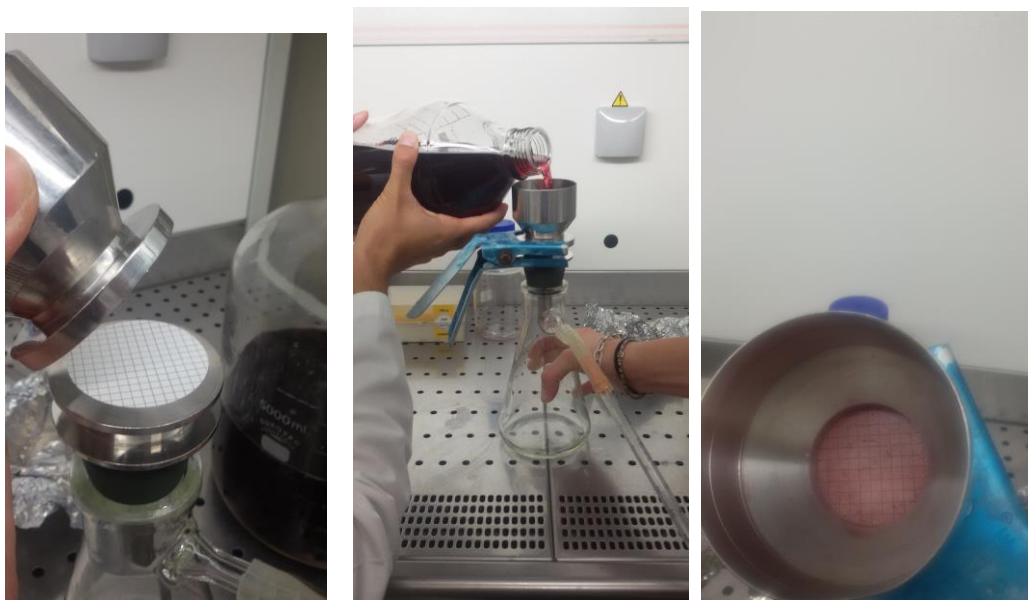


Figura 1. Filtrazione secondaria A

Per il vino, analogamente alla filtrazione del mosto d'uva, è stata effettuata una filtrazione come rappresentato nella Figura 2, Figura 3. in un recipiente dove è stato operato il vuoto. Nella Figura 3, è rappresentato anche il filtro utilizzato, come si evince dalla stessa il vino è stato efficacemente chiarificato.

² non desiderate e quindi da rimuovere

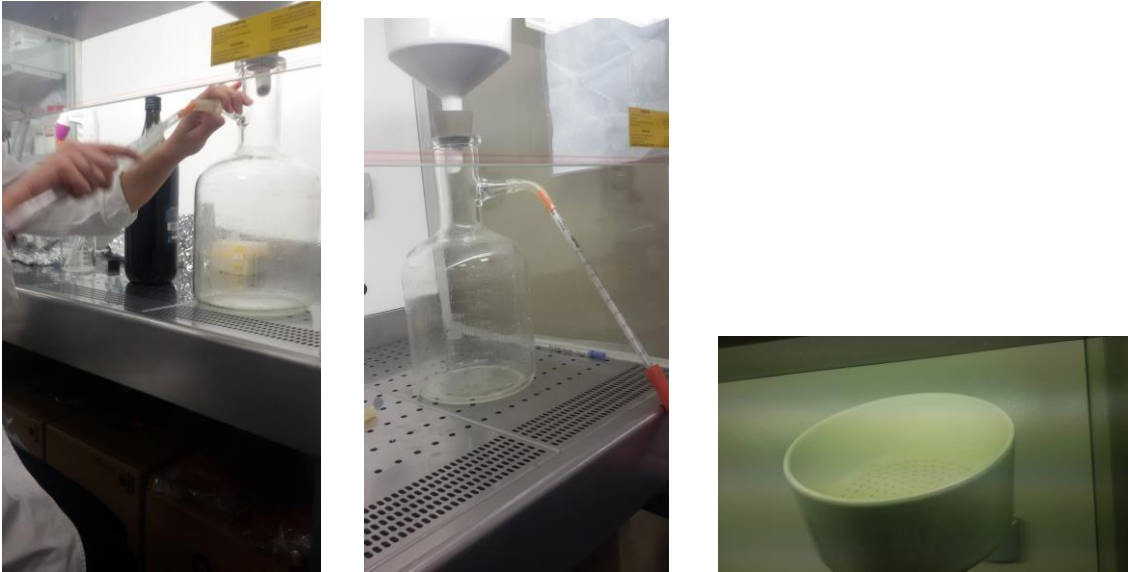


Figura 2. Filtrazione secondaria B

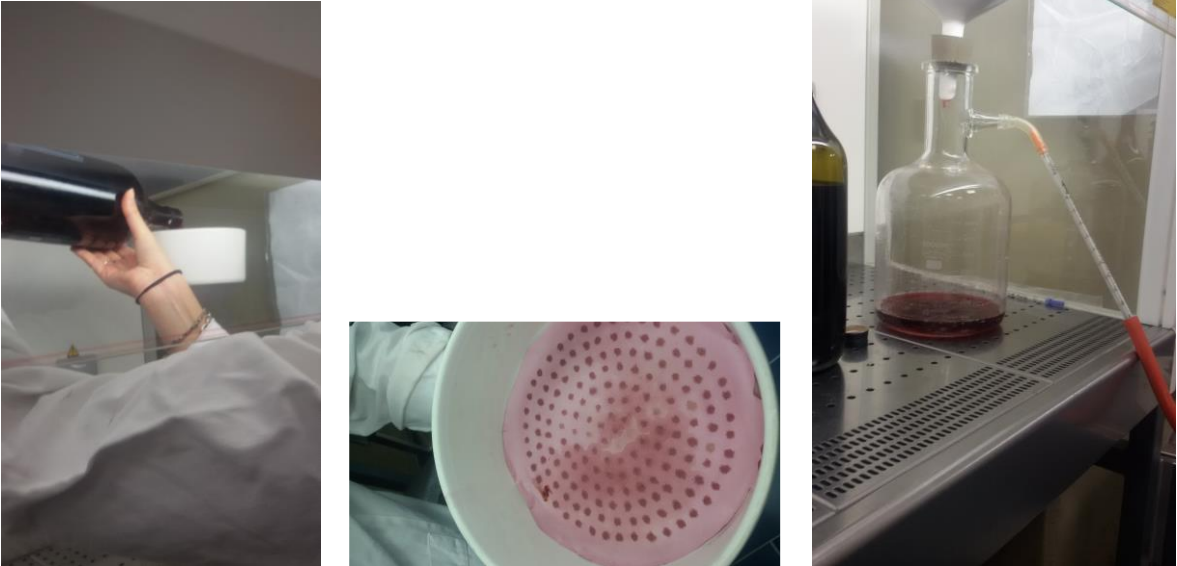


Figura 3. Filtrazione secondaria B

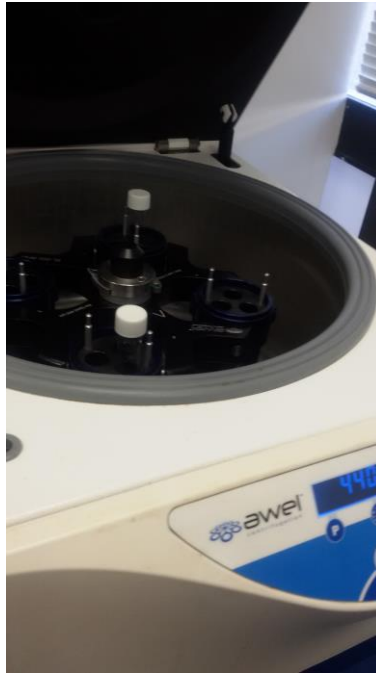


Figura 4. Filtrazione refrigerata con centrifuga

1.2 Analisi microbiologica - mosto d'uva e vino

Per lo sviluppo dell'attività, i microrganismi selezionati sono il *Dekkera Anomala*, il *Dekkera bruxellensis*, l'*Oenococcus oeni*, il *Saccharomyces bayanus var. uvarum*, il *Lactobacillus plantarum*, l'*Escherichia colie* il *Pediococcus parvulus*. Tale scelta, è scaturita dal fatto che l'avvio della fermentazione spontanea³, come visto, è dovuta sia ai lieviti apiculati e sia a quelli non *Saccharomyces*, mentre, la seconda fase della fermentazione⁴ è principalmente condotta dai lieviti *Saccharomyces cerevisiae*. Nella Figura 5, sono fotografati alcuni dei ceppi acquistati.



Figura 5- Foto dei ceppi acquistati

1.2.1 Analisi quantitativa della carica microbica e caratteristiche chimico – fisiche

Prima di procedere con la preparazione dei campioni filtrati di vino e di mosto d'uva, da inoculare con i microrganismi è stata effettuata l'analisi microbiologica degli stessi per la ricerca di microrganismi mesofili e

³ Si sottolinea che, le fermentazioni alcoliche spontanee derivano da molte specie di lieviti e da microrganismi che si trovano sull'uva e/o nell'ambiente di vinificazione.

⁴ La fermentazione spontanea è identificata come la prima fase della trasformazione

germi acidofili, riportati in Tabella 1. Per la determinazione della carica in mesofili, è stato utilizzato PCA (Plate Count Agar) OXOID con semina per spatolamento ed incubazione per 5 gg a 30°C. Per la determinazione della carica in germi acidofili (**muffe e lieviti**), è stato utilizzato MEA (Malt Extract Agar) OXOID acidificato a pH 3,5 con ac. lattico sterile al 10%, con semina per spatolamento ed incubazione per 5 gg a 30°C.

Tabella 1 - Carica microbica - risultati analisi microbiologica

Microrganismi	Vino (CFU/ml)	Mosto
Mesofili	$5,0 \cdot 10^5$	$4,4 \cdot 10^5$
Acidofili	$2,0 \cdot 10^4$	$5,0 \cdot 10^5$

Nell'ambito dell'attività, le specie considerate sono diverse sia come quantità e sia come topologia. Si stima, che la quantità microbica varia da valori bassi, intorno a, tre ordini⁵ di grandezza (10^3) di ufc/g per l'uva immatura a, man mano che la maturazione si completa⁶, valori compresi tra ($10^4 \div 10^6$) ufc/g. Nell'uva matura più della metà della popolazione microbica totale è rappresentata dai lieviti *Hanseniaspora spp (Kloechera)* e *Metschnikowia* mentre i lieviti delle specie *Dekkera*, *Candida*, *Pichia*, sono presenti in percentuale minore.

- *Dekkera Bruxellensis* . Il nome *Dekkera* viene usato intercambiabilmente con *Brettanomyces* , i lieviti appartenenti alla specie *Brettanomyces* fanno parte della famiglia dei *Pichiaceae*, il lievito è acidogenico e si riproduce velocemente in soluzioni glucosate producendo grandi quantità di acido acetico. Le ragioni che hanno portato alla sua scelta, sono legati alla formazione di diversi composti che si generano quando, il lievito si riproduce nel vino e che possono alterare l'aroma del vino. Si evidenzia che quando i livelli dei composti sensoriali superano una determinata soglia, la loro percezione è quasi sempre negativa⁷ .

- *Saccharomyces Bayanus var. uvarum* . Il *Saccharomyces bayanus* è un lievito del genere *Saccharomyces* ed è strettamente imparentato con il *Saccharomyces cerevisiae*.

- *Lactobacillus Plantarum*. Il *Lactobacillus plantarum* è una specie di batterio appartenente alla famiglia delle *Lactobacillaceae*, genere *Lactobacillus*, ed è caratterizzato da un metabolismo etero-fermentante facoltativo. In presenza di carboidrati esosi produce acido lattico mentre in presenza di carboidrati pentosi produce acido lattico ed alcol etilico subito ossidato a acido acetico.

- *Oenococcus Oeni* è un batterio Gram-positivo appartenente alla famiglia delle *Leuconostocaceae*. Tale specie di batteri lattici è responsabile della fermentazione malolattica del vino. Come visto, la malolattica non è una vera fermentazione, bensì una degradazione dell'acido malico in acido L-lattico. Questi microrganismi possono svilupparsi a pH bassi del vino⁸, anche se , affinché la fermentazione possa avvenire sono necessarie alcune condizioni chimico-fisiche fondamentali quali: una temperatura minima di 18-20 °C, una concentrazione di etanolo < al 10-13% v/v e l'assenza di residui zuccherini nel vino che porterebbero a una vera fermentazione. Essi possono dare origine a composti indesiderati come metaboliti secondari come le ammine biogene.

- *Pedococcus Parvulus* insieme ad altri batteri lattici come il *Leuconostoc* e il *Lactobacillus*, i batteri *Pedococcus* sono generalmente considerati contaminanti del vino, in particolare producono diacetile che conferisce un aroma burroso ad alcuni vini⁹.

⁵ al massimo

⁶ Si rimanda per il dettaglio all'annualità precedente

⁷ le soglie sensoriali possono differire tra le singole persone

⁸ PH di 3,5 ÷ 3,7

⁹ Come lo Chardonnay

L'analisi microbiologica delle matrici, dopo la filtrazione ha evidenziato l'efficacia del trattamento di filtrazione, infatti risultavano privi di microrganismi e quindi pronti per i successivi inoculi.

I microrganismi, acidofili e mesofili isolati dal vino, sono stati osservati al microscopio ad un ingrandimento di 1000 x la linea corrisponde a 100nm, come rappresentato in Figura 6.

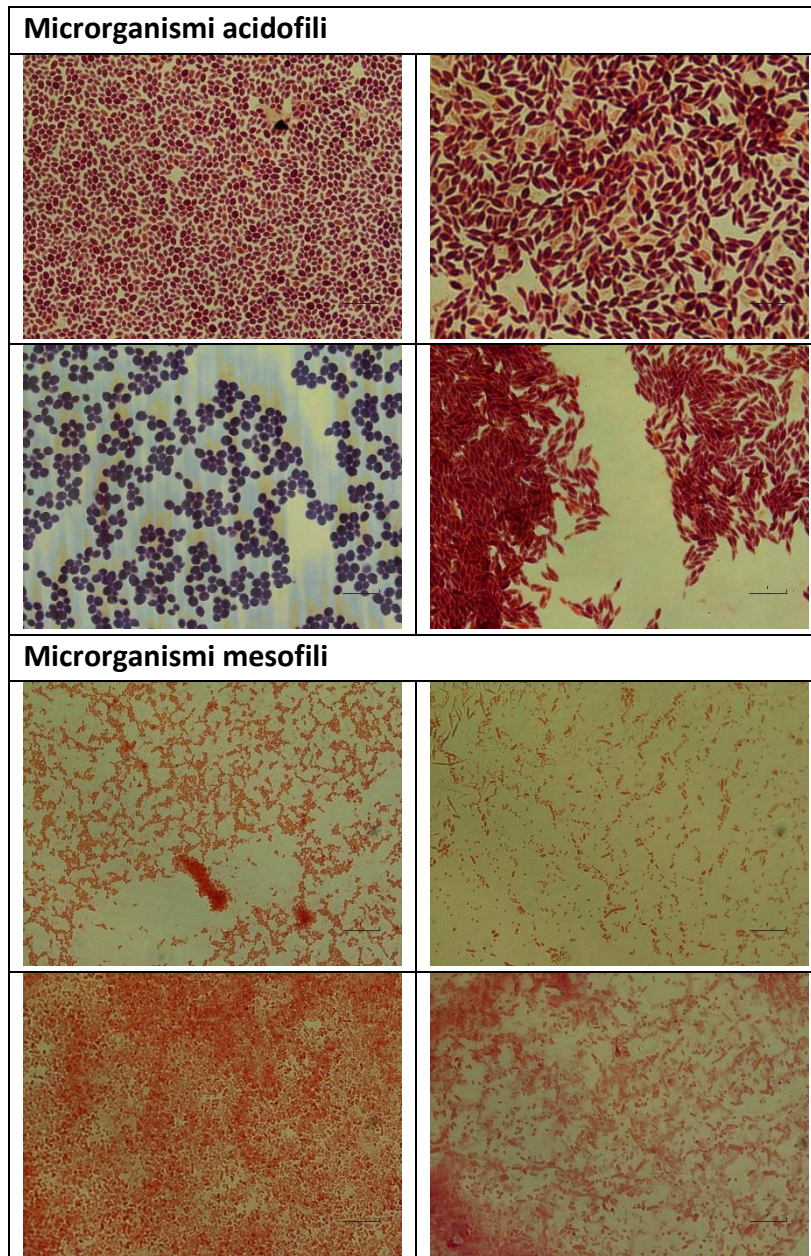


Figura 6- Foto al microscopio elettronico dei microrganismi



Figura 7 - Preparazione e inoculo dei microrganismi

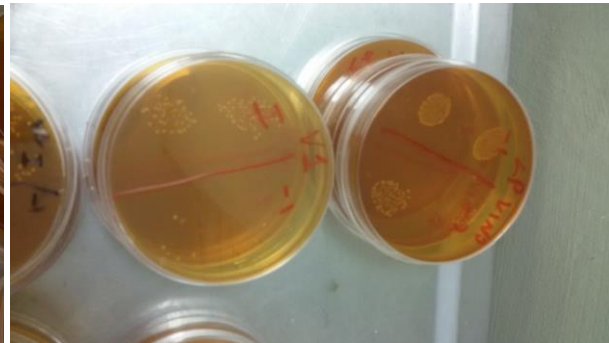
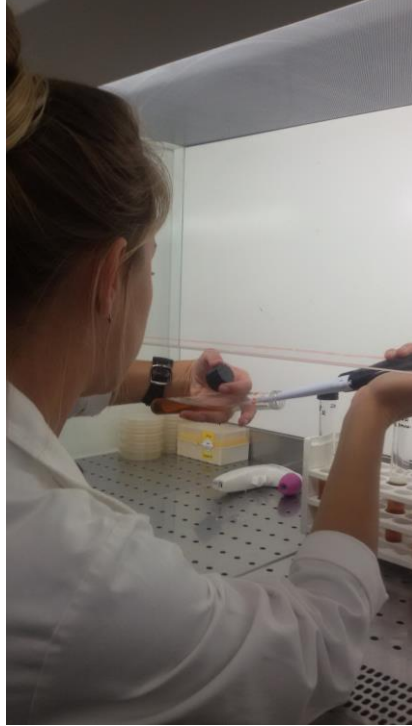


Figura 8 – Matrici contaminate con i microrganismi



Figura 9 – Vini filtrato inquinato con il contaminante

1.2.2 Le caratteristiche chimico-fisiche

Per la determinazione dei parametri chimico-fisici, come la percentuale di alcool, i livelli di glucosio e fruttosio, acido malico e acido lattico ed i valori di pH, acidità totale e acidità volatile è stato utilizzato l’analizzatore per i vini, OENOFOSS, rappresentato in Figura 10. I risultati delle analisi microbiologiche, sui campioni senza pretrattamento sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2- Caratteristiche chimico-fisiche

PARAMETRI CHIMICO-FISICI	VINO	MOSTO
Alcool	15.8%	12.1%
Glucosio e fruttosio	1.9 g/l	0.4 g/l
Acido malico	0.1 g/l	3.7 g/l
Acido lattico	2.2 g/l	---
pH	3,8	3,6
Acidità totale	6.3 g/l	6.9 g/l
Acidità volatile	0.9 g/l	0.1 g/l



Figura 10 – Analizzatore OENOFOSS

FASE 2

2 Preparazione dei campioni per l’inoculo dei microrganismi

In base all’analisi delle fasi di processo e di sviluppo delle diverse specie componenti, da cui dipendono la stabilità chimico – fisica del vino e/o la sua alterazione, è stata effettuata la scelta dei microrganismi. Come visto, prima dell’inizio della fermentazione, al fine di agevolarla e controllarla vengono aggiunti dei composti chimici diversi, che vanno dai solfiti ai lieviti. Per questa ragione, sono stati acquistati sia dei ceppi batterici e sia dei lieviti [1][2] [3].

2.1 La popolazione microbica - coltura in laboratorio

Lo studio effettuato ha riguardato la valutazione dell'uso della tecnologia a campi elettrici pulsati (PEF), come sistema alternativo di controllo microbiologico in vino e mosto.

Le fasi procedurali hanno previsto:

1. preparazione dei microrganismi per l'inoculo;
2. preparazione dei campioni sui quali svolgere il test (vino e mosto);
3. inoculo dei campioni con uno specifico contaminante;
4. controllo della sopravvivenza dei microrganismi;
5. valutazione dei risultati.

Le prove sperimentali sono state effettuate in due fasi: una per i batteri e l'altra per i lieviti.

Nella prima fase sono stati trattati i seguenti batteri:

- *Lactobacillus plantarum* LMG 01284
- *Pediococcus parvulus* LMG 11486
- *Escherichia coli* LMG 08223

I ceppi acquistati sono pervenuti in forma liofila. Pertanto, il liofilizzato è stato rivivificato nei terreni coltura e secondo le modalità di incubazione suggeriti dal produttore, che sono descritti nella Tabella 3. I microrganismi sono stati osservati al microscopio ad un ingrandimento di 1000 x la linea rappresenta 100 nm, come rappresentato in

Figura 11.

Tabella 3 - Microrganismi e condizioni di crescita

Microrganisms	Culture Medium	Temperature and time of incubation
<i>Lactobacillus plantarum</i>	De Man, Rogosa, Sharpe Broth (MRSB) - De Man, Rogosa, Sharpe Agar (MRSA)	37°C - 24h
<i>Pedococcus parvulus</i>	De Man, Rogosa, Sharpe Broth (MRSB) - De Man, Rogosa, Sharpe Agar (MRSA)	30°C - 48h
<i>Escherichia coli</i>	Nutrient Broth (NB) -Nutrient Agar (NA)	37°C - 24h

I batteri sono stati fatti crescere sui terreni di coltura e secondo le modalità di incubazione descritti nella Tabella 3. Quando un microrganismo viene trasferito in un substrato adatto, ovvero in cui è in grado di utilizzare i costituenti, si moltiplica; la moltiplicazione segue un certo numero di fasi, legate l'una all'altra senza soluzione di continuità le quali, nell'insieme, formano la cosiddetta curva di crescita, ampiamente trattata nella precedente annualità¹⁰.

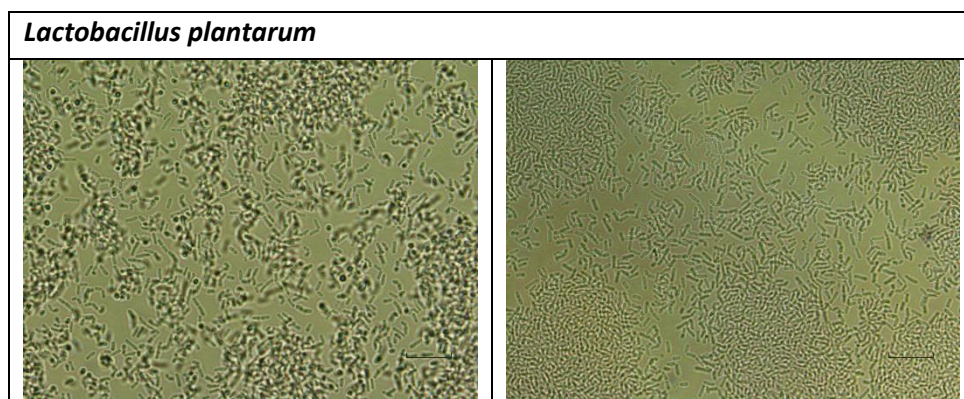
La curva di crescita batterica, ottenuta riportando su un grafico cartesiano in ascissa il tempo ed in ordinata il numero di cellule vitali, dà un'indicazione dell'andamento della crescita in una popolazione batterica. La curva può essere divisa in quattro sezioni:

- fase di *latenza (fase lag)*, che è il periodo impiegato dal microrganismo ad adattarsi all'ambiente;
- fase di *crescita esponenziale (fase log)*, in cui il microrganismo si moltiplica velocemente, sfruttando al massimo le risorse dell'ambiente;
- fase *stazionaria*, dove il microrganismo arresta la sua crescita, poiché uno o più nutrienti sono terminati. I batteri che si dividono e quelli che muoiono sono in equilibrio, alcune cellule entrano in uno stato di latenza;
- fase di *declino (o di morte)*, in questa il numero di microrganismi comincia ad abbassarsi, poiché le cellule morte iniziano a superare quelle in divisione o in latenza.

La velocità di crescita corrisponde alla variazione del numero di cellule o della massa per unità di tempo.

L'intervallo di tempo durante il quale si formano due cellule a partire da un singolo individuo è chiamato generazione.

Il tempo di generazione varia molto in base ai microrganismi (molti batteri hanno tempi di generazione di compresi tra 1 e 3 ore, ma sono noti anche alcuni microrganismi che crescono molto velocemente, dividendosi in una decina di minuti, e altri che hanno tempi di generazione di parecchie ore o addirittura di giorni).



¹⁰ Si rimanda alla trattazione e rappresentazione della crescita microbica a S dell'equazione di Gompertz.

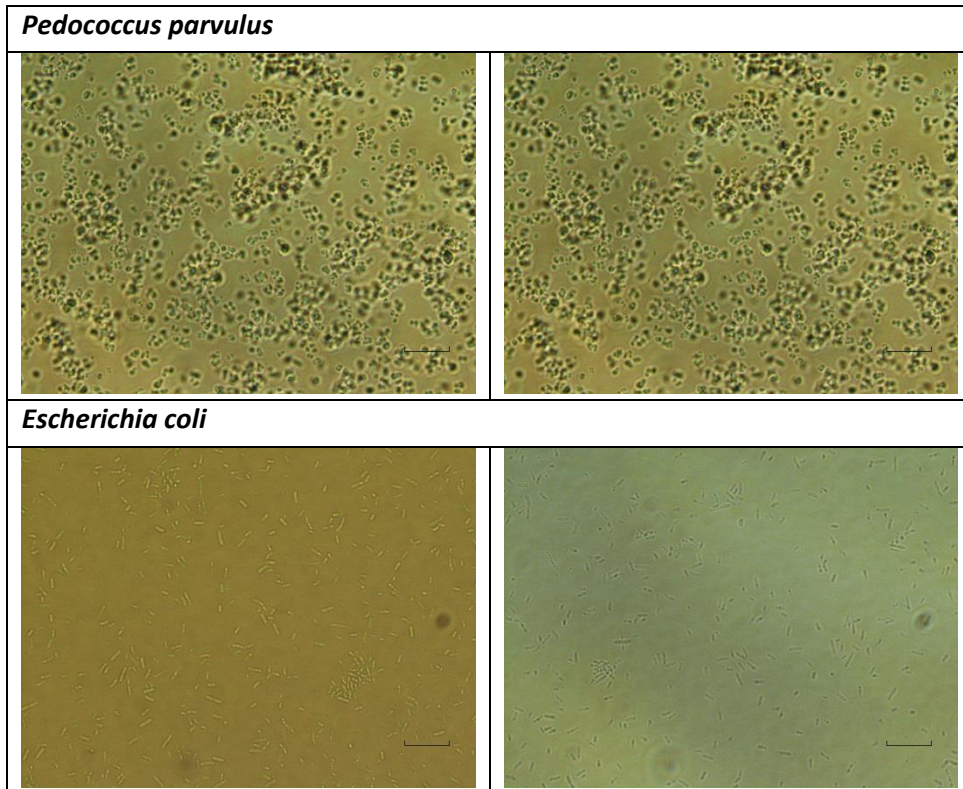


Figura 11 – Osservazione al microscopio

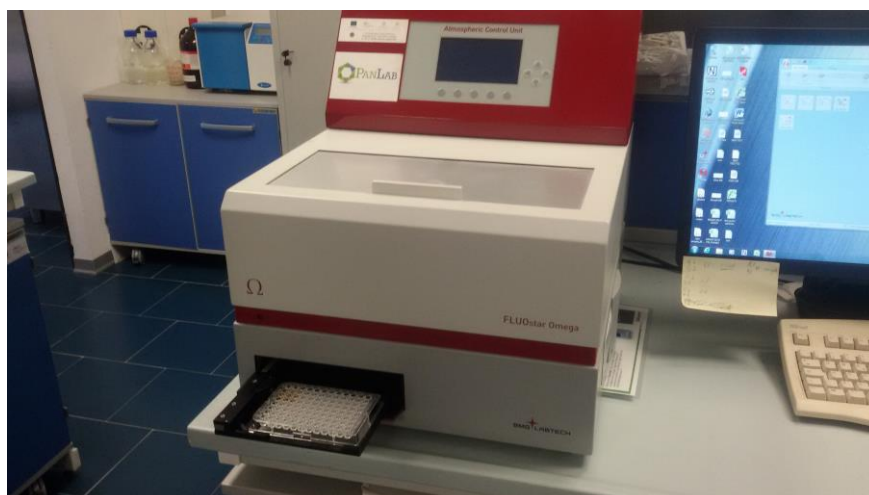


Figura 12 . Fluostar Omega per determinare la curva di crescita

La crescita batterica è stata monitorata mediante la misurazione della densità ottica o assorbanza utilizzando uno spettrofotometro. Una sospensione cellulare appare torbida perché ogni cellula riflette la luce. Quanto maggiore è il numero di cellule presenti, tanto più la sospensione riflette la luce e tanto maggiore è la torbidità. È stato utilizzato un plate reader (Fluostar Omega), come rappresentato in Figura 12, all'interno del quale sono state incubate le sospensioni batteriche nei terreni e alle temperature specifiche per ciascun ceppo ed è stata impostata la lettura della densità ottica a 600nm ogni 30 min per 72 h.

Dopo aver ottenuto le curve di crescita, e aver stabilito per ciascun ceppo la fase logaritmica si è proceduto all'allestimento degli inoculi.

I ceppi prelevati in fase logaritmica sono stati centrifugati, lavati con soluzione fisiologica sterile (SF: 0,8% NaCl - 0,1% Peptone) e risospesi in SF in modo da ottenere una OD₆₀₀ corrispondente a 10⁸ unità formanti colonia (CFU)/ml, utilizzando come riferimento lo standard McFarland 0,5 (gli standard McFarland sono usati come standard di torbidità nella preparazione di sospensioni batteriche, in modo da ottenere una certa concentrazione di cellule per volume di sospensione) e confermando la concentrazione cellulare mediante conta vitale.

La conta vitale è la determinazione del numero delle cellule vitali, ed è stata eseguita mediante conta su piastra, mediante piastramento in superficie (o per spatolamento) del campione opportunamente diluito.

Per contare le colonie bisogna evitare una crescita confluyente, quindi sono state allestite delle diluizioni progressive con SF e i batteri, derivanti da tutte le diluizioni, sono stati seminati su piastre diverse.

Nel piastramento in superficie, un volume corrispondente a 0, 1 ml o meno, di una coltura opportunamente diluita è stato distribuito sulla superficie di una piastra di terreno agarizzato, specifico per ogni microrganismo, con una spatola sterile.

2.2 Preparazione dei campioni

2.2.1 Mosto e Vino – preparazione dei microrganismi per l'inoculo

Inoculo dei campioni

I campioni in seguito alla filtrazione sono stati inoculati con le sospensioni microbiche preparate come descritto precedentemente, al fine di avere una concentrazione finale di 10⁶ CFU/ml.

In seguito alla preparazione dell'inoculo, la concentrazione batterica nei campioni di vino e mosto è stata confermata mediante conta su piastra, utilizzando terreni colturali e tempi di incubazione specifici per ogni microrganismo.

Controlli della sopravvivenza dei microrganismi

I campioni inoculati sono stati mantenuti a 20-25 ° C fino al momento del trattamento con i PEF.

In seguito ad ogni trattamento è stato prelevato un campione idoneo, normalmente 5 ml, di cui è stato determinato il numero di microrganismi vitali mediante conta su piastra, eseguita secondo modalità descritte precedentemente. I risultati sono riportati ed espressi come CFU per ml di prodotto tal quale, nella tabella 4.

FASE 3

3 Parametri sperimentali

L'intensità del campo elettrico e degli impulsi applicati sono stati misurati nella camera di trattamento, con una sonda ad alta tensione e una sonda di corrente, collegati a un oscilloscopio. L'energia per impulso E_{PEF} è stata calcolata con la seguente equazione:

$$E_{PEF} = \frac{1}{\rho} \int_0^{\infty} I(t) \times V(t) dt \quad (1)$$

dove I è l'intensità di corrente (A), V (V) è la tensione applicata e t (s) è la durata dell'impulso.

L'energia specifica totale applicata $E_{PEF(tot)}$ è stata calcolata moltiplicando l'energia per impulso E_{PEF} per il numero di impulsi.

I risultati dell'applicazione, in termini di inattivazione della carica batterica, dipendono dalla quantità di energia trasmessa al microrganismo. I parametri e le condizioni necessarie, affinché, l'applicazione dei PEF abbia un esito positivo, sono stati determinati mediante numerose prove.

Si evidenzia che, le prime prove sono state effettuate per testare la robustezza del prototipo. Si rimanda al report dell'università di Messina, per la descrizione dettagliata.

Nelle tabelle di seguito illustrate, è riportato il volume di liquido trattato che dipende dalla distanza tra gli elettrodi, gli elettrodi di forma circolare hanno un raggio di 4 cm. Mentre nella Figura 13 è rappresentato la fase di riempimento del porta campione

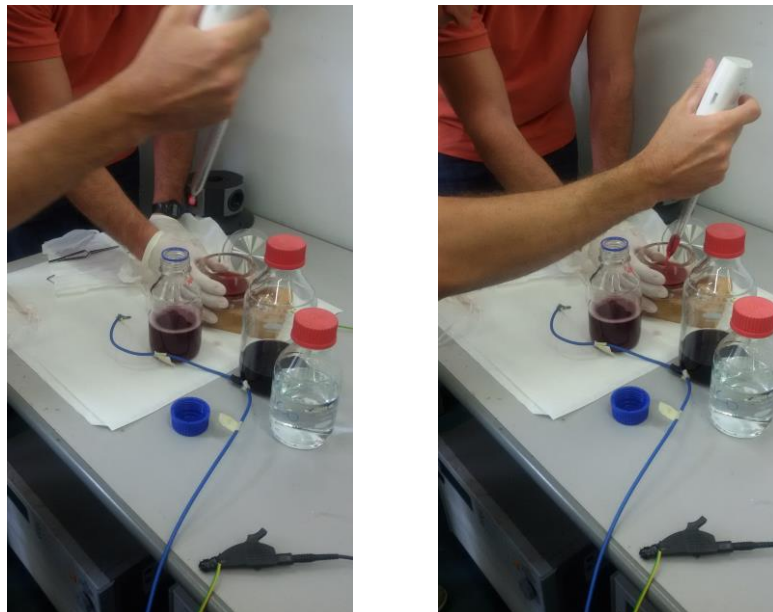


Figura 13 – Riempimento del porta campione

3.1 Test di prova

In questa trattazione, vengono descritti, i parametri con i quali si determina la quantità di energia prodotta, che dipendono dalle condizioni di carica dei condensatori. Ovviamente, la quantità di energia trasmessa dipende, dalla distanza tra gli elettrodi, determinando l'intensità del campo elettrico generato. Tra gli altri parametri che incidono sull'efficacia dell'applicazione rientrano il numero di impulsi.

A partire dal test effettuato con un singolo impulso applicato al campione m di mosto d'uva inquinato con il *Lactobacillus plantarum*, sono state condotte 5 prove, ciascuna corrispondente ad una distanza tra le armature variabile tra [5÷30] mm ad intervalli regolari di 5 mm. Le prove sono state effettuate sia sui campioni di mosto m e sia sui campioni di vino v inquinati, dopo aver effettuato dei test di prova della robustezza. Di fatto, non è

stata effettuata la conta batterica poiché non avrebbe prodotto alcun risultato sull'inattivazione. Tuttavia i test di prova, sono risultati necessari, per comprendere il comportamento dell'intero sistema, poiché il mosto d'uva e il vino hanno caratteristiche fisiche diverse. Le tabelle dalla n. 4 alla n. 9, riportano gli input e gli outputs delle serie di prova.

Tabella 4 Test di prova sul mosto d'uva - single impulso

Campione	Contaminante	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	N° impulsi	Dist. armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [V/cm]
m1	I. plantarum	single pulse	150,78	1	30	13400	100	4,47
m2	I. plantarum	single pulse	125,65	1	25	13400	105	5,36
m3	I. plantarum	single pulse	100,52	1	20	13400	112	6,70
m4	I. plantarum	single pulse	75,39	1	15	13400	119	8,93
m5	I. plantarum	single pulse	50,26	1	10	13600	127	13,60
m6	I. plantarum	single pulse	25,13	1	5	13600	139	27,20

Tabella 5 Test di prova sul mosto d'uva – 5 impulsi

Campione	Contaminante	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	N° impulsi	Dist. armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [V/cm]
m7	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	150,78	5	30	13200	100	4,40
m8	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	125,65	5	25	13800	106	5,52
m9	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	100,52	5	20	13400	112	6,70
m10	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	75,39	5	15	13400	122	8,93
m11	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	50,26	5	10	13600	128,6	13,60
m12	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	25,13	5	5	13800	142,8	27,60

Tabella 6 Test di prova sul mosto d'uva – 10 impulsi

Campione	Contaminante	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	N° impulsi	Dist. armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [V/cm]
m13	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	150,78	10	30	13200	103,3	4,40
m14	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	125,65	10	25	13400	110,5	5,36
m15	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	100,52	10	20	13600	118	6,80
m16	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	75,39	10	15	13600	124,5	9,07
m17	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	50,26	10	10	13400	136,4	13,40
m18	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	25,13	10	5	13400	146,1	26,80

Tabella 7 Test di prova sul vino– 1 impulso

Campione	Contaminante	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	N° impulsi	Dist. armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [V/cm]
v1	I. plantarum	single pulse	100,52	1	20	13600	116,8	6,80
v2	I. plantarum	single pulse	75,39	1	15	13600	124,7	9,07
v3	I. plantarum	single pulse	50,26	1	10	13600	129,7	13,60
v4	I. plantarum	single pulse	25,13	1	5	13800	142,8	27,60
v16	I. plantarum	single pulse	12,565	1	2,5	13600	143,2	54,40

Tabella 8 Test di prova sul vino – 5 impulsi

Campione	Contaminante	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	N° impulsi	Dist. armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [V/cm]
v5	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	150,78	5	30	13400	99,75	4,47
v6	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	125,65	5	25	13400	107,2	5,36
v7	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	100,52	5	20	13400	115,4	6,70
v8	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	75,39	5	15	13400	119,2	8,93
v9	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	50,26	5	10	13400	129,9	13,40
v10	I. plantarum	5 pulses; delay 1s	25,13	5	5	13600	138,1	27,20

Tabella 9_Test di prova sul vino– 10 impulsi

Campione	Contaminante	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	N° impulsi	Dist. armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [V/cm]
v11	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	125,65	10	25	13400	110,9	5,36
v12	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	100,52	10	20	13400	115,8	6,70
v13	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	75,39	10	15	13400	125,1	8,93
v14	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	50,26	10	10	13600	132,5	13,60
v15	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	25,13	10	5	13400	139,4	26,80
v17	I. plantarum	10 pulses; delay 1s	12,565	10	2,5	13600	141,8	54,40

3.2 Applicazione dei PEF

A partire dalle prime prove che, sono state condotte con un numero basso di impulsi e variando la distanza tra gli elettrodi come riportato nelle tabelle, si evidenzia che ogni test è stato eseguito sanificando, il portacampione, ad ogni cambio di liquido.

3.2.1 Prove iniziali per il vino

Le sperimentazioni iniziali, sono state effettuate applicando, le stesse condizioni di prova dei test.

Nelle Tabella 10-12 sono riportati sia i parametri (ad es. distanza tra gli elettrodi, tensione e corrente di carica) e sia i risultati ottenuti, partendo da una concentrazione iniziale di inquinante di $2,75 \cdot 10^6$ [cfu/ml].

Mentre nelle Figura 15, Figura 16, Figura 18 sono rappresentate le curve di decadimento della carica batterica per le diverse condizioni di applicazione. Si evidenzia, che i risultati ottenuti derivano dall'applicazione dei PEF a ogni campione i-esimo, v1...v16 e che ciascuna applicazione è diversa perché viene caratterizzata da una distanza tra gli elettrodi. Pertanto, la carica batterica sarà diversa perché i PEF sono applicati a volumi diversi di campione. Tale precisazione è doverosa per non incorrere in erronee interpretazioni dei risultati, perché, ad es. confrontando la carica batterica del campione v4 con il v16, per il primo si ha una contrazione minore rispetto a v16 a cui è applicato un campo elettrico al cm maggiore. Infine, si osserva che ogni applicazione caratterizzata da numero di impulsi e distanza tra gli elettrodi è stata effettuata una sola volta sullo stesso campione.

Tabella 10_Parametri e risultati sperimentali – Lactobacillum plantarum (1 impulso)

Campione	Contaminante [cfu/ml]	tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	Concentrazione [cfu/ml]	N° impuls	Dist. Armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [kV/cm]
v1	I. plantarum	single pulse	100,52	2750	1	20	13600	116,8	6,80
v2	I. plantarum	single pulse	75,39	2250	1	15	13600	124,7	9,07
v3	I. plantarum	single pulse	50,26	2750	1	10	13600	129,7	13,60
v4	I. plantarum	single pulse	25,13	2500	1	5	13800	142,8	27,60
v16	I. plantarum	single pulse	12,565	2750	1	2,5	13600	143,2	54,40

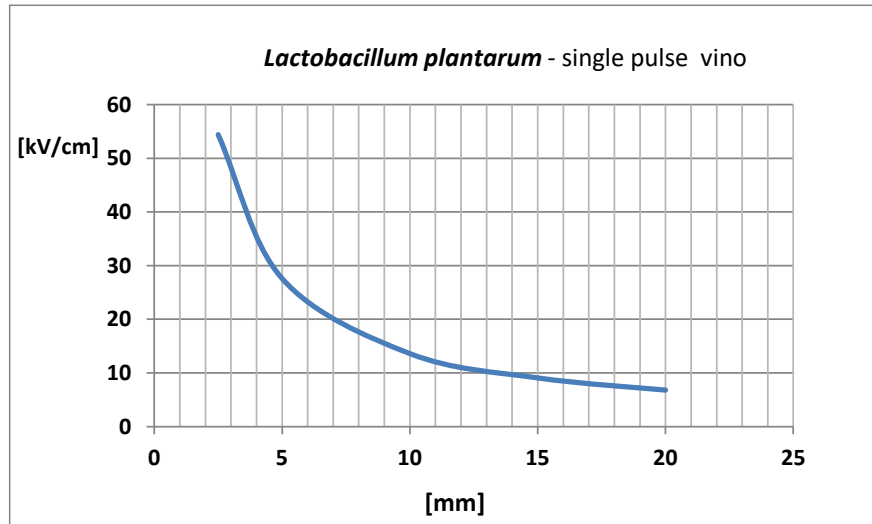


Figura 14 – Intensità dei PEF in funzione distanza tra elettrodi

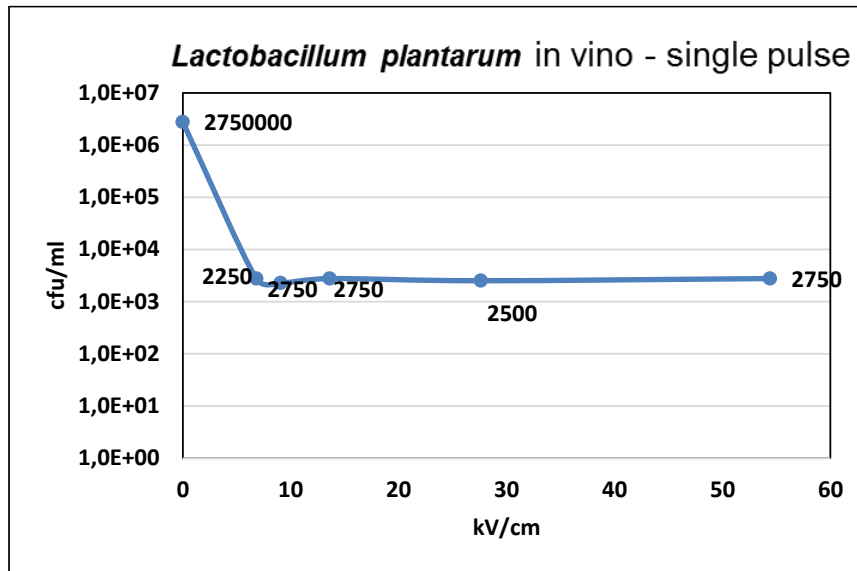


Figura 15 – Carica batterica in funzione dell'intensità dei PEF

Tabella 11 Parametri e risultati sperimentali – Lactobacillum plantarum (5 impulsi)

Campione	Contaminante [cfu/ml]	tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	Concentrazione [cfu/ml]	N° impuls	Dist. Armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [kV/cm]
v5	l. plantarum	5 pulses; delay 1s	150,78	2750	5	30	13400	99,75	4,47
v6	l. plantarum	5 pulses; delay 1s	125,65	3250	5	25	13400	107,2	5,36
v7	l. plantarum	5 pulses; delay 1s	100,52	2250	5	20	13400	115,4	6,70
v8	l. plantarum	5 pulses; delay 1s	75,39	2750	5	15	13400	119,2	8,93
v9	l. plantarum	5 pulses; delay 1s	50,26	3250	5	10	13400	129,9	13,40
v10	l. plantarum	5 pulses; delay 1s	25,13	4000	5	5	13600	138,1	27,20

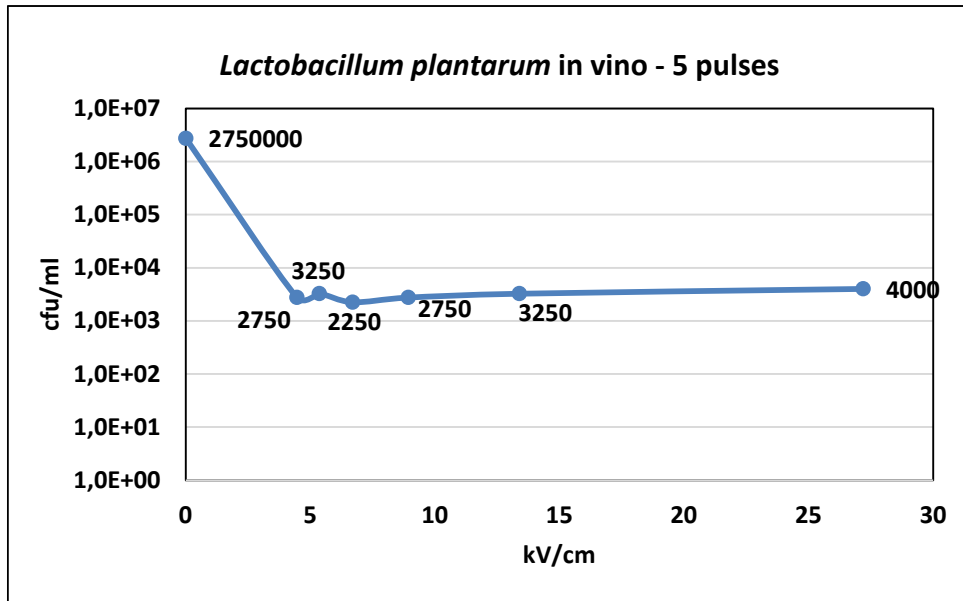


Figura 16 – Carica batterica in funzione dell'intensità dei PEF

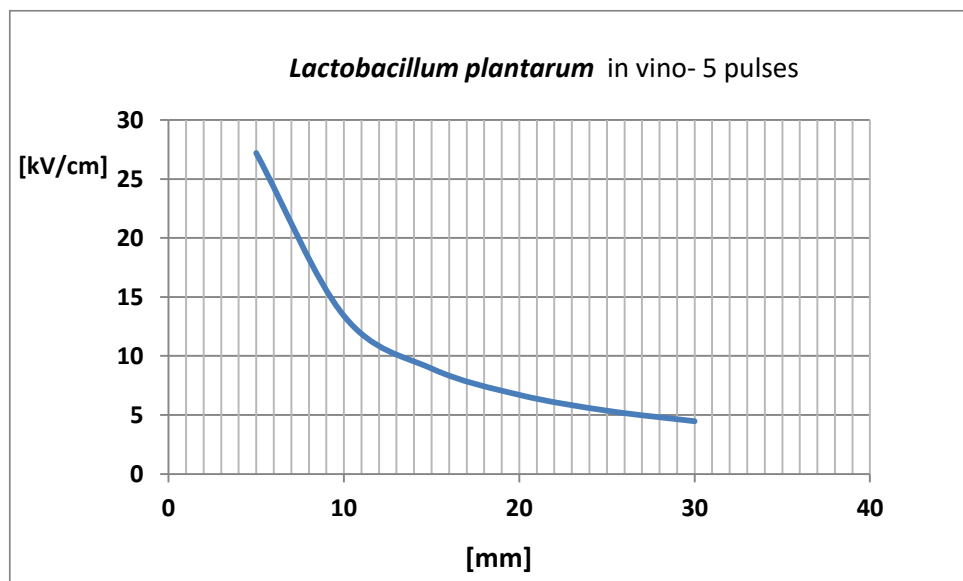


Figura 17 – Intensità dei PEF in funzione distanza tra elettrodi

Tabella 12 Parametri e risultati sperimentali – *Lactobacillum plantarum* (10 impulsi)

Campione	Contaminante [cfu/ml]	tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	Concentrazione [cfu/ml]	N° impulsi	Dist. Armature [mm]	Tensione carica [V]	Corrente carica [A]	E [kV/cm]
v11	<i>L. plantarum</i>	10 pulses; delay 1s	125,65	3500	10	25	13400	110,9	5,36
v12	<i>L. plantarum</i>	10 pulses; delay 1s	100,52	750	10	20	13400	115,8	6,70
v13	<i>L. plantarum</i>	10 pulses; delay 1s	75,39	3250	10	15	13400	125,1	8,93
v14	<i>L. plantarum</i>	10 pulses; delay 1s	50,26	2000	10	10	13600	132,5	13,60
v15	<i>L. plantarum</i>	10 pulses; delay 1s	25,13	2000	10	5	13400	139,4	26,80
v17	<i>L. plantarum</i>	10 pulses; delay 1s	12,565	2500	10	2,5	13600	141,8	54,40

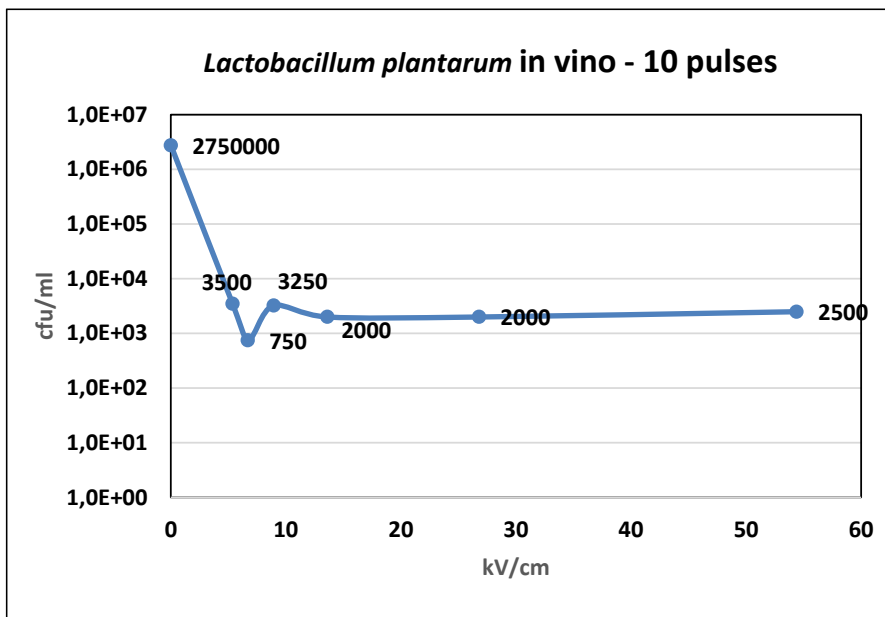


Figura 18 – Carica batterica in funzione dell’intensità dei PEF

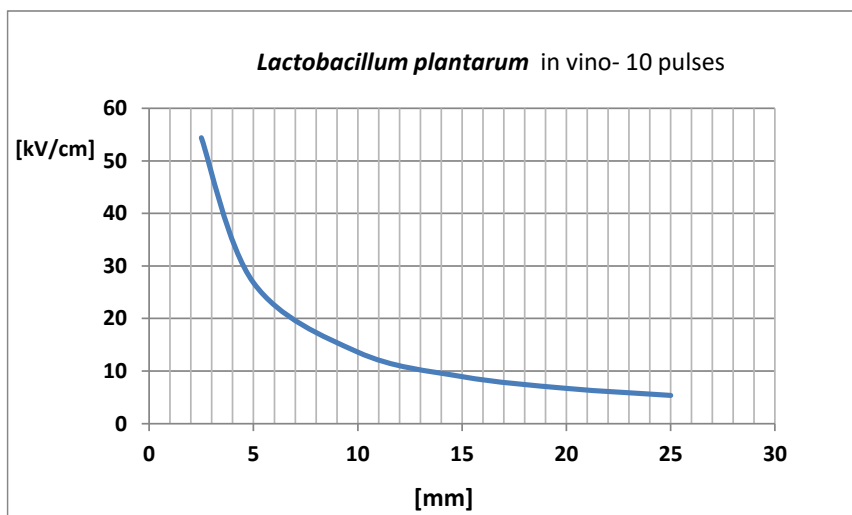


Figura 19 – Intensità dei PEF in funzione distanza tra elettrodi

3.2.2 Prove finali per il vino

Le prove finali sono state eseguite applicando un numero maggiore di impulsi, per due differenti concentrazioni di inquinanti e di tipologia.

Nella trattazione sono riportate la prima prova e l’ultima delle prove finali.

La prima delle prove finali è stata effettuata con un numero di impulsi pari a 100 sul vino inquinato di *Lactobacillum plantarum* avente una concentrazione iniziale di $4,4 \cdot 10^6$ [cfu/ml]. Nella Tabella 13 sono riportati sia i parametri (ad es. distanza tra gli elettrodi, tensione e corrente di carica) e sia i parametri operativi per il trattamento mediante PEF, dei campioni di vino contaminati con il *Lactobacillum plantarum*.

Nella Figura 20 è rappresentata la curva di inattivazione in funzione del campo elettrico e della distanza tra gli elettrodi.

Tabella 13 - Parametri e risultati sperimentali – *Lactobacillum plantarum* 100 impulsi

Campione	Contaminante [cfu/ml]	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	Concentrazione [cfu/ml]	N° impulsi	Dist. Armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [kV/cm]
v1p	<i>lactobacillum plantarum</i>	100 pulses; delay 5s	50,26	20	100	10	13000	190	13
v2p	<i>lactobacillum plantarum</i>	100 pulses; delay 5s	25,13	18	100	5	13000	214	26
v3p	<i>lactobacillum plantarum</i>	100 pulses; delay 5s	12,565	16	100	2,5	13000	223	52

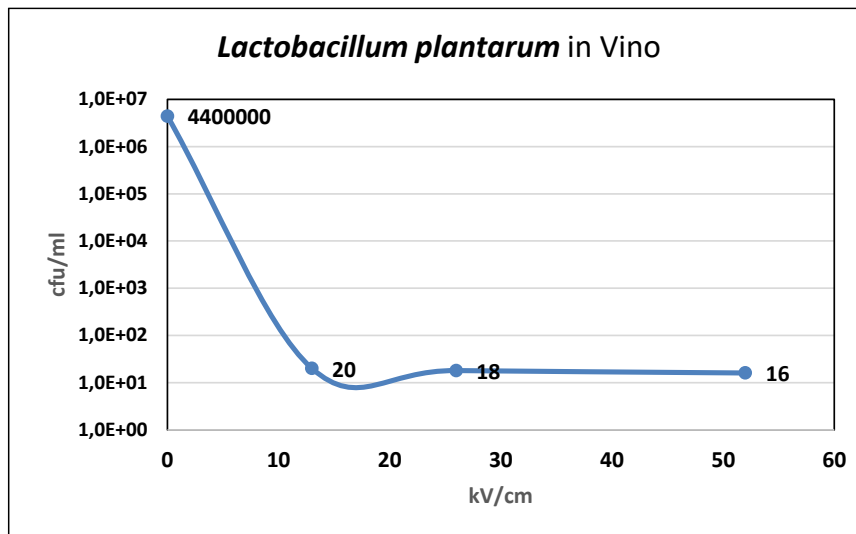


Figura 20 – Carica batterica in funzione dell'intensità dei PEF

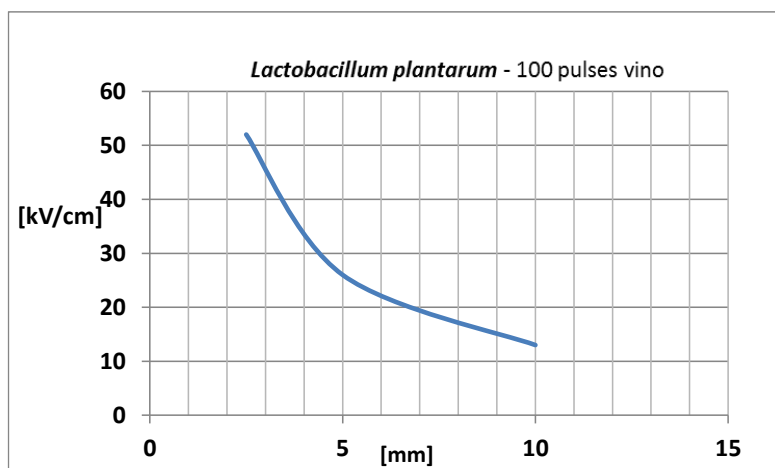


Figura 21 – Intensità dei PEF in funzione distanza tra elettrodi

La seconda prova è stata effettuata con una concentrazione di inquinante di $4,8 \cdot 10^6$ [cfu/ml] di *pseudococcus parvulus*. Analogamente alla precedente, sono riportate nella Tabella 14 i parametri del test e nella Figura 22 è rappresentata la curva dell'inattivazione della carica batterica.

Tabella 14 Parametri e risultati sperimentali – *pseudococcus parvulus*

Campione	Contaminante [cfu/ml]	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	Concentrazione [cfu/ml]	N° impuls	Dist. Armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [kV/cm]
v1pp	<i>pseudococcus parvulus</i>	100 pulses; delay 5s	50,26	170	100	10	13000	195	13
v2pp	<i>pseudococcus parvulus</i>	100 pulses; delay 5s	25,13	8	100	5	13000	220	26
v3pp	<i>pseudococcus parvulus</i>	100 pulses; delay 5s	12,565	9	100	2,5	13000	228	52

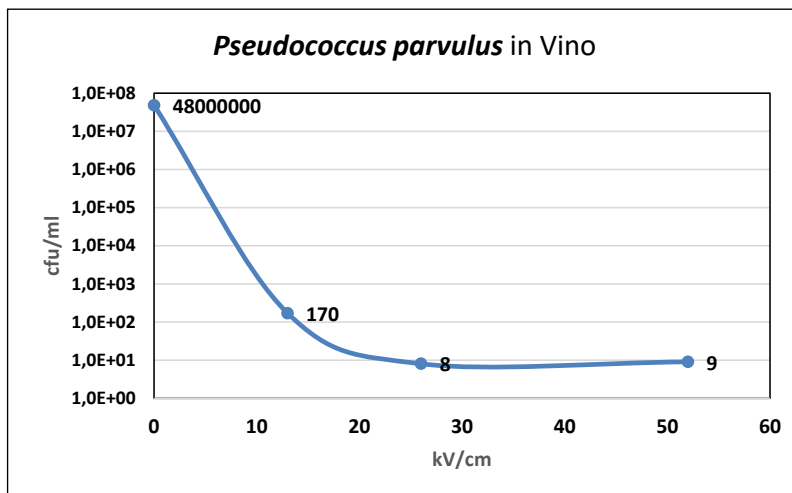


Figura 22 – Carica batterica in funzione dell'intensità dei PEF

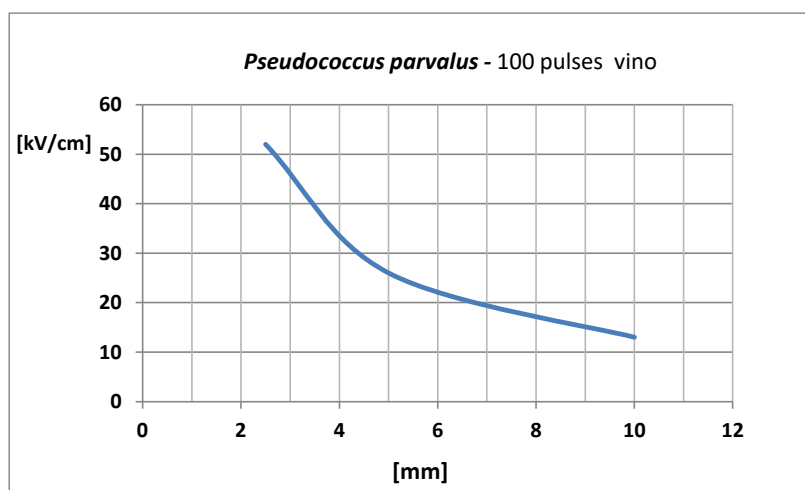


Figura 23 – Intensità dei PEF in funzione distanza tra elettrodi

3.2.3 Prove iniziali per il Mosto

Anche per il mosto sono state condotte due serie di prove, ovvero, quella iniziale e finale. Nella Tabella 15 sono riportati sia i parametri (ad es. distanza tra gli elettrodi, tensione e corrente di carica) e sia i risultati ottenuti applicando al liquido contaminato, con il *Lactobacillum plantarum*, partendo da una concentrazione iniziale di inquinante di $4,4 \cdot 10^6$ [cfu/ml].

Mentre, nella Figura 24 è rappresentata la corrispondente inattivazione.

Una serie equivalente di prove, è stata effettuata contaminando il liquido con lo *Pseudococcus parvulus*.

Nella Tabella 16 sono riportati i risultati ottenuti per una concentrazione iniziale $4,8 \cdot 10^6$ [cfu/ml] di contaminante. Mentre, nella Figura 26 è rappresentata la corrispondente inattivazione della carica.

Tabella 15 Parametri e risultati sperimentali – *Lactobacillum plantarum*

Campione	Contaminante [cfu/ml]	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	Concentrazione [cfu/ml]	N° impuls	Dist. Armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [kV/cm]
m1lp	<i>lactobacillum plantarum</i>	100 pulses; delay 5s	50,26	3000	100	10	13000	180	13
m2lp	<i>lactobacillum plantarum</i>	100 pulses; delay 5s	25,13	580	100	5	13000	200	26
m3lp	<i>lactobacillum plantarum</i>	100 pulses; delay 5s	12,565	600	100	2,5	13000	226,5	52

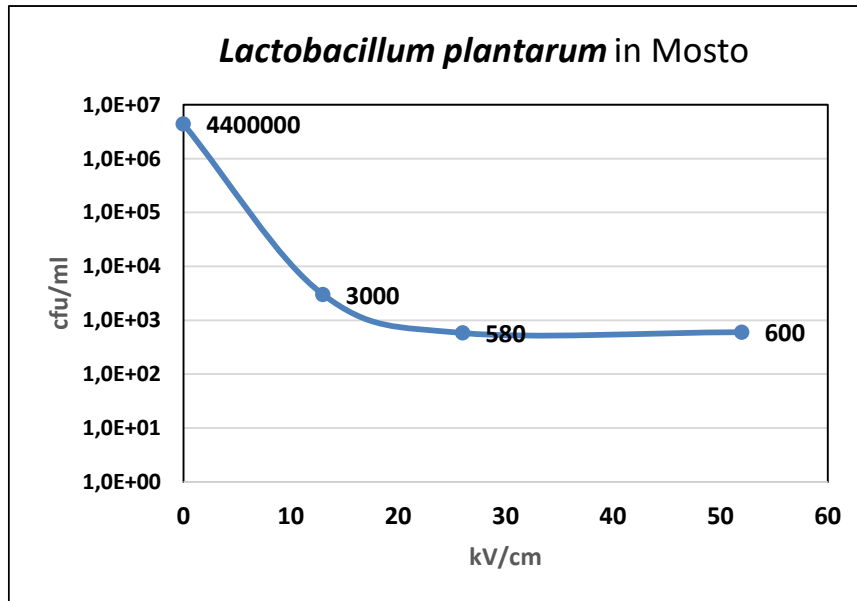


Figura 24 – Carica batterica in funzione dell'intensità dei PEF

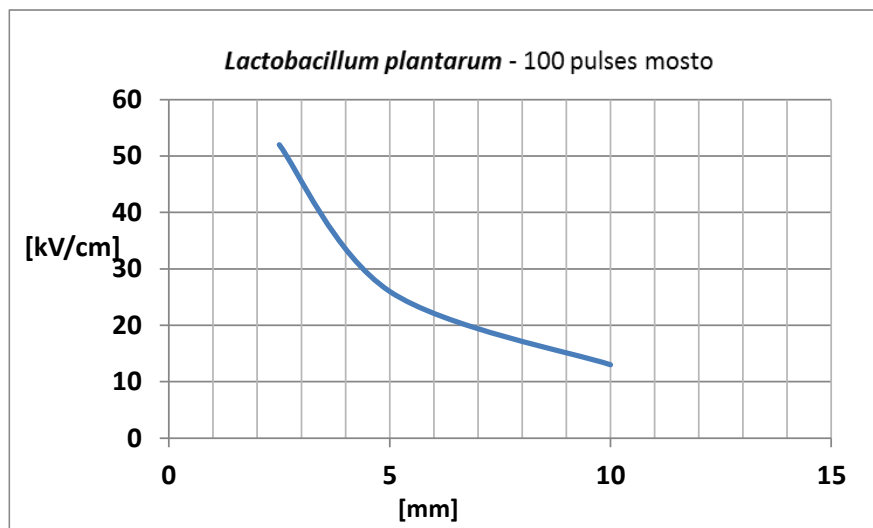


Figura 25 – Intensità dei PEF in funzione distanza tra elettrodi

Tabella 16 Parametri e risultati sperimentali – *pseudococcus parvulus*

Campione	Contaminante [cfu/ml]	Tipologia di scarica	Volume trattato [ml]	Concentrazione [cfu/ml]	N° impulsi	Dist. Armature [mm]	Tensione carico [V]	Corrente carico [A]	E [kV/cm]
m1pp	<i>pseudococcus parvulus</i>	100 pulses; delay 5s	50,26	200	100	10	13000	192	13
m2pp	<i>pseudococcus parvulus</i>	100 pulses; delay 5s	25,13	6	100	5	13000	200	26
m3pp	<i>pseudococcus parvulus</i>	100 pulses; delay 5s	12,565	4	100	2,5	13000	220	52

Figura 26 – Carica batterica in funzione dell'intensità dei PEF

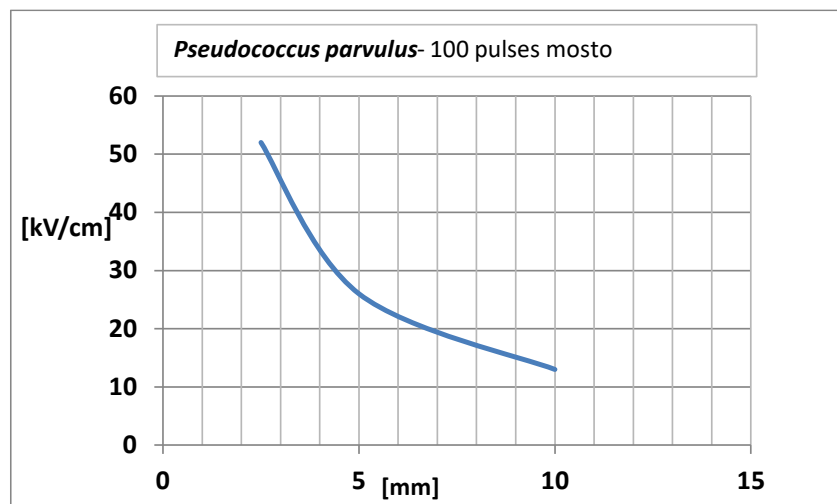


Figura 27 – Intensità dei PEF in funzione distanza tra elettrodi

3.3 Condizioni al contorno – analisi qualitativa

L'applicabilità dei PEF per l'inattivazione dei microrganismi e il buon esito della stessa, in base agli scenari di sviluppo delle fasi sperimentali precedentemente illustrate, conferma che sia la natura del liquido e sia il tipo di microrganismo, condizionano la scelta dei parametri per lo sviluppo dell'applicazione, affinché abbia esito positivo.

A partire dalla natura del liquido, ovvero, mosto d'uva, vino e latte, in base ai risultati delle prove sperimentali, si è constatato che alcuni dei microrganismi non sopravvivono nel vino mentre gli stessi crescono bene e si moltiplicano nel mosto d'uva e nel latte.

Nell'ambito della sperimentazione con l'applicazione dei PEF, con 100 impulsi, al vino e al mosto d'uva contaminati con *Pseudococcus parvulus* e *Lactobacillum plantarum*, come rappresentato nelle Figura 28 Figura 29, Figura 29, Figura 30 e Figura 31 si ha una drastica riduzione della carica iniziale, man mano che si riduce la distanza tra gli elettrodi, tuttavia, si può affermare che con un numero di impulsi elevato gli effetti dovuti a un campo elettrico sono compensati dalla scarica di un "treno" di impulsi.

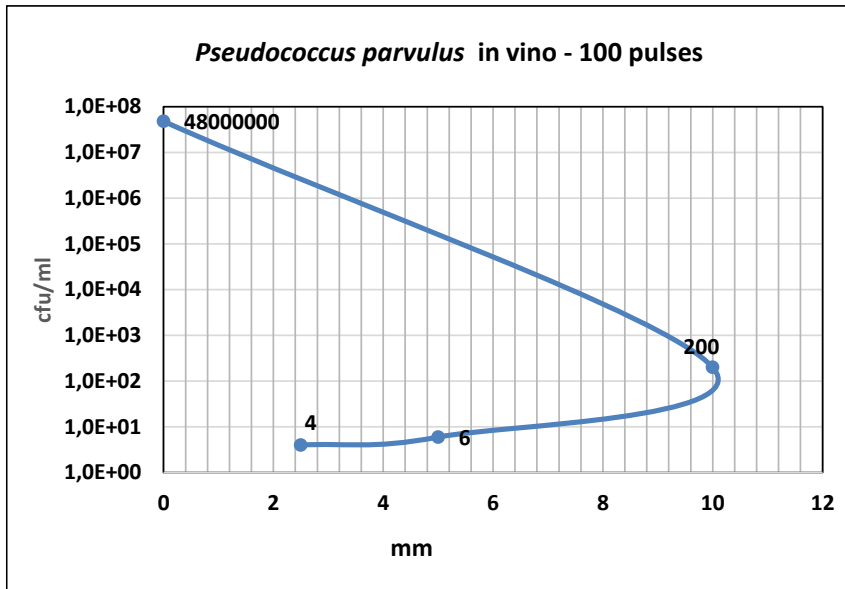


Figura 28 – Carica batterica in funzione della distanza tra gli elettrodi

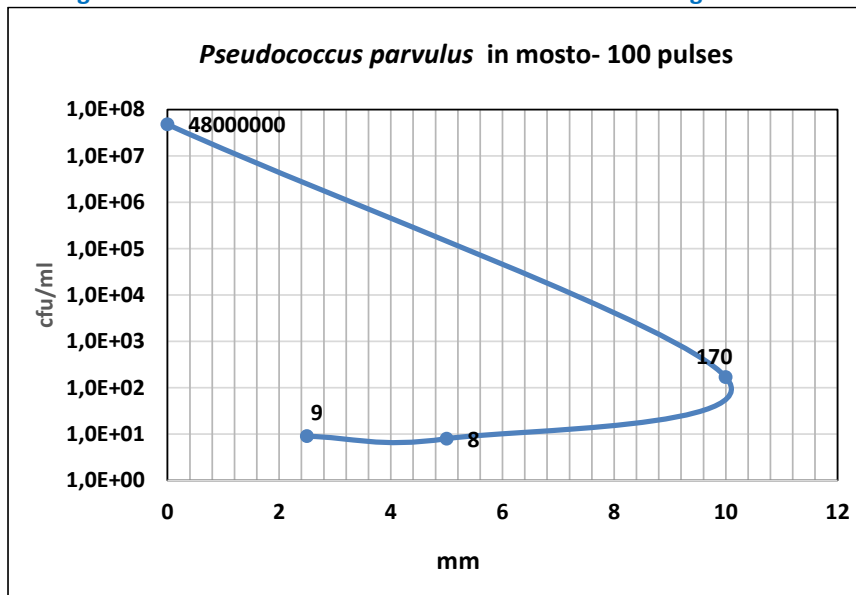


Figura 29 – Carica batterica in funzione della distanza tra gli elettrodi

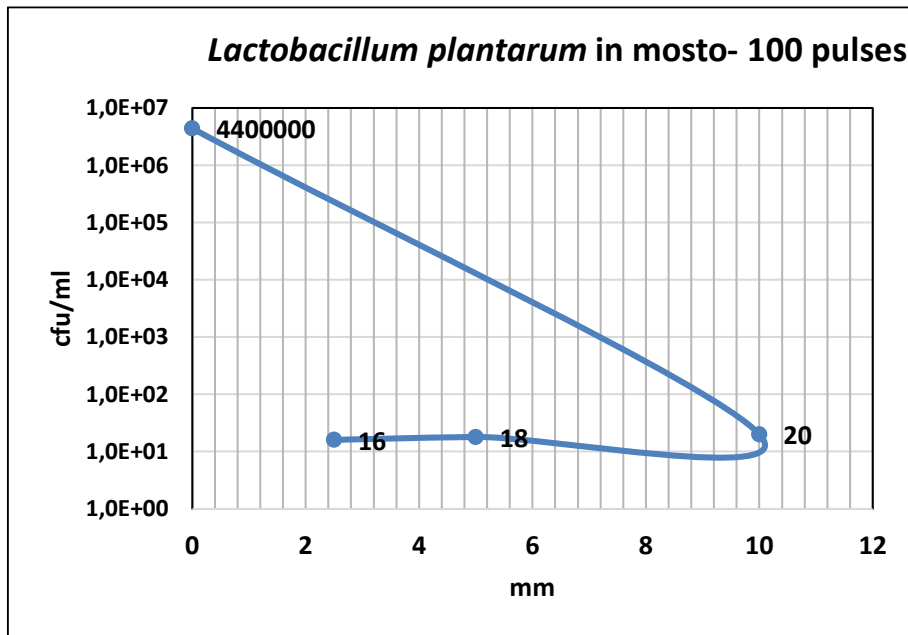


Figura 30 – Carica batterica in funzione della distanza tra gli elettrodi

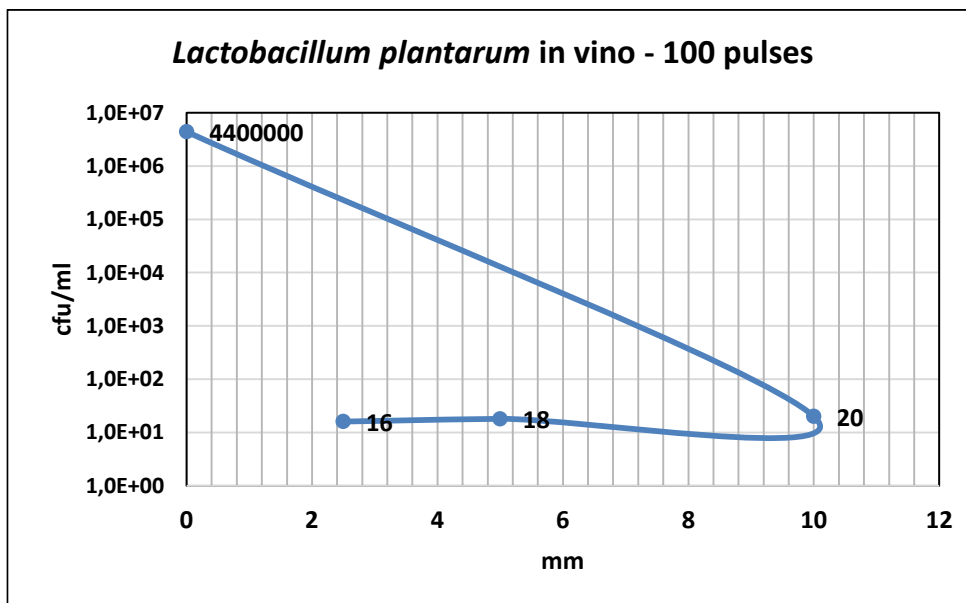


Figura 31 – Carica batterica in funzione della distanza tra gli elettrodi

Per quanto riguarda, la contaminazione del vino e del mosto con *escherichia coli*, si può affermare che il microrganismo non sopravvive in entrambi i liquidi a causa delle caratteristiche chimico-fisiche del mosto e del vino, mentre, mentre nel latte sopravvive e risulta molto resistente [4], [5]. Si conclude che, la totale inattivazione potrebbe ottenersi applicando i PEF insieme ad altri trattamenti, come osservato in altre applicazioni [2].

4 Risultati sperimentali

L'analisi microbiologica dopo l'applicazione dei PEF ha evidenziato l'efficacia del trattamento, infatti, in esse la carica batterica risulta drasticamente diminuita, come mostrano le foto nelle Figure 30-32 per diversi campioni trattati.

Nelle Figura 32 e 29 i riportano le foto relative a una fase sincronizzazione e sostituzione , che si è resa necessaria nelle prove finali.

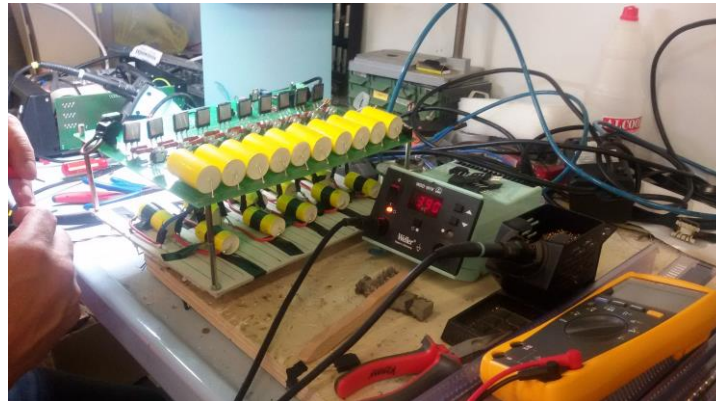


Figura 32 – Sistema di generazione dei PEF - prototipo

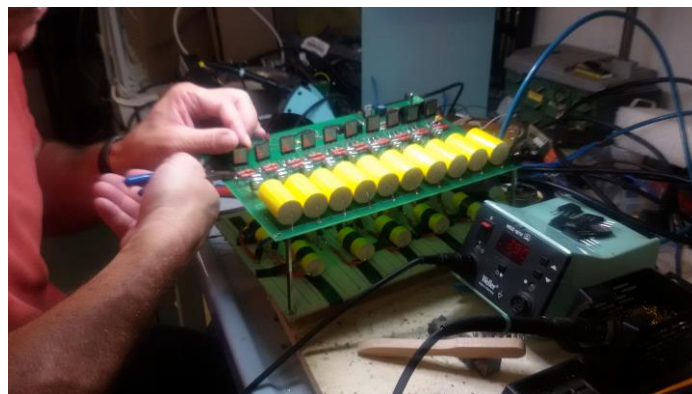


Figura 33 – Sostituzione e sincronizzazione di alcune schede

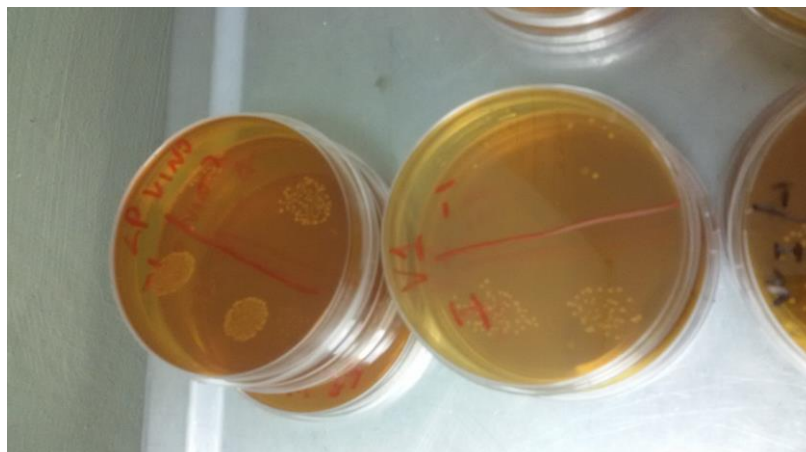


Figura 34 – Carica batterica LP dopo l'applicazione dei PEF



Figura 35 – Carica batterica - LP dopo l'applicazione dei PEF al vino

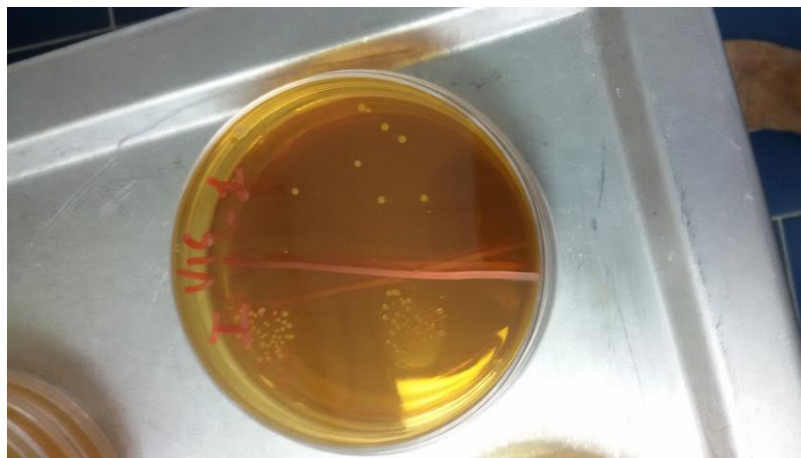


Figura 36 – Carica batterica dopo l'applicazione dei PEF al campione V16

Conclusioni

L'applicazione dei PEF risulta una tecnologia efficace per l'inattivazione dei microrganismi quali *Dekkera* / *Brettanomyces* e *Lactobacillus* nel mosto prima della fermentazione o nel vino dopo la fermentazione permettendo di evitare la contaminazione delle superfici a contatto e/o di controllare lo sviluppo di alterazioni in tutto il processo di invecchiamento in botte e nello stoccaggio in bottiglia.

Dai risultati dello studio, si constata l'effetto letale di PEF su diversi microrganismi (*Dekkera*/ *Brettanomyces* e *Lactobacillus*) trattati sia nel mosto e sia nel vino. Si evidenzia che i batteri dell'acido lattico sono più resistenti ai PEF del lievito, indipendentemente dal mezzo di trattamento.

Al termine della sperimentazione si conclude che il *D. bruxellensis* in mosto e *S. bayanus* nel vino sono stati i microrganismi più sensibili, mentre, il *D. anomala* il più resistente al trattamento con i PEF indipendentemente dal terreno.

Concordemente, ai risultati del *Delsart*, effettuando trattamenti che vanno da 396 kJ / kg a 22 kV / cm a 194 kJ / kg a 31 kV / cm si avrebbero almeno 3-log₁₀- riduzioni di qualsiasi microrganismo investigato, batteri e lievito. Si constata, che un trattamento di 186 kJ / kg a 29 kV / cm è sufficiente per ridurre il microrganismo di almeno 3 cicli log₁₀ sia nel mosto che nel vino.

Applicazioni future

Estrazioni dei polifenoli e taglio patatine.

Bibliografia

- [1] Microbiologia enologica (ottobre 2014). Giovanna Suzzi e Rosanna Tofalo.
- [2] Microrganismi della vite e del vino (dicembre 2015). Raffaele Guzzon e Ilaria Pertot.
- [3] Scienza del latte(maggio 2000). Charles Alais.
- [4] Bazhal, M. I., Ngadi, M. O., Raghavan, G. S. V. and Smith, J. P., 2006. "Inactivation of Escherichia coli 157: H7 in liquid whole egg using combined pulsed electric field and thermal treatments". LWT-Food Science and Technology, 39(4).
- [5] Martin-Belloso, O., Vega-Mercado, H., Qin, B.-L., Chang, F.-J., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 1997a. "Inactivation of Escherichia coli suspended in liquid egg using pulsed electric fields". J Food Process Preserv.