

#1. MICRORGANISMI E ALIMENTI.	1
#2. FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA E LA SOPRAVVIVENZA DEI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI.	2
2.1. Crescita microbica	2
2.2. Fattori intrinseci	4
2.2.1 presenza di nutrienti	4
2.2.2 pH e potere tampone	4
2.2.3 Potenziale Redox, Eh	6
2.2.4 Ostacoli antimicrobici	8
2.2.5 Attività dell'acqua (a_w)	9
2.3. Fattori estrinseci (ambiente)	10
2.3.1 Umidità relativa	10
2.3.2 Temperatura	11
2.3.3 Atmosfera gassosa	12
#3. LA CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI	13
3.1 Trattamenti termici	13
3.1.1 Pastorizzazione e sterilizzazione	14
3.1.2 Cinetica della distruzione dei microrganismi. Valori D e z.	15
3.1.3 Sensibilità dei microrganismi al calore	16
3.1.4 Descrizione del trattamento termico	16
3.1.6 Confezionamento in asepsi	18
3.2 Altri mezzi fisici	18
3.2.1 Irraggiamento	18
3.2.1.1 Onde elettromagnetiche	19
3.2.1.2 Microonde	19
3.2.1.3 Raggi UV	19
3.2.1.4 Radiazioni ionizzanti	20
3.2.2 Filtrazione	21
3.2.3 Centrifugazione	21
3.3 Basse temperature	21
3.3.1 Refrigerazione	22
3.3.2 Congelamento	24
3.4 Conservanti chimici	26
3.4.1 Acidi organici & esteri	27
3.4.2 Nitriti	27
3.5 Atmosfera modificata	27
3.5.1 Confezionamento sottovuoto	28
3.5.2 Confezionamento in atmosfera modificata	28
3.5.3 Conservazione in atmosfera controllata.	29
#4. MICROBIOLOGIA DELLE PRINCIPALI MATERIE PRIME.	30

4.1 Alterazione degli alimenti.	30
4.2 Latte	30
4.2.1 Composizione	30
4.2.2 Microflora del latte crudo	31
4.2.3 Trattamenti termici del latte.	35
4.2.4 Prodotti a base di latte	35
4.3 Carne	36
4.3.1 Struttura e composizione	36
4.3.2 Microbiologia	38
4.3.3 Alterazioni	39
4.3.4 Prodotti di trasformazione	42
4.4 Pesce	42
4.4.1 Microbiologia	42
4.4.2 Crostacei e molluschi	43
4.4.3 Alterazioni del pesce fresco	44
4.4.4 Prodotti di trasformazione	45
#5 MALATTIE ALIMENTARI	46
#6. BATTERI AGENTI DI MALATTIE ALIMENTARI.	47
6.1 <i>Aeromonas hydrophila</i>	47
6.2 <i>Brucella</i> spp.	47
6.3 <i>Bacillus cereus</i> e <i>Bacillus</i> spp.	47
6.4 <i>Campylobacter</i> spp.	47
6.5 <i>Clostridium botulinum</i>	47
6.6 <i>Clostridium perfringens</i>	47
6.7 <i>Escherichia coli</i> *	47
6.8 <i>Listeria monocytogenes</i>	47
6.9 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	47
6.10 <i>Salmonella</i> spp.*	47
6.11 <i>Shigella</i> spp.	47
6.12 <i>Staphylococcus aureus</i> *	47
6.13 <i>Vibrio</i> spp.	47
6.14 <i>Yersinia enterocolitica</i>	47
#7. AGENTI NON BATTERICI CAUSA DI MALATTIE ALIMENTARI.	48

7.1 Elminti e nematodi	48
7.2 Protozoi	48
7.2.1 <i>Giardia lamblia</i>	48
7.2.2 <i>Entamoeba histolytica</i>	48
7.2.3 Sporozoea - Coccidia	48
7.2.4 Tossine algali (dinoflagellate, cianobatteri, diatomee)	48
7.2.5 Micotossine (<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Fusarium</i>)	48
7.3 Virus	48
7.4 Encefalopatie spongiformi	48

#1. MICRORGANISMI E ALIMENTI.

Gli alimenti di cui ci nutriamo non sono sterili e la composizione microbica dipende da:

1. tipi di microrganismi che vengono a contatto con l'alimento;
2. capacità degli stessi di
 - a. crescere
 - b. sopravvivere
 - c. interagire con l'alimento.

I microrganismi presenti possono derivare sia dalla microflora naturale dell'alimento non trattato o pervenire all'alimento nel corso dei processi di macellazione, trasformazione, conservazione, trasporto e distribuzione.

L'equilibrio tra i vari tipi di batteri è influenzato da:

1. proprietà dell'alimento,
2. condizioni di conservazione ,
3. caratteristiche dei batteri stessi,
4. effetto dei processi di trasformazione

In molti casi la microflora non ha alcun effetto evidente. In alcune circostanze tuttavia, i microrganismi manifestano la loro presenza:

1. possono causare malattie alimentari¹,
2. possono causare alterazione,
3. possono trasformare positivamente le caratteristiche dell'alimento.

¹ confronta Appendice I.

#2. FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA E LA SOPRAVVIVENZA DEI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI.²

2.1. Crescita microbica

La crescita microbica è un processo auto catalitico: 1) non vi è crescita batterica senza che almeno una cellula vitale sia presente e 2) il tasso di crescita aumenta con l'aumentare della "biomassa" vitale presente. Le cellule batteriche si dividono per fissione producendo due cellule figlie, dopo una successiva divisione saranno presenti 4 cellule, dopo un'altra 8, e così via. In questa maniera sia il tasso di crescita che il numero totale di cellule raddoppia dopo ogni divisione. Una formula generale per indicare il tempo di riproduzione (G) nel caso di organismi che si moltiplicano per fissione binaria è la seguente:

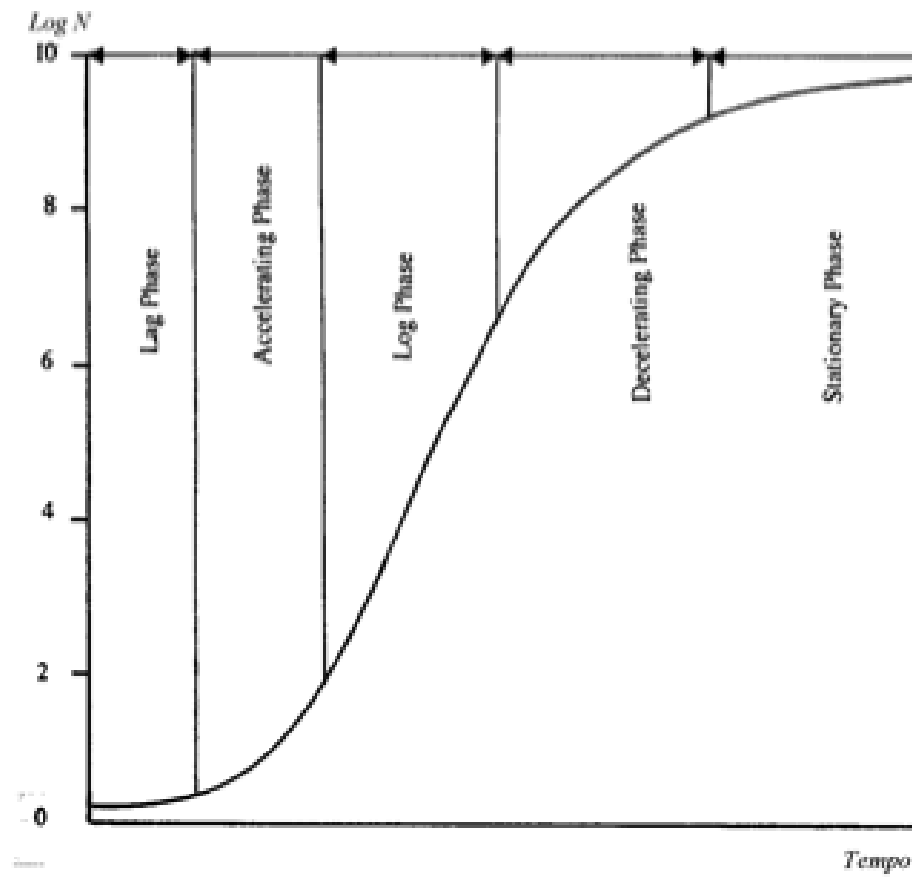
$$G = t \log_2 / \log N - \log N_0$$

dove N_0 : cellule al tempo 0,

N: cellule dopo il tempo t

Tuttavia nella realtà la crescita esponenziale ha luogo soltanto per un limitato lasso di tempo (fase di crescita esponenziale). Si individuano 5 fasi: di ritardo (o di latenza), di accelerazione, esponenziale o logaritmica), di decelerazione e stazionaria (Figura da "Adams & Moss").

² confronta anche Appendice II.



Nella prima fase non c'è apparente crescita mentre l'inoculo si adatta al nuovo ambiente, vengono sintetizzati gli enzimi necessari e riparati i danni indotti da noxa precedenti (per es.: congelamento, disidratazione, riscaldamento). La fase logaritmica (o di crescita esponenziale) è caratterizzata da un aumento di cellule che segue la semplice formula generale (2, 4, 8, 16, 32, 64, e così via). L'inclinazione della curva è quella tipica del microrganismo in esame e dipende da numerosi fattori (intrinseci ed estrinseci, vedi di seguito). Infine, modifiche nel mestruo indotte dallo sviluppo esponenziale, portano questa fase a interrompersi allorché nutrienti chiave sono esauriti e metaboliti con attività inibenti lo sviluppo si sono accumulati: la coltura passa nella fase stazionaria.

2.2. Fattori intrinseci

2.2.1 presenza di nutrienti

Come noi i batteri possono usare gli alimenti con fonte di nutrienti e di energia. Da essi i batteri ottengono 1) gli elementi che costituiscono la 'biomassa' batterica, 2) le molecole essenziali per la crescita e che essi non sanno sintetizzare e 3) un substrato usato come fonte energetica. L'ampio uso di prodotti derivati dagli alimenti quali estratti di carne (peptone e triptone), succo di pomodoro, estratto di malto, zuccheri, amido nei terreni di coltura è un testimonianza della loro idoneità a tale scopo (cfr. esercitazione n. 1, i terreni di coltura). L'incapacità di un microrganismo a utilizzare un determinato componente di un alimento ne limita lo sviluppo e lo pone in una situazione di competizione svantaggiosa nei confronti di batteri che lo possono utilizzare. Per esempio la capacità di sintetizzare enzimi amilolitici (per la degradazione dell'amido) favorisce la crescita di un microrganismo sui cereali. La concentrazione di componenti essenziali può influire sulla crescita batterica. L'equazione di Monod (matematicamente analoga all'equazione di Michaelis-Menten per gli enzimi) mette in relazione la crescita batterica con la concentrazione di un nutriente c.d. "limitante".

The expression is:

$$\mu = \hat{\mu} \frac{S}{K_S + S}$$

where S = concentration of
limiting nutrient

μ = specific growth rate coeff

$\hat{\mu}$ = max. sp. gr. rate

K_S = half satn. coeff.

Dove: μ è il ritmo di crescita attuale, $\hat{\mu}$ è il ritmo massimo di crescita, S è la concentrazione del nutriente limitante e K_S una costante di saturazione.

Quando $S \gg K_S$ il ritmo di crescita è prossimo al massimo, ma se S cala a valori vicini a K_S il ritmo rallenta. Valori di K_S sono stati misurati sperimentalmente per alcuni batteri e nutrienti. Essi di solito sono molto bassi (10^{-5} M per le fonti di carbonio e di energia): questo spiega come la scarsa disponibilità di un nutriente non sia fondamentale nel limitare lo sviluppo microbico.

2.2.2 pH e potere tampone

Giova ricordare soltanto che poiché il pH è una scala logaritmica a differenze di 1, 2, 3 unità corrispondono differenze nella concentrazione idrogenionica di 10, 100, 1000.

I batteri si sviluppano in ambienti con pH tra 4,5 e 9, con un optimum fra 6,5 e 7,5.

	minimo	ottimale	massimo
batteri (in generale)	4,5	6,5-7,5	11
batteri lattici	3,2	5,5-6,5	10,5
enterobatteri	5,6	6,5-7,5	9,0
<i>S. typhi</i>	4,0-4,5	6,5-7,2	8,0-9,6
<i>E. coli</i>	4,3	6,0-8,0	9,0

<i>Staphylococcus spp.</i>	4,2	6,8-7,5	9,3
<i>Clostridium perfringens</i>	5,5	6,0-7,6	8,5
<i>Bacillus spp.</i>	5,0-6,0	6,8-7,5	9,4-10

(da Bourgeois, Mescle, Zucca, Microbiologia alimentare, tecniche nuove)

Certi acidi organici agiscono come batteriostatici indipendentemente dal pH che determinano in soluzione. Ciò è molto utile nel caso vengano utilizzati per aumentare la conservabilità degli alimenti (al momento la legislazione non lo consente): valori di pH troppo bassi alterano le caratteristiche organolettiche dell'alimento

Il pesce, generalmente, subisce alterazioni batteriche più in fretta della carne a temperature di refrigerazione: il pH dei muscoli di mammiferi dopo il rigor è circa 5,6, mentre quello dei pesci è 6,2.

2.2.3 Potenziale Redox, Eh

Una reazione di ossidoriduzione (*redox*) è il risultato di trasferimento di elettroni tra atomi e molecole.

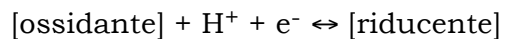
Ossidazione: perdita di elettroni.

Aumento carica positiva, diminuzione carica negativa

Riduzione: acquisto di elettroni.

Diminuzione carica positiva, aumento carica negativa

Ossidoriduzione: si individua una specie *ossidante* (che si riduce per acquisto di elettroni) e una specie *riducente* (che si ossida cedendo elettroni). Trasferimento di elettroni da riducente a ossidante.



La tendenza di un atomo o una molecola ad **accettare** o *cedere* elettroni (**ridursi/ossidare** o *ossidarsi/ridurre*, rispettivamente) si chiama *potenziale di ossidoriduzione* (potenziale redox, E_h). Valori redox alti e positivi indicano che la specie ossidata è un forte agente ossidante e quella ridotta è un debole riducente; grandi valori negativi indicano il contrario.

Alcune coppie redox presenti negli alimenti e il potenziale redox standard.

<i>coppie</i>	<i>mV</i>
$1/2 O_2/H_2O$	+820
Fe^{3+}/Fe^{2+}	+760
Citocromo C ox/red	+250
Acido deidroascorbico/ac. ascorbico	+80
Blu di metilene ox/red	+11
Piruvato/lattato	-190
$NAD^+/NADH$	-320

Se la specie ossidante è presente in maggior quantità rispetto a quella riducente il potenziale redox aumenta e con esso aumenta la capacità ossidante del mezzo. Il potenziale redox di un mezzo (o di un alimento) si misura verso un sistema esterno di referenza. Di solito è un elettrodo di platino che viene immerso nel mezzo. Se il bilancio delle varie coppie redox presenti è a favore delle specie ossidate il mezzo accetterà elettroni dall'elettrodo creando un potenziale positivo (cioè: ambiente ossidante). Se il bilancio è invertito il campione tenderà a cedere elettroni all'elettrodo che registrerà un potenziale negativo (cioè: ambiente riducente). Il potenziale redox che si misura in una alimento è il risultato di: coppie redox presenti, rapporto specie ossidanti/riducenti, pH ($>pH \rightarrow <E_h$), disponibilità di ossigeno ($>O_2 \rightarrow >E_h$), attività batterica (sviluppo $\rightarrow <O_2 \rightarrow <E_h$), capacità di bilanciamento dell'alimento (concetto analogo al potere tampone nei confronti del pH).

Potenziale redox di alcuni alimenti

	E_h (mV)	<i>pH</i>
Carne cruda (post rigor)	-200	5,7
Carne cruda tritata	+225	5,9
Spinaci	+74	6,2
Limone	+383	2,2

L'ossigeno è presente nell'aria in ragione del 21% ed è un forte ossidante. In presenza di aria il potenziale redox è alto e la maggior parte delle altre coppie presenti saranno nello stato ossidato. E' evidente che il fattore intrinseco "potenziale redox" è legato al fattore estrinseco "atmosfera gassosa" cioè all'atmosfera di conservazione dell'alimento.

Triturazione \rightarrow aumento di aria $\rightarrow >E_h$.

Confezionamento sottovuoto \rightarrow diminuzione di aria $\rightarrow <E_h$.

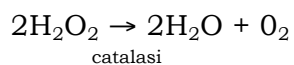
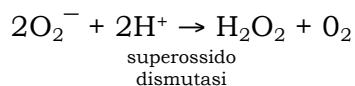
La crescita microbica in un alimento riduce il valore E_h , per l'utilizzo di ossigeno e la produzione di composti riducenti quali l'idrogeno. La diminuzione di E_h come risultato dello sviluppo microbico è la base di alcuni test rapidi. Ad esempio il blu di metilene è utilizzato per valutare il numero di cellule di lieviti vive nella produzione di birra. Infatti al microscopio, dopo colorazione di una sospensione di lieviti, le cellule vitali e con citoplasma riducente appariranno incolori, mentre quelle non vitali, incapaci di ridurre il colorante, blu.

Il potenziale redox ha un effetto importante sullo sviluppo batterico negli alimenti.

- *Aerobi obbligati*: crescono solo in presenza di aria. Metabolismo respiratorio, producono energia dalla fosforilazione ossidativa utilizzando ossigeno come accettore finale di elettroni. Necessitano di ossigeno e di alti valori di E_h . Essi moltiplicano sulle superfici esposte all'aria.

- *Aerobi-anaerobi facoltativi*: crescono sia in presenza che in assenza di ossigeno libero. Molti di essi sono anaerobi aero tolleranti, quali i batteri lattici. Essi producono energia dalla fermentazione e pur non disponendo di catalasi e di superossido dismutasi (cfr. più sotto) sono dotati di un meccanismo di distruzione dei superossidi basato sull'accumulo di concentrazioni millimolari di manganese capace di neutralizzare i superossidi.

- *Anaerobi obbligati*: crescono solo in assenza di ossigeno e con bassi valori di E_h . Il metabolismo anaerobio consente minori produzioni di energia e pertanto un ambiente riducente (che minimizza le perdite di potere riducente delle cellule) è preferito. L'ossigeno influenza il potenziale redox ma esercita anche un effetto tossico diretto sulle cellule. A titolo di esempio: *Clostridium acetobutylicum* sviluppa con E_h di +370mV in assenza di ossigeno, ma non sopravvive in presenza di ossigeno neanche a valori di E_h inferiori a +110mV. Questi batteri sono incapaci di distruggere i prodotti tossici dell'ossigeno molecolare (acqua ossigenata, anione superossido) mancando di enzimi quali la catalasi e la superossido dismutasi che catalizzano la distruzione di questi composti. Tra gli anaerobi obbligati vi sono i clostridi (botulismo).



In pratica si definiscono *anaerobi obbligati* tutti i batteri che non crescono sulla superficie di terreni di coltura incubati in presenza di aria (20-21% in peso di O_2) o in presenza di aria addizionata del 10% di CO_2 (18% di O_2). Si dicono *microaerofili* i batteri che non crescono o crescono in maniera stentata in presenza di aria, mentre crescono molto bene in aria addizionata del 10% di CO_2 .

2.2.4 Ostacoli antimicrobici

Tutti gli alimenti derivano da organismi viventi che, come tali, nel corso dell'evoluzione sono stati dotati di mezzi per prevenire o limitare dannose infezioni microbiche.

i) tegumento: barriera fisica alle infezioni - pelle, conchiglia, guscio, baccello, corteccia, buccia. Generalmente è composto da macromolecole resistenti alla degradazione e costituisce un ambiente inospitale per i

microrganismi per la bassa a_w , la carenza di nutrienti prontamente disponibili, e la presenza di sostanze antimicrobiche (quali gli acidi grassi a corta catena sulla pelle degli animali, o gli oli essenziali sulla superficie delle piante).

ii) presenza di sostanze antimicrobiche nei tessuti. La loro concentrazione può aumentare in risposta a danni fisici. Nelle piante, in seguito a danneggiamenti superficiali, possono liberarsi oli essenziali. Vi sono anche componenti con proprietà antibatteriche nelle piante utilizzate come spezie o condimenti. Questi ingredienti possono contribuire ad aumentare la stabilità microbiologica degli alimenti in cui sono utilizzati anche se altre volte le spezie rappresentano una fonte di contaminazione. Tra gli alimenti di origine animale va ricordato l'albume dell'uovo che contiene numerose sostanze antimicrobiche. Il lisozima è attivo nei confronti dei Gram positivi e agisce catalizzando l'idrolisi dei legami glicosidici nel peptidoglicano. Altri componenti limitano la crescita microbica riducendo la disponibilità di nutrienti: per esempio l'ovotransferrina che lega il ferro, o l'avidina che sequestra la biotina e la riboflavina. Il latte possiede sia il lisozima che un composto analogo all'ovotransferrina: la lattoferrina. Nel latte è inoltre presente l'enzima lattoperossidasi che catalizza l'ossidazione del tiocianato (in presenza di acqua ossigenata) a ipotiocianato attivo sui Gram negativi.

2.2.5 Attività dell'acqua (a_w)

La vita, come noi la conosciamo, dipende assolutamente dall'acqua allo stato liquido. Tutti gli alimenti di origine animale hanno un contenuto in acqua sufficiente per lo sviluppo di tutti i microrganismi. L'umidità di un alimento si calcola con la formula:

$$U = \frac{a-b}{a} \cdot 100$$

dove a: peso del campione fresco
b: peso del campione dopo essiccamento

Il contenuto di acqua tuttavia, non dà alcuna indicazione sulla disponibilità della stessa (cioè della cosiddetta attività dell'acqua). Dal punto di vista microbiologico, piuttosto che la concentrazione dell'acqua, è importante il suo stato fisico. Infatti solo l'acqua non legata ad altre molecole, cioè l'acqua libera, è disponibile per il metabolismo batterico. Un parametro utile a capire i movimenti di acqua dall'ambiente al citoplasma e viceversa è l'attività dell'acqua, a_w . L'attività dell'acqua di un substrato è definita come il rapporto fra la tensione di vapore della soluzione (P) e la tensione di vapore dell'acqua pura (P_0) alla stessa temperatura e alla stessa pressione ambientale.

$$a_w = P/P_0$$

Questo rapporto indica ugualmente il numero delle molecole di acqua presenti nel prodotto diviso per la somma delle molecole d'acqua e delle molecole disciolte (solute).

$$a_w = n_2 / (n_1 + n_2)$$

dove: n_1 = numero di molecole di soluto
 n_2 = numero di molecole di solvente

Un parametro legato all'attività dell'acqua è la pressione osmotica, che può essere definita come la forza per unità di superficie necessaria a interrompere il passaggio di molecole di acqua da una zona a alta a_w a una con bassa a_w . Il citoplasma è una soluzione acquosa e deve avere una a_w inferiore a quella dell'acqua pura: il risultato è un passaggio di molecole di acqua nel citoplasma. Se il germe non tollera questo passaggio esso aumenta di volume fino a scoppiare. Batteri, funghi e alghe hanno una parete rigida in grado di sopportare la pressione osmotica del citoplasma: fino a 30 atm nei Gram positivi, non superiore a 5 atm nei Gram negativi. Nei protozoi i vacuoli contrattili hanno la funzione di eliminare l'acqua attivamente. Se nell'ambiente circostante il germe l' a_w diminuisce o la pressione osmotica aumenta, è necessario che nel citoplasma l' a_w sia comunque inferiore e la pressione osmotica superiore. A tale scopo i batteri producono soluti che non interferiscono con le funzioni del citoplasma. Al diminuire dell' a_w il numero di batteri capaci di moltiplicare si riduce. Per ogni specie microbica si possono identificare i valori di a_w minimi per lo sviluppo. Alcuni esempi:

<i>gruppo</i>	<i>a_w</i>
Gram negativi	0,97
Gram positivi	0,90
<i>S. aureus</i>	0,86
Lieviti	0,88
Funghi filamen.	0,80
batteri alofili	0,75
funghi xerofili	0,61

batteri alotolleranti: capaci di crescere in presenza di alte concentrazioni saline. Alcuni batteri, per es. *Halobacterium* spp. o *Halococcus* spp. sono alofili obbligati in quanto non possono sviluppare in assenza di alte concentrazioni di sale.

batteri osmotolleranti: capaci di crescere in presenza di alte concentrazioni di composti organici non ionizzati, quali zuccheri;

batteri xerotolleranti: capaci di crescere su cibi secchi.

2.3. Fattori estrinseci (ambiente)

2.3.1 Umidità relativa

In un ambiente chiuso, l'umidità relativa (UR), parametro atmosferico, è legata alla a_w di un prodotto secondo la relazione:

$$a_w = UR/100$$

L'umidità relativa è pertanto una misura dell'attività dell'acqua della fase gassosa. Quando alimenti con bassa a_w sono conservati in ambienti con elevata UR, l'acqua passerà dalla fase gassosa all'alimento.

2.3.2 Temperatura

Tutti gli alimenti conservati a temperature comprese tra **-18°C** e **+70°C** sono soggetti alla comparsa di fenomeni alterativi. La crescita microbica può avvenire a temperature comprese tra -8°C e +100°C alla pressione atmosferica³.

La *temperatura ottimale di crescita* è quella alla quale i batteri sviluppano e quindi metabolizzano più rapidamente. Per ogni specie microbica si identificano la temperatura minima, ottimale e massima di sviluppo. E' una convenzione comoda ma arbitraria, infatti la distribuzione dei microrganismi lungo la curva delle temperature è continua.

gruppo	Temperatura (°C)		
	minima	ottimale⁴	massima
<i>termofili*</i>	25-45	50-80	60-85
termotrofi	10	42-46	c. 50
mesofili	5-10	30-37	c. 45
psicrotrofi (psicrofili facoltativi)	-5	20-30	35-40
psicrofili (obbligati)	-10	10-15	18-20

* non presenti su alimenti.
(da Mossel et al., 1995)

I batteri non hanno meccanismi di termoregolazione e si trovano alla temperatura dell'ambiente.

Perché termotrofi?

Come è possibile un normale metabolismo a temperature alle quali la maggior parte delle proteine sono denaturate? 1) è possibile che le proteine e le macromolecole importanti siano più stabili alle alte temperature rispetto a quelle dei batteri mesofili o che 2) vi siano meccanismi di termoprotezione all'interno della cellula. Alternativamente 3) è possibile che le proteine siano

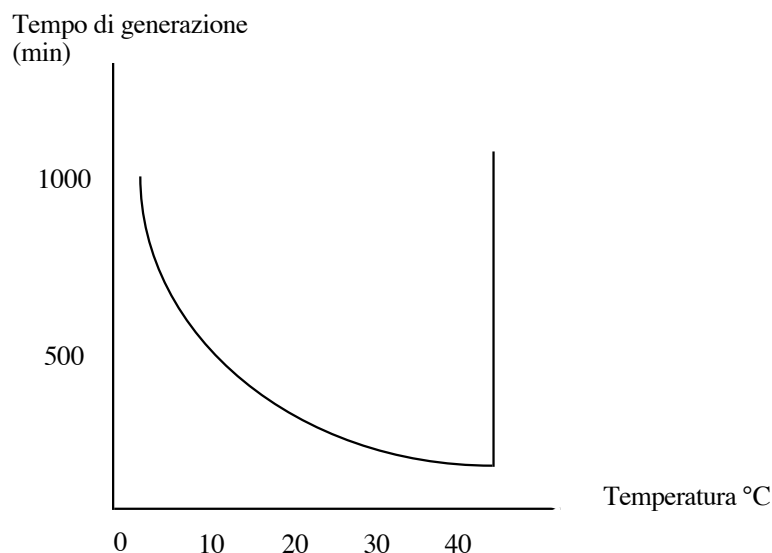
³il punto di ebollizione dell'acqua aumenta con l'aumentare della pressione idrostatica e in natura esistono altissime pressioni in alcuni fondali marini. In queste circostanze la temperatura dell'acqua allo stato liquido (non gassoso) può essere superiore a 100°C. Esplorazioni di vulcani marini hanno rivelato la esistenza di batteri che possono crescere a tali temperature.

⁴per certi batteri massima velocità di moltiplicazione e massima attività metabolica non corrispondono. Tuttavia, per convenzione, la temperatura ottimale di sviluppo è quella alla quale i tempi di duplicazione sono più brevi.

denaturate allo stesso modo, ma che nei batteri termotrofi esistano meccanismi di riparazione molto rapidi ed efficienti. L'evidenza sperimentale favorisce l'ipotesi sia di una maggiore termoresistenza intrinseca di proteine e macromolecole che dei ribosomi. Per esempio la malonato-deidrogenasi dei Gram positivi bastoncellari sporigeni termotrofi è stabile a 65°C per 120'.

Perché psicrotrofi?

Minore stabilità della struttura terziaria di alcune proteine enzimatiche a temperature maggiori a 30°C (minore resistenza alle forze dispersive dell'agitazione termica che aumentano con il crescere della temperatura). Inoltre i lipidi della membrana contengono un'alta percentuale di acidi grassi insaturi. Tale situazione conferisce un basso punto di solidificazione (che consente il permanere delle caratteristiche alle basse temperature) e, al contempo, un altrettanto basso punto di fusione (che conferisce una grande termolabilità).



Evoluzione del tempo di generazione in funzione della temperatura di incubazione in *Escherichia coli*.

2.3.3 Atmosfera gassosa

L'ossigeno rappresenta il 21% dell'atmosfera terrestre. cfr. paragrafo 2.2.3. Tra gli altri gas va menzionata l'anidride carbonica (CO₂) in quanto utilizzata nel confezionamento in atmosfera modificata. I batteri più sensibili si trovano tra i Gram negativi. L'inibizione è più efficace in condizioni di anaerobiosi e alle basse temperature (quando CO₂ è più solubile). Il meccanismo d'azione: i) CO₂ determina abbassamento del pH (acido carbonico dissociato in anione bicarbonato e H⁺); ii) penetra nelle cellule e acidifica il citoplasma (comportandosi come un debole acido organico); iii) altera le proprietà fisiche della membrana citoplasmatica alterando il meccanismo di trasporto dei soluti.

#3. LA CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI

La manipolazione dei fattori che influenzano lo sviluppo batterico è la base della conservazione degli alimenti. Poiché lo scopo principale di questo paragrafo è l'effetto dei trattamenti sui microrganismi, gli aspetti tecnologici saranno solamente accennati.

3.1 Trattamenti termici

Il vantaggio dell'impiego del calore deriva dal fatto che l'aumento della temperatura determina massimamente una riduzione della carica batterica, piuttosto che un aumento della denaturazione dei principi nutritivi. E' questo il vantaggio dei trattamenti termici "HTST" (high temperature-short time): il medesimo effetto sulla distruzione batterica viene ottenuto con coppie tempo/temperatura alle quali le qualità sensoriali non vengono alterate. Il rovescio della medaglia è rappresentato dall'attività residua di alcuni enzimi responsabili di fatti alterativi, dopo che le cellule batteriche sono state inattivate.

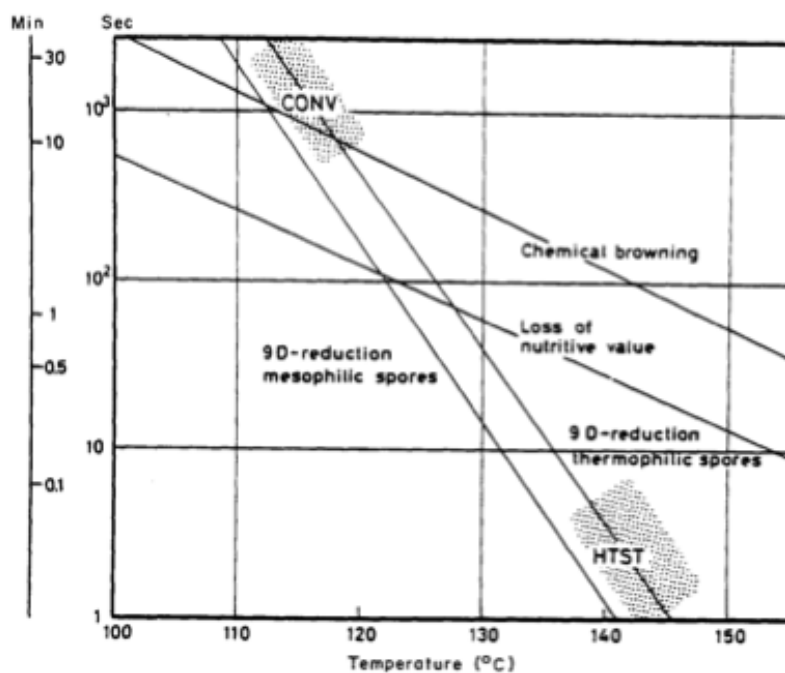


FIGURE 6.8. Spore lethality, loss of nutrients and discoloration of foods as affected by conventional versus HTST processing. (Source: Mossel, 1975b.)

<i>Trattamento termico</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Scopo</i>
Cottura al forno bollitura frittura arrostimento	≤ 100°C	Aumento digeribilità Miglioramento sapore Distruzione patogeni
Essiccamento	< 100°C	Rimozione di acqua per aumentare la conservabilità
Pastorizzazione	60-80°C	Eliminazione mirata di patogeni e di germi alteranti
Appertizzazione	> 100°C	Eliminazione dei microrganismi per raggiungere la c.d. 'sterilità commerciale'.

3.1.1 Pastorizzazione e sterilizzazione

Pastorizzazione (o *pasteurizzazione*): definita come un trattamento termico in grado di 1) eliminare i batteri patogeni non sporigeni e 2) consentire una significativa riduzione⁵ della carica batterica totale dei batteri non sporigeni responsabili di alterazione. Termine altresì utilizzato per designare trattamenti termici nell'intervallo 60-80°C, per tempi da alcuni secondi fino ad alcuni minuti.

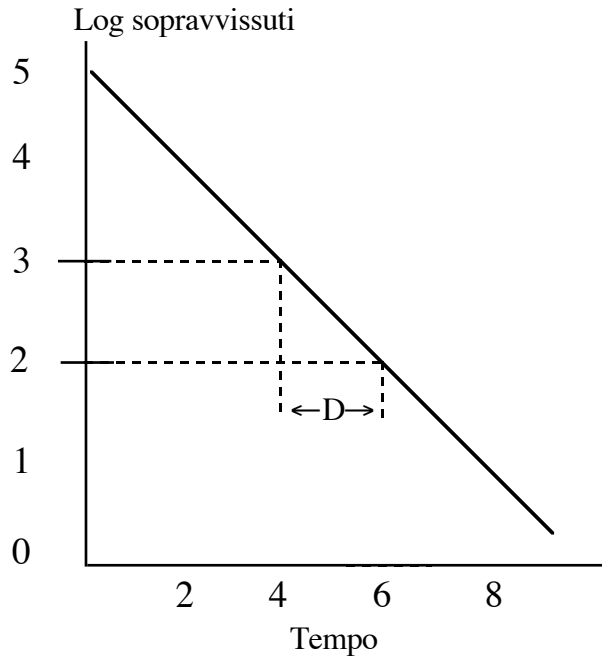
Sterilizzazione: quando un trattamento termico di sufficiente intensità è applicato in associazione al confezionamento ermetico, l'alimento diventa stabile e la durata non è più in rapporto alle caratteristiche intrinseche dello stesso. Ciò significa che questi alimenti, non necessariamente sterili, non subiranno alterazioni né diventeranno pericolosi per il consumatore anche se conservati per anni a temperature inferiori a 40°C⁶.

⁵ E' evidente la necessità di pervenire a una definizione precisa nelle varie situazioni pratiche. In generale la pastorizzazione consente una riduzione di 7-12 cicli logaritmici dei batteri non sporigeni. L'esatta quantificazione della riduzione necessaria va calcolata sulla base di analisi della valutazione del rischio che determinati batteri sopravvivano.

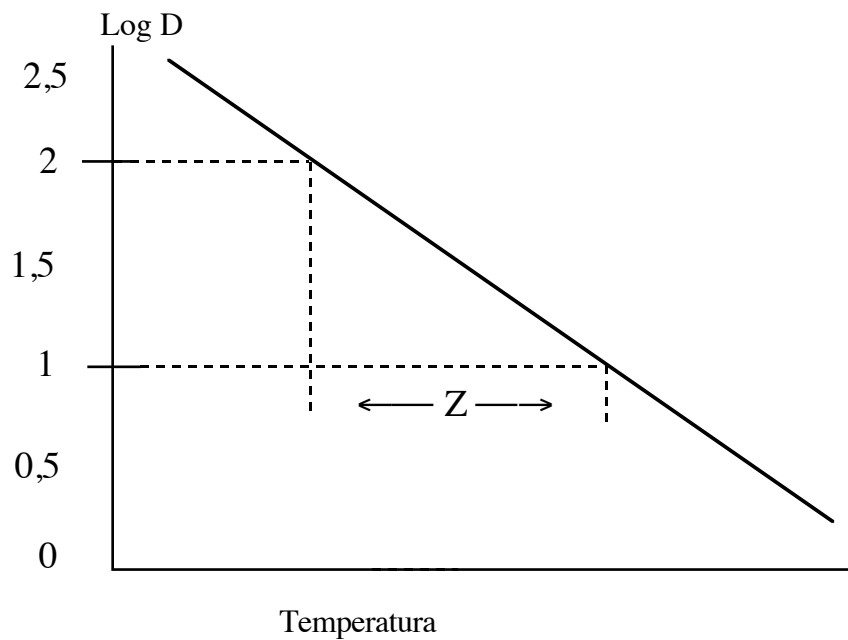
⁶ Questo tipo di trattamento termico è spesso definito *appertizzazione*, da Appert che ne perfezionò l'utilizzo intorno all'anno 1800. Dal punto di vista semantico, questo termine è da preferire a "sterilità commerciale" (evidentemente il termine "sterile" non può essere utilizzato).

3.1.2 Cinetica della distruzione dei microrganismi.
Valori D e z.

Il valore D.



Il valore z.



3.1.3 Sensibilità dei microrganismi al calore

In generale i batteri psicotrofi sono meno resistenti dei mesofili che lo sono meno dei termotrofi. I Gram negativi sono meno resistenti dei Gram positivi. Poiché la maggior parte delle forme vegetative dei batteri sono uccise istantaneamente a 100°C i valori D sono misurati ed espressi a temperature di pastorizzazione (Figura da Adams & Moss).

Table 4.3 *Microbial heat resistance*

<i>Vegetative organisms</i> ($z \sim 5^\circ\text{C}$)	<i>D (mins)</i>
<i>Salmonella</i> sp.	D ₆₅ 0.02–0.25
<i>Salmonella senftenberg</i>	D ₆₅ 0.8–1.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	D ₆₅ 0.2–2.0
<i>Escherichia coli</i>	D ₆₅ 0.1
Yeasts and moulds	D ₆₅ 0.5–3.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	D ₆₀ 5.0–8.3
<i>Campylobacter jejuni</i>	D ₅₅ 1.1
Bacterial Endospores ($z \sim 10^\circ\text{C}$)	D ₁₂₁
<i>B. stearothermophilus</i>	4–5
<i>C. thermosaccharolyticum</i>	3–4
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	2–3
<i>B. coagulans</i>	0.1
<i>C. botulinum</i> types A & B	0.1–0.2
<i>C. sporogenes</i>	0.1–1.5
<i>C. botulinum</i> type E	D ₈₀ 0.1–3.0 D ₁₁₀ < 1 second

- Spore batteriche sono più resistenti delle forme vegetative per il basso contenuto di acqua nel citoplasma. Maggiore il contenuto di acqua, minore la resistenza.
- Fase stazionaria: cellule più resistenti che in fase esponenziale di crescita.
- Maggiore sensibilità se il pH è maggiore di 8 o minore di 6.
- La presenza di grasso aumenta la resistenza.
- Bassa aw aumenta la resistenza (ricordare: la aw diminuisce anche in presenza di alte concentrazioni di zuccheri).
- Prodotti grassi e dolci (per es. gelati, bevande dolci) richiedono trattamenti di pastorizzazione più intensi.

3.1.4 Descrizione del trattamento termico

I trattamenti termici non sono né uniformi né istantanei. Per poter valutare l'effetto di differenti trattamenti è necessaria una unità di misura. Per l'appertizzazione viene utilizzato il valore F che esprime l'effetto letale in minuti a una data temperatura. Per esempio un trattamento con $F_{121}=4$ corrisponde a un riscaldamento istantaneo a 121°C, al mantenimento di questa temperatura per 4 minuti e al

raffreddamento istantaneo. Ciò non implica necessariamente che il prodotto ha raggiunto i 121°C.

*Esempio per le spore e prodotti in scatola con $pH > 4,5$ (*Clostridium botulinum*).*

Per le spore $z=10$ e F_{121} determinato con questo valore viene indicato come F_0 . Per determinare il valore F_0 necessario in un determinato trattamento è necessario conoscere il valore D_{121} del microrganismo e il numero di riduzioni decimali necessarie⁷.

$$F = D_{121}(\log N_0 - \log N)$$

Concetto comunemente accettato è che i trattamenti termici applicati a prodotti in scatola producano perlomeno 12 riduzioni decimali al numero di spore di *Cl. botulinum* ($\log N_0 - \log N = 12$). Tale valore è noto come 12D o "botulinum cook".

Applicando $D_{121}=0,2$ (vedi tabella sopra) il trattamento termico avrà un $F_0 = 0,2 \times 12 = 2,4$ minuti. Considerazione pratica è che a un tale trattamento, nel caso che ogni scatoletta contenga una spora di *Cl. botulinum* ($N_0 = 1$), sopravviverà una spora ogni 1000 miliardi di scatolette.

Nella decisione del tipo di trattamento termico da adottare, tre sono i quesiti fondamentali:

- 1) costo di eventuali alterazioni;
- 2) costo del trattamento supplementare necessario a ridurre le alterazioni;
- 3) quale diminuzione della qualità può derivare dal trattamento supplementare.

Si considera accettabile un tasso di alterazione, dovuto a trattamenti insufficienti, di una scatoletta ogni milione. Ciò può essere ottenuto attraverso un 5 riduzioni decimali nel numero di spore con potenziale effetto alterante.

Clostridium sporogenes (un suo particolare stipite: PA3679) viene utilizzato come indicatore. Ha un valore $D_{121} \cong 1$ minuto.

Pertanto:

$$F_0 = 1 \times 5 = 5;$$

Applicando $F_0 = 5$ alla formula:

$$F = D_{121}(\log N_0 - \log N)$$

nel caso di *Cl. botulinum* ($D_{121} = 0,2$), si ottiene:

$$5 = 0,2 (\log N_0 - \log N), \text{ da cui}$$

$$\log N_0 - \log N = 5/0,2 = 25.$$

Cioè un trattamento in grado di produrre un riduzione nel numero delle spore di *Cl. botulinum* di ben 25 riduzioni decimali, ampiamente in eccesso rispetto al "botulinum cook" di 12.

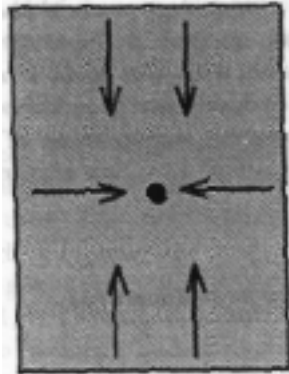
Alcuni F_0 di alimenti in scatola.

⁷nel caso della pastorizzazione la temperatura di riferimento è 60°C. Pertanto $P_{60} = D_{60}(\log N_0 - \log N)$.

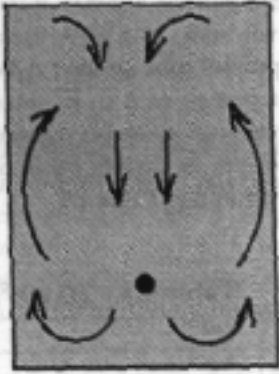
Alimento	F0
Sugo con fagioli	2-4
Piselli	4-6
Sugo di carne	8-10
Sardine	3-4

Stabilito il valore F è necessario sapere se il valore applicato avrà l'effetto desiderato. E' importante conoscere come l'alimento si riscalda. Si ricorre a termocoppie poste in vari punti.

Conduzione



Convezione



Parte che si riscalda più lentamente:

conduzione: il centro geometrico;

convezione: parte lungo l'asse mediano prossima alla base.

3.1.6 Confezionamento in asepsi

Fino a ora abbiamo trattato di alimenti non sterili, chiusi ermeticamente e trattati con il calore. Una alternativa è rappresentata dal confezionamento in asepsi che consente di ridurre i tempi di trattamento. Un esempio è il trattamento UHT del latte (vedi lezione sul latte e prodotti derivati). Si utilizzano temperature molto alte (130-140°C) per tempi brevissimi (secondi). Il vantaggio di questo tipo di trattamento si basa sul concetto il valore Z per reazioni chimiche quali la perdita di vitamine, l'imbrunimento e l'inattivazione enzimatica è più alto (25-40°C) rispetto a quello per l'inattivazione delle spore (10°C).

3.2 Altri mezzi fisici

3.2.1 Irraggiamento⁸

Il trattamento di alimenti deperibili con radiazioni ionizzanti, in particolare i raggi gamma, ha diversi vantaggi nei confronti dei trattamenti termici. Se il trattamento è condotto adeguatamente e le alte dosi sono evitate non si assiste né a eccessivo riscaldamento del prodotto né a radiolisi e le caratteristiche organolettiche sono mantenute. Ciò è particolarmente vero se il l'alimento viene irradiato in condizioni di anaerobiosi o di congelamento. Va inoltre ricordato che l'irraggiamento è un trattamento terminale in quanto può essere applicato al prodotto già confezionato annullando i rischi di ricontaminazione. Se la possibilità di tossicità derivante da radiolisi è ancora oggetto di studio e di polemiche, è invece certo che virus ed enzimi radioresistenti possono rendere l'alimento pericoloso o alterarlo. Per la definizione di "radappertizzazione" valgono le stesse considerazioni fatte più sopra allorché si trattava dell'"appertizzazione".

⁸ Alcuni autori hanno suggerito il termine di "transradiation", che, pur non avendo una traduzione ufficiale in italiano, è utile per indicare che il raggi gamma passano attraverso l'alimento con minime interazioni con i costituenti dello stesso.

Applicazioni pratiche: (limitate per timori dei consumatori e incapacità dei ricercatori di dare risposte convincenti).

- effetto battericida: 3 Kgy (Salmonella spp., Yersinia spp., E. coli enterovirulenti, Campylobacter spp. su carne e pollo).

Il valore "D" è di 0,5-1,0 Kgy. Pertanto un trattamento di 3 Kgy consente una riduzione di 5 cicli logaritmici.

- ritardo dell'alterazione della frutta fresca, del pane in busta e della carne.

Per le spore il valore "D" è di 2-10 Kgy.

- trattamento di spezie e ingredienti vegetali.

3.2.1.1 Onde elettromagnetiche

"Considerato che la luce può avere natura ondulatoria con lunghezza d'onda e frequenza legate dalla relazione $ln=c$, ed altresì natura corpuscolare in forma di quanti di energia $E=hn$, è evidente che la luce e più in generale la radiazione elettromagnetica, può essere caratterizzata sia sulla base della lunghezza d'onda (o della frequenza), sia sulla base dell'energia per fotone". (Bosi, Concetti di chimica generale, Esculapio, 1982)

EMBED Word.Picture.6

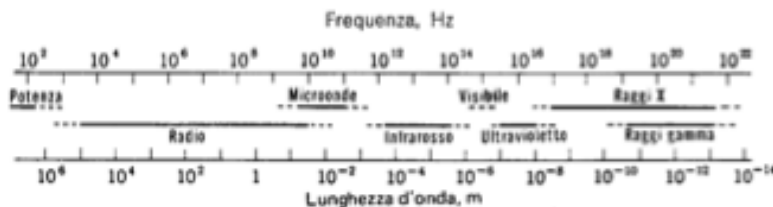


Fig. 35-15. - Lo spettro elettromagnetico. Si noti che le scale della lunghezza d'onda e della frequenza sono logaritmiche.

3.2.1.2 Microonde

Frequenza 10^9 - 10^{12} Hz (1000-1.000.000 MHz), $\lambda = 10^{-1}$ - 10^{-3} m, bassa energia. La loro azione, a differenza delle altre forme di radiazioni, è indiretta: attraverso la produzione di calore. Nei forni a microonde le frequenze utilizzate sono due: 2450 MHz e 915 MHz. Uso domestico: ricordare i punti freddi collegati al riscaldamento non uniforme degli alimenti: sia a causa delle proprietà dielettriche degli alimenti che delle caratteristiche dei forni stessi. Uso industriale: limitato a scongelamento di carni congelate e alla pastorizzazione di alcuni alimenti.

3.2.1.3 Raggi UV

Frequenza 10^{15} - 10^{17} Hz, $\lambda = 10^{-6}$ - 10^{-9} m (1000-1 nm), sufficiente energia per eccitare gli elettroni a occupare orbitali a maggiore livello energetico, rendendo le molecole più reattive. Le reazioni chimiche che ne derivano possono danneggiare i processi metabolici con conseguente morte della cellula. La maggiore attività è esplicata da radiazioni UV con lunghezza d'onda di 260 nm. alle quali sono particolarmente sensibili le basi pirimidiniche. La loro azione è dovuta sia all'idratazione dei residui delle basi pirimidiniche in corrispondenza del doppio legame in posizione 4-5, con conseguenti cambi di base (del tipo transizione), sia allo stabilirsi di legami covalenti tra due molecole di timina adiacenti. Nella seconda ipotesi la formazione di dimeri di timina comporta la rottura dei legami a idrogeno, la distorsione della doppia elica e la conseguente alterazione della duplicazione. In effetti l'azione mutagena è successiva al processo

di riparazione del danno da raggi UV: interviene una endonucleasi che asporta il pezzo di filamento contenente il dimero, quindi una esonucleasi digerisce l'estremità 3' del filamento tagliato e infine il segmento mancante viene resintetizzato dalla DNA-polimerasi e saldato all'estremità 5' da una ligasi. La DNA-polimerasi che interviene nel processo di resintesi è altamente imprecisa determinando errori di appaiamento. Anche l'esposizione alla luce visibile può essere responsabile di mutazioni: si tratta del fenomeno della *fotoriattivazione*, cioè dell'attivazione da parte dei raggi UV di un enzima che attacca i dimeri pirimidinici.

Resistenza ai raggi UV: Gram negativi < Gram positivi \approx lieviti < spore batteriche < virus.

Table 4.7 *UV resistance of some selected foodborne micro-organisms*

Species	<i>D</i> (mg $\times 10^3$)
<i>E. coli</i>	3-4
<i>Proteus vulgaris</i>	3-4
<i>Serratia marcescens</i>	3-4
<i>Shigella flexneri</i>	3-4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	3-4
<i>Bacillus subtilis</i> (vegetative cells)	6-8
<i>Bacillus subtilis</i> (spores)	8-10
<i>Micrococcus luteus</i>	10-20
<i>Staph. aureus</i>	3-4
<i>Aspergillus flavus</i>	50-100
<i>Mucor racemosus</i>	20-50
<i>Penicillium roquefortii</i>	20-50
<i>Rhizopus nigricans</i>	> 200
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3-10

Da: 'Microbial Ecology of Foods'. Vol. 1. ICMSF.

Utilizzo industriale limitato: purificazione aria (254 nm), laboratori di microbiologia.

3.2.1.4 Radiazioni ionizzanti

Frequenze $> 10^{18}$ Hz, energia sufficiente a creare ioni. In pratica sono utilizzati:

- 1) *particelle β* (elettroni veloci ad alta energia): provengono dal decadimento radioattivo (insieme a particelle α e ai raggi γ). Potere penetrante debole. Alta capacità ionizzante.
- 2) *raggi gamma* (radiazioni elettromagnetiche ad alta frequenza): provengono dal decadimento radioattivo (insieme a particelle α e particelle β). Alto potere penetrante.
- 3) *raggi X* (onde elettromagnetiche a breve lunghezza d'onda, $< 100 \text{ \AA}$, che si originano nel frenamento di elettroni veloci nella materia).

Table 4.8 *Radiation resistance of some foodborne micro-organisms*

<i>Species</i>	<i>6D dose (kGy)</i>
<i>E. coli</i>	1.5-3.0
<i>Salmonella enteritidis</i>	3-5
<i>S. typhimurium</i>	3-5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<0.5-1
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0.5-1
<i>Bacillus cereus</i>	20-30
<i>B. stearothermophilus</i>	10-20
<i>C. botulinum</i> type A	20-30
<i>Lactobacillus</i> spp.	2-7.5
<i>Micrococcus</i> spp.	3-5
<i>Deinococcus radiodurans</i>	>30
<i>Aspergillus flavus</i>	2-3
<i>Penicillium notatum</i>	1.5-2
<i>S. cerevisiae</i>	7.5-10
Viruses	>30

Da: 'Microbial Ecology of Foods'. Vol. 1. ICMSF.

Le radiazioni ionizzanti agiscono sui batteri sia direttamente (interagendo con le molecole nella cellula) che indirettamente, attraverso l'effetto inibitorio dei radicali liberi prodotti dalla radiolisi dell'acqua. Gli effetti indiretti sono molto più importanti, infatti in assenza di acqua sono necessarie dosi 2-3 volte maggiori. Anche la rimozione di ossigeno aumenta la resistenza batterica (l'ossigeno partecipa alle reazioni di formazione di radicali liberi). Come per i raggi UV, anche nel caso delle radiazioni ionizzanti il bersaglio principale è costituito dal DNA.

Resistenza alle radiazioni ionizzanti: Gram negativi < Gram positivi < spore batteriche ≈ lieviti < virus.

3.2.2 Filtrazione

Succhi di frutta e bevande fermentate.

3.2.3 Centrifugazione

Valori di 5000 x g (cioè 500 volte l'accelerazione di gravità): è la cosiddetta "bactofugazione". Uso limitato nell'industria lattiero-casearia.

3.3 Basse temperature

Le basse temperature rappresentano il più diffuso mezzo di conservazione degli alimenti di origine animale. L'applicazione del freddo dalla produzione fino al consumo è un'eccellente garanzia nella prevenzione delle tossinfezioni alimentari e delle alterazioni dei prodotti. Il freddo esercita la sua azione ritardante o bloccante la riproduzione batterica impedendo le attività enzimatiche. Inoltre gli enzimi richiedono la presenza di acqua che con l'abbassarsi della temperatura, diminuisce.

Refrigerazione >0°C

Congelamento <0°C

3.3.1 Refrigerazione

- 1) va applicata a un alimento "sano";
- 2) deve essere precoce;
- 3) deve essere continua (la c.d. "catena del freddo").

In pratica soltanto i germi superficiali possono moltiplicare, mentre gli anaerobi obbligati sono inibiti, anche nel caso di variazioni modeste della temperatura. Tuttavia nel caso di masse muscolari che si raffreddano lentamente gli anaerobi possono sviluppare.

0-4°C: rallentato anche lo sviluppo degli psicrofili. Attenzione: se c'è innalzamento lo sviluppo riprende. (Concetto di Q: aumento della temperatura che comporta un aumento della carica batterica di un ciclo logaritmico). Per batteri quali *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* è sufficiente un innalzamento di 5°C per raddoppiare la velocità di moltiplicazione.

Temperature di inibizione dei germi patogeni:

(da Bourgeois, Mescle, Zucca, Microbiologia alimentare, tecniche nuove)

<i>Staphylococcus spp.</i> (tossine); <i>Cl. botulinum</i> (tossine)	10°C
<i>Staphylococcus spp.</i> (moltiplicazione)	6,7°C
<i>Cl. perfringens</i> (moltiplicazione)	6,5°C
<i>Salmonella spp.</i> (moltiplicazione)	5,2°C
<i>Cl. botulinum</i> (tipo E, tossine)	3,3°C

Velocità di moltiplicazione di Clostridium perfringens in rapporto alla temperatura a pH=7 (da Bourgeois, Mescle, Zucca, Microbiologia alimentare, tecniche nuove).

Temperatura °C	tempo (minuti)
20	300
25	180
30	43
33	27
35	21
37	17
39	13

Velocità di moltiplicazione di batteri psicrofili Gram negativi bastoncellari in rapporto alla temperatura a pH=7 (da Mossel et. al, Essentials of the microbiology of foods).

Temperatura °C	tempo (ore)
0	11,3
2,5	7,7
5	5,0
7,5	3,5
10	2,6
20	1,1

A temperature di refrigerazione i batteri alteranti che prevalgono sono gli psicrotrofi e gli psicrofili Gram negativi (*Pseudomonas* spp.;, *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter* spp.), a temperature maggiori gli enterobatteri, Lactobacillaceae e gli sporigeni.

Velocità di refrigerazione

Carcassa calda (35°C-40°C → cella a **-1°C-+5°C** → 2-3 ore → spessore 1/2 cm 0-5°C

Il raffreddamento in profondità è più lento.

Il *tempo di semiraffreddamento* è il tempo necessario per ridurre del 50% la differenza di temperatura tra la carne al centro e l'ambiente esterno.

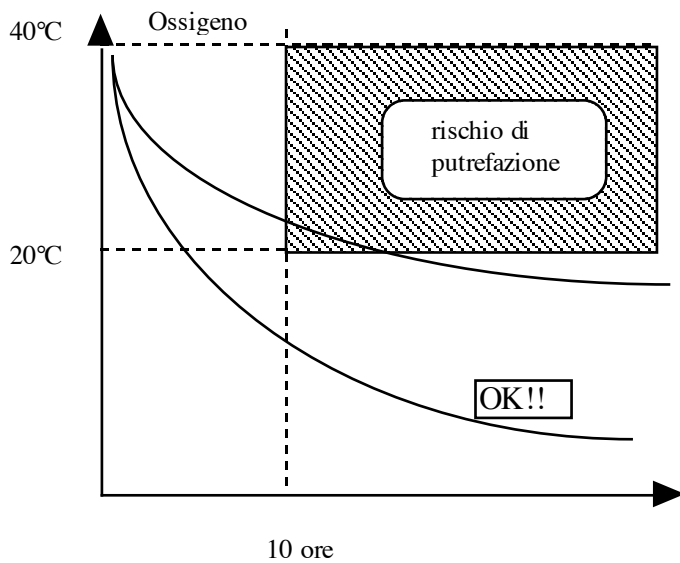
Per esempio: temp. ext: 0°C, carne 40°C, quando la carne è alla temperatura di 20°C è passato un tempo di semiraffreddamento.

Il tempo di semiraffreddamento per i tagli di carne bovina va da 8 a 20 ore, in rapporto al tipo di tecnica applicata (rapida o lenta).

Poiché per giungere ad una temperatura "a core" di 5 °C sono necessari tre tempi di semiraffreddamento (40°C-20°C; 20°C-10°C, 10°C-5°C), cioè da 24 a 60 ore.

Effetto sugli anaerobi, putrefazione profonda.

(da Bourgeois, Mesclé, Zucca, Microbiologia alimentare, tecniche nuove)



Nelle prime dieci ore è presente ossigeno muscolare e gli anaerobi non possono moltiplicare, dalla decima ora è necessario che la temperatura scenda al di sotto di 20°C.

3.3.2 Congelamento

Gli alimenti congelati sono mantenuti a temperature inferiori a -10°C sia per mantenere le caratteristiche strutturali che per ritardare l'ossidazione. Lo sviluppo batterico cessa sia a causa della bassa temperatura che per la diminuita a_w . Attenzione: alcuni enzimi rilasciati dalle cellule batteriche uccise dalla bassa temperatura sono ancora attivi anche a -30°C. E' quindi evidente che non vi è alcun rapporto tra la carica batterica e l'insorgenza di fenomeni alterativi e pertanto l'esame batteriologico delle carni congelate riveste poca importanza nella valutazione della conservabilità.

Gran parte dell'acqua è trasformata in ghiaccio. Le temperature utilizzate vanno da -10°C a -196°C (N liquido).

Punto di congelamento della carne = -1,1°C.

temperatura	% di acqua residua
-5°C	26%
-10°C (temp. più alta usata)	18%
-18°C (surgelati)	14% ($a_w = 0,84$)
-40	10%

Influenza del congelamento sui microrganismi

- a) azione del processo di congelamento;
- b) azione della conservazione.

a) processo

- 1) $<T^{\circ}$ → < velocità di moltiplicazione
- 2) H_2O → ghiaccio → $<a_w$
- 3) cambiamento di stato acqua → ghiaccio → alterazioni

strutture microbiche

Cristallizzazione → effetti meccanici (lesioni alle membrane)
effetti chimico-fisici (enzimi)

Attenzione: il congelamento non ha attività battericida!!! (In generale si ha riduzione di un ciclo logaritmico al congelamento e un altro per la conservazione).

Effetto della temperatura

$> T^{\circ}$ → > effetto letale sui batteri (ecco perché i batteri si conservano in N liquido)

Effetto della velocità

congelamento lento → > effetto letale sui batteri

(Concetto di **crioconcentrazione**: con il congelamento veloce si formano microcristalli e c'è minore effetto della pressione osmotica esercitata dai soluti concentrati).

b) Conservazione

> tempo di conservazione → > distruzione batterica

prima fase: effetto del congelamento (riduzione limitata del numero di batteri)

seconda fase: conservazione (distruzione graduale)

terza fase: stazionaria

Sensibilità dei microrganismi al congelamento

In rapporto a

-) Specie batterica,
-) temperatura di congelamento,
-) velocità di congelamento,
-) modalità di conservazione,
-) modalità di scongelamento,
-) **fase di sviluppo** (cellule più sensibili nella fase esponenziale di crescita),
-) **fattori chimico-fisici dell'alimento** (pH, presenza di costituenti con effetto protettivo).

Germi molto sensibili (Gram -);

mediamente resistenti (Gram +, stafilococchi, enterococchi);

molto resistenti (spore).

Lo scongelamento

Poiché lo scopo del congelamento è la conservazione dell'alimento, le condizioni ottimali per la sua preservazione lo sono anche per quella dei batteri!!!

Con lo scongelamento si torna alle condizioni al momento del congelamento e la qualità microbiologica allo scongelamento è in rapporto a quella del prodotto fresco.

La moltiplicazione allo scongelamento è in rapporto a:

- 1) natura dei batteri (selezione dei batteri resistenti),
- 2) modalità di scongelamento (temperatura e velocità: rapido è meglio),
- 3) temperatura di conservazione dopo lo scongelamento (se è +2°C-+5°C, gli psicrofili possono moltiplicare).

3.4 Conservanti chimici

I conservanti sono sostanze non consumate abitualmente che vengono incorporate agli alimenti per migliorarne la sicurezza e la stabilità, nella misura in cui esse dipendono dalla presenza di microrganismi. Le fonti del diritto (che affronteremo al IV anno) forniscono la seguente definizione: "i «conservanti» sono sostanze che prolungano il periodo di validità di prodotti alimentari proteggendoli dal deterioramento provocato dai microrganismi".

Devono assicurare:

-) innocuità dell'alimento (inibizione dello sviluppo dei microrganismi patogeni);
-) stabilità organolettica dell'alimento (inibizione della flora causa di alterazione).

Altri concetti:

-) non risanano,
-) vanno usati a basse concentrazioni,
-) devono essere efficaci anche in prodotti conservati a $t^{\circ} > 0^{\circ}\text{C}$.

Le norme comunitarie compendono diverse categorie di additivi: **conservanti**, antiossidanti, coadiuvanti, acidi, regolatori dell'acidità, antiagglomeranti, agenti antischiumogeni, agenti di carica, emulsionanti, sali di fusione, agenti di resistenza, esaltatori di sapidità, agenti schiumogeni, agenti gelificanti, agenti di rivestimento, agenti umidificanti, agenti modificanti, gas d'imballaggio, propellenti, agenti lievitanti, agenti sequestranti, stabilizzanti, addensanti.

Di seguito alcuni accenni.

3.4.1 Acidi organici & esteri

Organic and Food preservatives

<i>Preservative</i>	<i>*ADI (mg kg⁻¹ body wt)</i>	<i>Typical usage and levels</i>	<i>(mg kg⁻¹)</i>
E200 Sorbic acid E201 Sodium salt E202 Potassium salt E203 Calcium salt	25	Salad dressing bakery products fruit desserts	< 2000
E210 Benzoic acid E211 Sodium salt E212 Potassium salt E213 Calcium salt	5	Cider, soft drinks, fruit products, bottled sauces	< 3000
E260 Acetic acid	No limit	Pickles, sauces chutneys	up to % levels (1% = 10 000 mg kg ⁻¹)
E270 Lactic acid	No limit	Fermented meats dairy and vegetable products. Sauces and dressings. Drinks.	up to % levels (1% = 10 000 mg kg ⁻¹)
E280 Propionic acid E281 Sodium salt E282 Calcium salt E283 Potassium salt	10	Bakery goods Cheese spread	1000-5000
<i>Parabens</i> E214 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid ethyl ester E215 Sodium salt	10	Bakery goods, pickles, fruit products, sauces	< 2000
E216 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid n-propyl ester E217 Sodium salt		Bakery goods, pickles, fruit products, sauces	< 2000
E218 <i>p</i> -Hydroxybenzoic acid methyl ester E219 Sodium salt		Bakery goods, pickles, fruit products, sauces	< 2000

*ADI Acceptable daily intake

3.4.2 Nitriti

Sviluppo del colore dei prodotti di salumeria, attivi nei confronti dei clostridi, possibile rischio mutageno e cancerogeno.

L'azione antibatterica dei nitriti fu descritta per la prima volta negli anni 20. La presenza dei nitriti derivava dalla riduzione dei nitrati, presenti quali impurità nel sale utilizzato nella lavorazione delle carni. Oggi essi (in particolare i nitriti) vengono aggiunti sotto forma di sali di sodio e di potassio.

L'impiego pratico di maggiore importanza è relativo alla capacità dei nitriti di inibire lo sviluppo di *Clostridium botulinum*. Il meccanismo d'azione è poco noto, in parte per la complessa interazione di diversi fattori quali pH, contenuto di sale, presenza di nitrati o nitriti, trattamento termico. Per maggiori dettagli si faccia riferimento alla lezione sulle carni lavorate.

3.5 Atmosfera modificata

All'inizio del 19° secolo si credeva che il contatto con l'aria causasse la putrefazione. Tuttavia è stato soltanto negli ultimi 30 anni che si è diffuso l'impiego delle tecniche basate sulla

modificazione dell'ambiente gassoso. Il principale effetto della modificazione dell'atmosfera gassosa è a carico dei batteri aerobi a rapido sviluppo. L'effetto sugli anaerobi e sugli aerobi facoltativi, quali i clostridi o gli enterobatteri, è meno evidente. Le tecniche applicate per modificare l'atmosfera che circonda un alimento sono tre:

- 1) confezionamento sottovuoto;
- 2) confezionamento in atmosfera modificata;
- 3) uso dell'atmosfera controllata.

Caratteristica peculiare del confezionamento è l'impiego di materiali che impediscano all'ossigeno di penetrare e mantengano il grado di umidità dell'alimento. Si tratta di solito di materiali plastici.

3.5.1 Confezionamento sottovuoto

Il prodotto è posto in una busta che, sottratta l'aria, collassa e aderisce all'alimento prima che venga sigillata. L'ossigeno residuo è assorbito dalle reazioni chimiche del prodotto e dal metabolismo della microflora. Primo impiego: carni fresche. A temperature di refrigerazione la durata aumenta fino a 5 volte rispetto a tagli conservati in condizioni aerobiche. La microflora che sviluppa è dominata da batteri lattici. Attualmente, a causa del colore rosso scuro assunto dalla carne⁹ e quindi dello scarso interesse mostrato dai consumatori, questo tipo di confezionamento è usato molto raramente. Altri impieghi: carni cotte, lavorate. Pericoli: crescita di psicrofili (sono prodotti conservati a temperature di refrigerazione), *Clostridium botulinum* (anche in rapporto alla vendita di apparecchi per il confezionamento sottovuoto per uso domestico).

3.5.2 Confezionamento in atmosfera modificata

MAP: modified atmosphere packing. Insufflazione di una miscela di gas (CO_2 , O_2 e N_2). La composizione dei gas varia col progredire della conservazione (respirazione batterica, dissoluzione della CO_2 nella fase acquosa, scambi gassosi attraverso l'involucro). La composizione iniziale è scelta in maniera che le successive variazioni non abbiano un importante effetto sulla stabilità del prodotto.

⁹il colore rosso scuro è legato alla presenza della mioglobina nella forma non ossigenata: all'apertura della confezione, tuttavia, la carne riacquista rapidamente il colore rosso intenso dato dall'ossimioglobina.

Table 4.13 *MAP gas mixtures used with foods*

<i>Product</i>	<i>% CO₂</i>	<i>% O₂</i>	<i>% N₂</i>
Fresh meat	30	30	40
	15-40	60-85	-
Cured meat	20-50	0	50-80
Sliced cooked roast beef	75	10	15
Eggs	20	0	80
	0	0	100
Poultry	25-30	0	70-75
	60-75	5-10	> 20
	100	0	0
	20-40	60-80	0
Pork	20	80	0
Processed meats	0	0	100
Fish (white)	40	30	30
Fish (oily)	40	0	60
	60	0	40
Cheese (hard)	0-70		30-100
Cheese	0	0	100
Cheese;grated/sliced	30	0	70
Sandwiches	20-100	0-10	0-100
Pasta	0	0	100
	70-80	0	20-30
Bakery	0	0	100
	100	0	0

Da *J. Food Protection*, 1991, **54**, 58-70,

CO₂: effetto di inibizione dello sviluppo;

N₂: non ha effetto batteriostatico ma ha una bassa solubilità in acqua e previene l'afflosciamento della confezione;

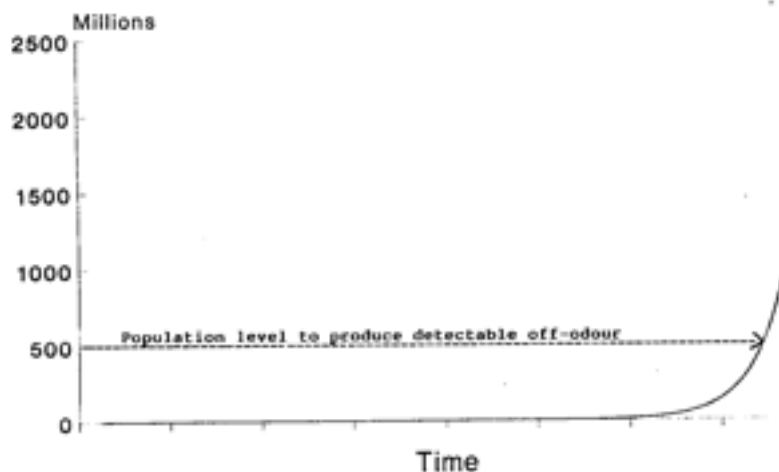
3.5.3 Conservazione in atmosfera controllata.

CAP, controlled-atmosphere packing. L'ambiente gassoso è mantenuto stabile per tutta la durata della conservazione. Impiego: grossi quantitativi di prodotti.

#4. MICROBIOLOGIA DELLE PRINCIPALI MATERIE PRIME.

4.1 Alterazione degli alimenti.

Quando un alimento è alterato le sue caratteristiche sono variate al punto che lo stesso non è più accettabile. Tali modificazioni non sono sempre di origine batterica: un alimento può diventare inaccettabile a causa della presenza di insetti, essiccazione eccessiva, alterazioni del colore, irrancidimento. Tuttavia la causa principale sono i batteri. L'alterazione di un alimento ha inoltre una componente soggettiva: ciò che da alcuni viene considerato alterato per altri può essere normale. Una caratteristica generale delle alterazioni indotte da microrganismi è la loro improvvisa comparsa. Ciò è una conseguenza della natura esponenziale dello sviluppo microbico (vedi capitolo 2.1).



4.2 Latte

4.2.1 Composizione

Acqua, grasso, proteine, lattosio, con variazioni tra diverse specie. Per esempio il contenuto proteico è maggiore nelle specie con più rapido tasso di crescita. Variazioni in rapporto a: razza, fase di lattazione, intervallo tra le mungiture, ora della giornata, numero di lattazioni precedenti, stato di nutrizione e di salute.

Composizione del latte fresco di vacca

		Concentration $g\ litre^{-1}$
LIPIDS		37
	of which	% w/w
Triglycerides		95-96
Diglycerides		1.3-1.6
Free fatty acids		0.1-0.5
Total phospholipids		0.8-1.0
PROTEINS		34
Casein		26
α_{s1}		11.1
α_{s2}		1.7
β		8.2
γ		1.2
κ		3.7
Whey proteins		
α -lactalbumin		0.7
β -lactoglobulin		3.0
serum albumin		0.3
immunoglobulins		0.6
NON-PROTEIN NITROGEN		1.9
LACTOSE		48
CITRIC ACID		1.75
ASH		7.0
CALCIUM		1.25
PHOSPHORUS		0.96

Acidi grassi: i più rappresentati sono C_{14} , C_{16} , C_{18} e $C_{18:1}$. Il grasso nel latte fresco si trova sottoforma di globuli ($\varnothing=5\mu m$) circondati da uno strato lipidico. Vi sono 10^{12} globuli di grasso per litro di latte. Se il latte fresco è lasciato a riposo il grasso affiora alla superficie: panna.

Proteine: 80-85% caseina. Precipitano a $pH=4,6$ (loro punto isoelettrico) per la prevalenza di amminoacidi acidi. Le classi di caseine sono 5 (vedi tabella precedente). Caseina e fosfato di calcio nel latte formano particelle colloidali (micelle, $\varnothing=0,2\mu m$): ve ne sono 10^{15} per litro di latte. La loro stabilità è mantenuta dalla presenza di κ -caseina in superficie: la perdita dell'effetto stabilizzante è causata dalla scissione della κ -caseina operata dalla chimosina nel corso della caseificazione. Ciò determina la formazione di un coagulo di micelle (cagliata).

Vi sono poi le proteine del siero di latte (per lo più β -lattoglobulina e α -lattoalbumina) e quelle seriche (albumina, immunoglobuline).

4.2.2 Microflora del latte crudo

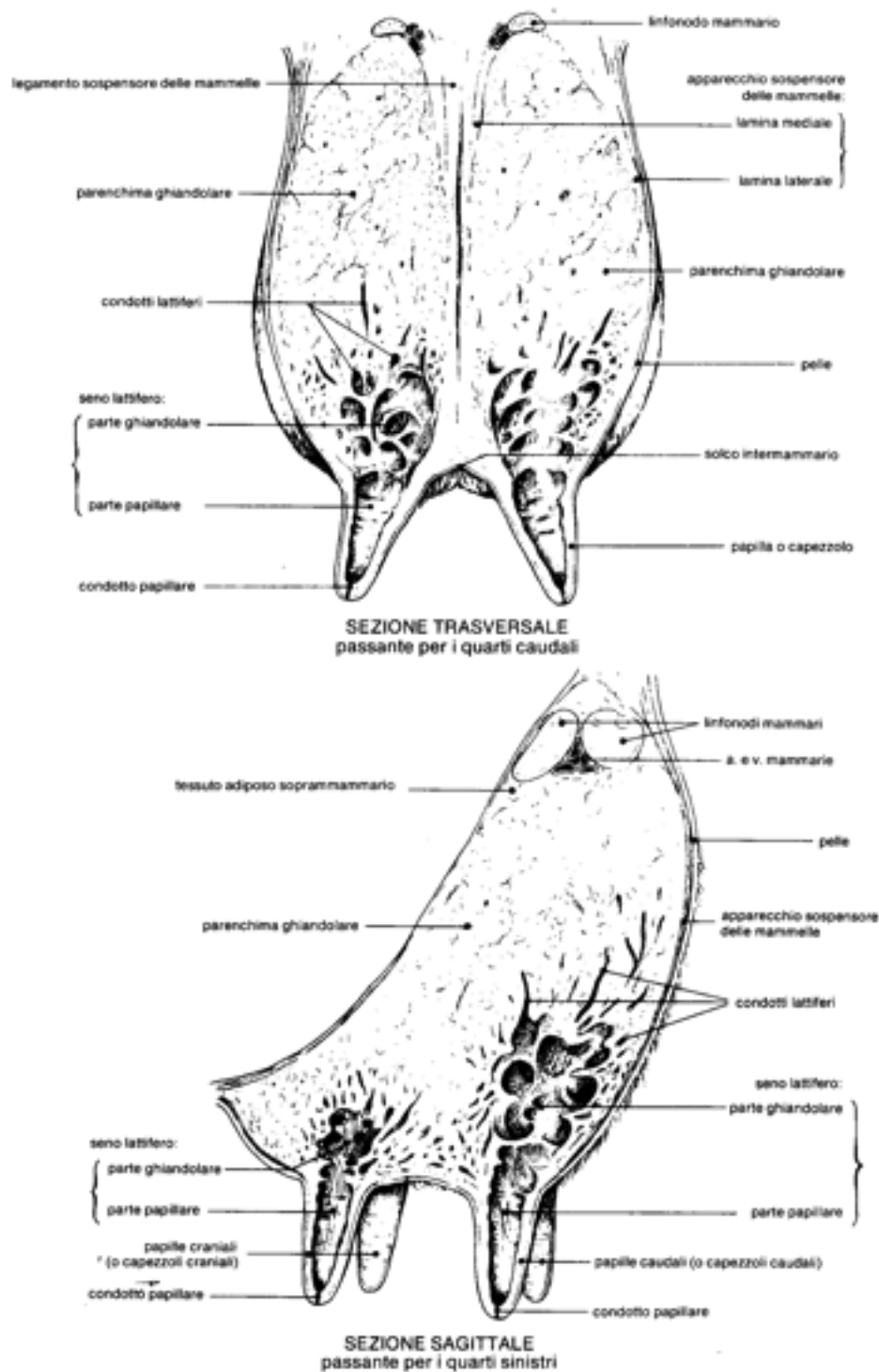
Alta aw, pH moderatamente acido (6,4-6,6) e ricca presenza di nutrienti: il latte è un ottimo terreno di coltura. Necessità di alti standard igienici di produzione e trasformazione. Nel latte si

trovano anche ostacoli allo sviluppo microbico (lattoperossidasi - ricordare che può essere aggiunta acqua ossigenata per stimolare la lattoperossidasi -, lisozima, lattoferrina).

I batteri possono provenire da:

- i) tessuti interni della mammella,
- ii) papilla (o capezzolo) e tessuti limitrofi,
- iii) attrezzature per la mungitura.

CONFORMAZIONE INTERNA DELLE MAMMELLE DELLA VACCA



i) I batteri presenti sulla superficie esterna della papilla possono invadere i tessuti interni e quindi il seno lattifero. Latte raccolto sterilmente da animali sani non contiene più di 10^2 - 10^3 germi/ml.

Batteri isolati più frequentemente: micrococchi, streptococchi, *Corynebacterium bovis*. In corso di mastiti la carica batterica

aumenta: nelle fasi acute si arriva a 10^8 /ml, mentre compaiono anche alterazioni visibili del secreto. Anche l'aumento dei leucociti polimorfonucleati è di aiuto per la diagnosi (fino a 10^7 /ml). Ricordare le c.d. mastiti subcliniche (carica batterica fino a 10^5 /ml).

Batteri causa di mastiti; vanno menzionati *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Corynebacterium pyogenes*. I primi tre sono potenziali agenti patogeni per l'uomo. Occas.: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium tuberculosis*. La prevenzione delle mastiti da *E. coli* è molto difficile.

Attenzione: gli animali infetti vengono sottoposti a trattamento antibiotico. Verificare i tempi di sospensione. Gli antibiotici nel latte possono essere causa di reazioni allergiche in soggetti atopici e ritardano l'attività delle colture starter nei prodotti fermentati.

ii) La papilla (o capezzolo) e i tessuti limitrofi possono essere contaminati dai batteri presenti nell'ambiente. E' evidente che i maggiori rischi di contaminazione si hanno in presenza di umidità in ambienti chiusi, piuttosto che d'estate al pascolo. Papille altamente contaminate: fino a 10^5 /ml. La lettiera e i liquami sono fonte di germi patogeni quali *E. coli*, *Campylobacter* spp., mentre *Salmonella* spp. e *Bacillus* spp. provengono dalla terra. I clostridi presenti nell'insilato (quali *C. butyricum* e *C. tyrobutyricum*) possono contaminare il latte e causare il c.d. gonfiore tardivo nei formaggi.

Alcune misure utili a limitare la contaminazione del latte:

- 🍏 lettiere pulite rinnovate frequentemente,
- 🍏 rimozione dei liquami
- 🍏 evitare le zone fangose,
- 🍏 lavaggio delle papille con acqua calda, disinfezione, asciugatura,
- 🍏 mantenere pulito il pavimento durante la mungitura,
- 🍏 lavaggio accurato dei gruppi mungitori (le c.d. *tettarelle*)
- 🍏 introduzione del pagamento del latte in base alla qualità (carica batterica e conteggio cellule somatiche).

iii) attrezzature per la mungitura: gruppi mungitori, condutture, serbatoi sono la principale fonte di microrganismi.

Strutture non lavate --> latte residuo --> sviluppo batterico.

Mancanza di pulizia: occasionale è meno grave di quella sistematica: ricordare il film impermeabile che protegge i batteri.

- - -

Il latte viene refrigerato subito dopo la mungitura e quindi mantenuto a circa 7°C fino alla consegna allo stabilimento. Sviluppo di psicrotrofi: i più comuni sono: *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., coliformi psicrotrofi (*Aerobacter* spp.), *Bacillus* spp. Attenzione: i

test tradizionali per la valutazione della qualità del latte, basati sulla riduzione dei coloranti (blu di metilene, resazzurrina) sono inutili: i batteri psicotrofi riducono in maniera limitata i coloranti.

4.2.3 Trattamenti termici del latte.

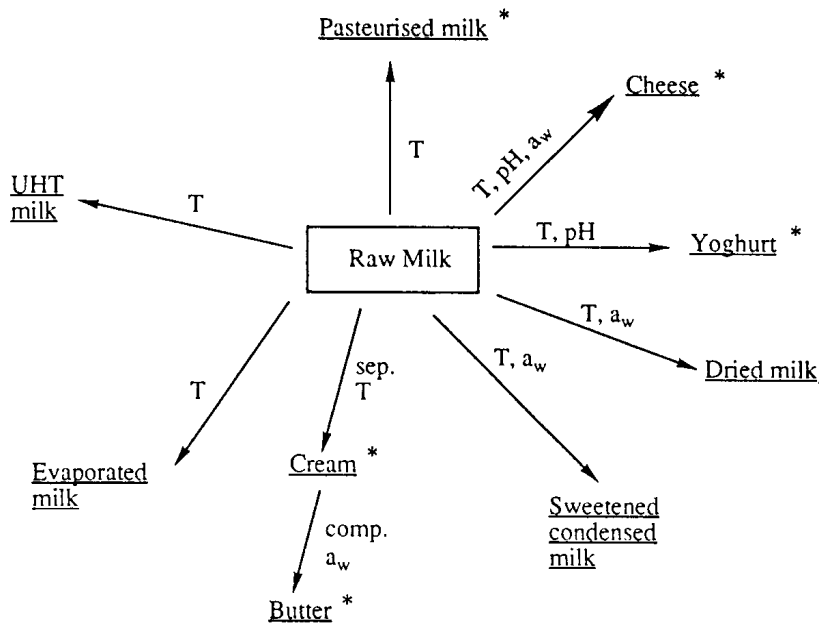
Vedi esercitazione #11, pag. 48.

Batteri c.d. termodurici che possono sopportare il trattamento di pastorizzazione: sporigeni, alcuni Gram positivi quali: *Microbacterium* spp. (attenzione non Mycobacterium!!!), *Micrococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp.; tra i Gram negativi: 1-10% degli stipti di *Alcaligenes tolerans*.

Causa di alterazione psicotrofi: Gram negativi bastoncellari: *Pseudomonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp. introdotti dopo la pastorizzazione. Sono causa di odori sgradevoli, putridi, acidi.

4.2.4 Prodotti a base di latte

Di seguito nello schema vengono indicati gli ostacoli antimicrobici che sono alla base della produzione dei prodotti lattiero caseari.



Milk and milk products. T indicates elevated temperature; pH, reduced pH; a_w , reduced a_w ; sep., separation; comp., compartmentalization; and *, stored at chill temperatures

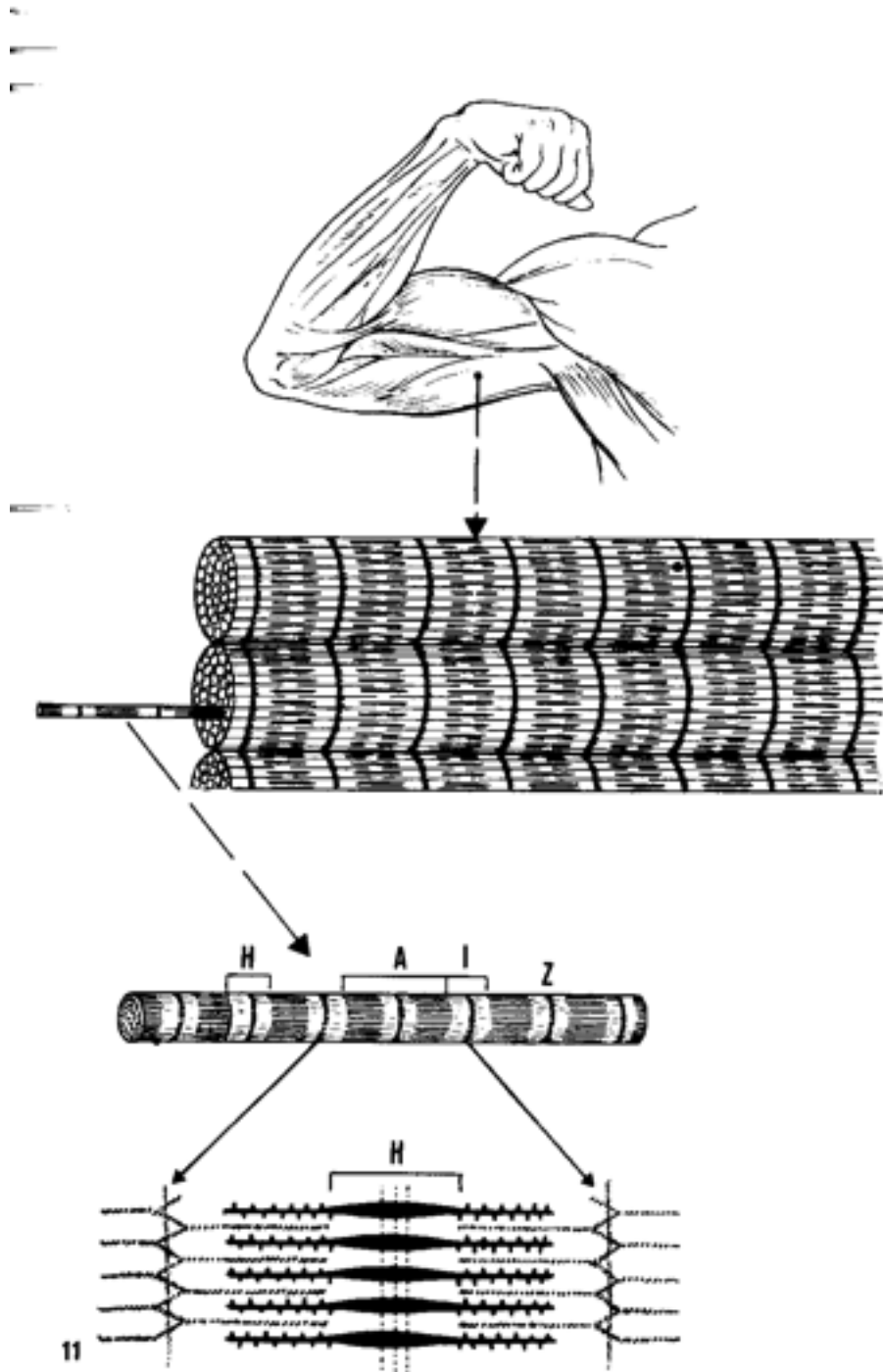
4.3 Carne

Ruolo fondamentale nella dieta dell'uomo a partire dal neolitico (9000 a.c.), cioè a quando vengono fatti risalire i primi riusciti tentativi di domesticazione degli animali. Il consumo di carne, nonostante oggi sia abiurato da molte persone non solo per motivi religiosi ma anche per ragioni morali, è ancora, purtroppo, estremamente diffuso. Nei paesi ricchi vi è richiesta di grandi quantità di carne. Tuttavia la produzione di proteine animali (carne in particolare) è un sistema poco efficiente: è necessario infatti che l'agricoltura produca proteine vegetali in eccesso per l'alimentazione del bestiame da carne. Le moderne tecniche di produzione consentono di ottenere un chilogrammo di carne di pollo con due chilogrammi di grano, ma ne servono ben quattro per ottenere un chilo di carne di suino e addirittura otto nel caso della carne di bovino.

4.3.1 Struttura e composizione

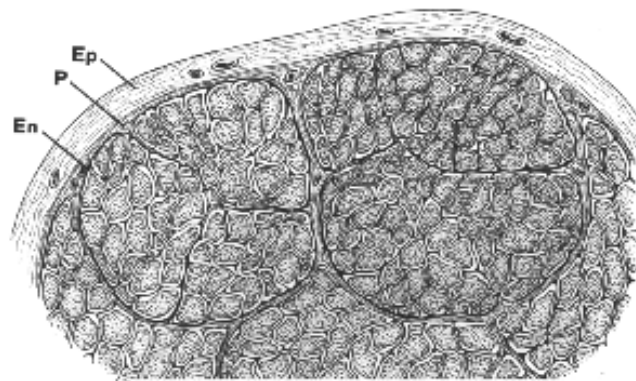
Vedi figure allegate.

L'elevata aw e l'abbondanza di nutrienti fanno della carne un ottimo terreno di coltura. Anche se la maggior parte dei microrganismi che sviluppano nella carne sono proteolitici, inizialmente la loro crescita avviene a carico di substrati più facilmente metabolizzabili (carboidrati e azoto non proteico). La proteolisi avviene solo nelle fasi più avanzate della decomposizione, quando la carne è già visibilmente alterata. La scissione del glicogeno continua dopo la morte ad opera degli enzimi della glicolisi e procede fino all'inattivazione degli stessi da parte del pH (generalmente il pH passa da 7 a 5,4-5,5). In particolari condizioni fisiologiche o patologiche il pH finale di 5,5 può non essere raggiunto. A valori di $\text{pH} > 5,5$ la crescita microbica è più rapida e i fenomeni alterativi possono comparire più facilmente.



Schema dell'organizzazione del muscolo scheletrico a livello macroscopico (muscolo), microscopico (miofibrilla con la caratteristica striatura trasversale), submicroscopico (miofilamenti che compongono la miofibrilla).

Schema di una sezione trasversale di un muscolo che mostra l'organizzazione delle fibre ed i rapporti con il connettivo che le avvolge. Ep, epimisio; P, perimisio; En, endomisio.



Da "Istologia", P. Rosati, edi. ermes

Chemical composition of typical adult mammalian muscle after rigor mortis

		% weight
Water		75.0
Protein		19.0
Myofibrillar	11.5	
Sarcoplasmic	5.5	
Connective	2.0	
Lipid		2.5
Carbohydrate		1.2
Lactic acid	0.9	
Glycogen	0.1	
Glucose and glycolytic intermediates	0.2	
Soluble non-protein nitrogen		1.65
Creatine	0.55	
Inosine monophosphate	0.30	
NAD/NADP	0.30	
Nucleotides	0.10	
Amino acids	0.35	
Carnosine, anserine	0.35	
Inorganic		0.65
Total soluble phosphorus	0.20	
Potassium	0.35	
Sodium	0.05	
Magnesium	0.02	
Other metals	0.23	
Vitamins		

Da R.A. Lawrie, 'Meat Science', 3rd edn., Pergamon Press, Oxford, 1979.

4.3.2 Microbiologia

I tessuti degli animali in buone condizioni di salute sono protetti dalle infezioni da barriere fisiche e dal sistema immunitario. Di

conseguenza gli **organi interni** e i muscoli di carcasse appena macellate sono pressoché privi di batteri.

Carica batterica profonda < 10 UFC/Kg

Pelle, Pelliccia, Intestino ⇒ flora dell'animale, flora dell'ambiente.

Pelle: micrococchi, stafilococchi, lieviti, muffe, batteri enterici (se gli animali provengono da allevamento intensivo e/o dopo trasporto).

Mattatoio: strumenti, coltelli, manipolazioni, personale: con livelli normali di igiene ⇒ considerati meno importanti rispetto alla contaminazione che origina dagli animali stessi ⇒ in particolare nel corso della lavorazione della carcassa (rimozione di testa, arti, pelle, grasso, visceri, intestino).

Rimozione della pelle: batteri da pelle a carcassa per contatto diretto, coltelli, mani. Un lavaggio della carcassa può migliorare le condizioni, ma l'accurata applicazione delle procedure di macellazione è meglio.

Intestino: va posta particolare attenzione per evitare le rotture.

Raffreddamento: dopo la macellazione la carcassa viene raffreddata (temperature di refrigerazione) e la carica batterica può diminuire. Resistono gli psicotrofi (che inizialmente sono pochi); tuttavia l'essiccamento della superficie ne impedisce lo sviluppo.

Carica batterica superficiale: 10²-10⁴ UFC/cm²

Contaminazione: suino >> pecora > bovino.

Carni avicole: moderni stabilimenti hanno una capacità che raggiunge 12.000 polli/ora (cioè circa 200/minuto). I problemi di tipo igienico-sanitario sono maggiori. Durante il trasporto vi è inoltre un'imponente contaminazione attraverso le deiezioni. I momenti in cui si verificano maggiormente le contaminazioni sono: scottatura (immersione dei polli dopo lo stordimento e la iugulazione in acqua calda - \approx 50°C- per facilitare la successiva spennatura), spennatura ed eviscerazione. Salmonelle, *Campylobacter* spp., soprattutto di provenienza intestinale, sono i germi più frequentemente isolati.

4.3.3 Alterazioni

- **Conservazione aerobica** della carne ⇒ alto potenziale redox sulla superficie ⇒ facilitato lo sviluppo degli psicotrofi Gram negativi (ricordare che la carne è conservata a temperature di refrigerazione): *Pseudomonas fragi*, *P. lundensis*, *P. fluorescens*; *Acinetobacter* spp., *Psychrobacter* spp. Chiave per la loro identificazione: vedi figura. Altri batteri, di isolamento meno frequente: enterobatteri psicotrofi (*Serratia liquefaciens* ed

Enterobacter agglomerans), batteri lattici e Gram positivi (*Brochothrix thermosphacta*).

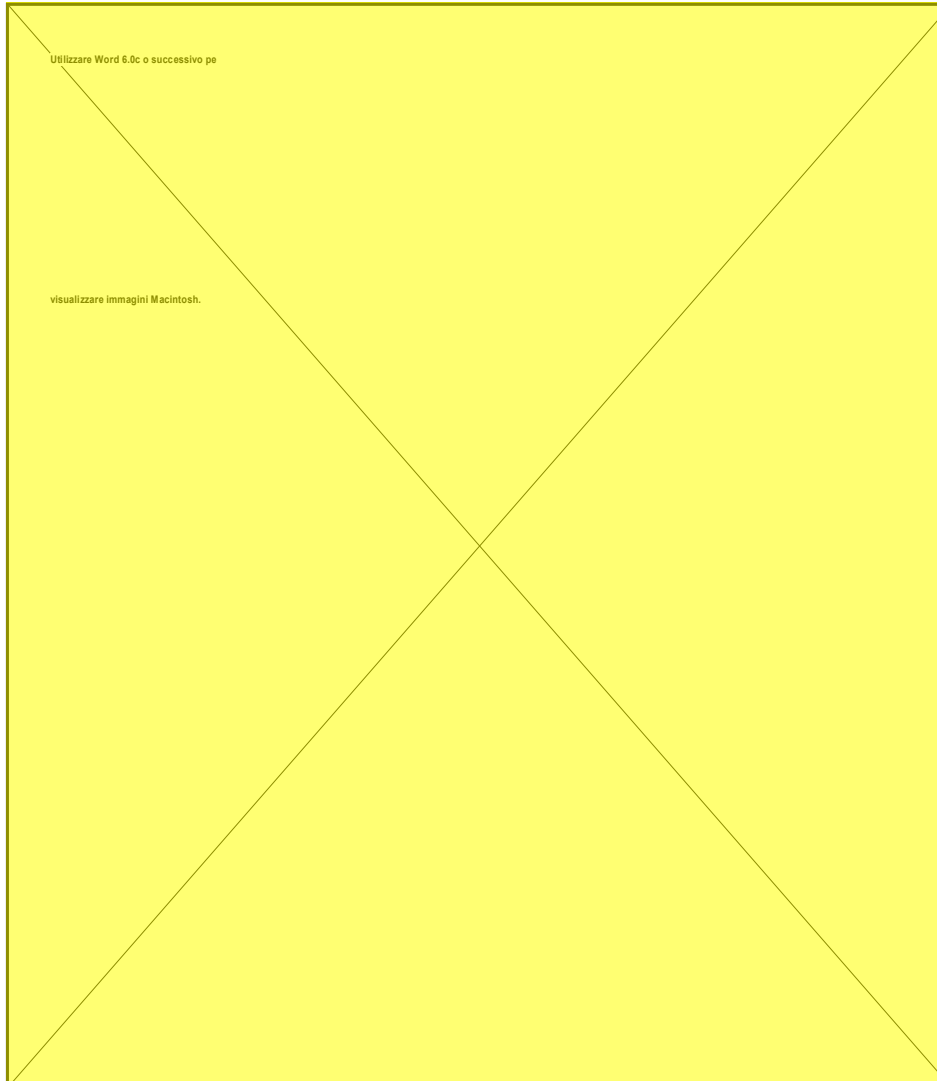
1° segno: cattivo odore (con carica batterica circa $10^7/\text{cm}^2$), i batteri iniziano a usare gli amminoacidi. Con poco glicogeno residuo questo stadio è raggiunto prima ($10^6/\text{cm}^2$).

Prodotti del metabolismo: esteri, alcoli, chetoni, composti solforati, prodotti per lo più da *Pseudomonas fragi* (odore dolciastro, di frutta: esteri; odore putrido: composti solforati).

Stadi finali: >pH (ammonio, ammine, putrescina, cadaverina: hanno nomi evocativi ma non sono causa di odori sgradevoli). Con carica batterica di circa $10^8/\text{cm}^2$ compare sulla superficie della carne una pellicola appiccicosa.

- **Sottovuoto:** accumulo di CO_2 , assenza di ossigeno limitano lo sviluppo di *Pseudomonas* spp. \Rightarrow prevalgono i Gram positivi: batteri lattici (*Lactobacillus* spp., *Carnobacterium* spp., *Leuconostoc* spp.). Essi determinano la comparsa di odori acidi meno caratteristici di quelli descritti sopra. Dopo una settimana: $10^7/\text{cm}^2$. Se il pH della carne è $> 6,0$, il confezionamento sottovuoto non consente alcuna estensione della durata: *Shewanella putrefaciens* ed enterobatteri psicrotrofi possono sviluppare e determinare la comparsa di odori sgradevoli. Questi batteri al normale pH acido della carne non sviluppano.

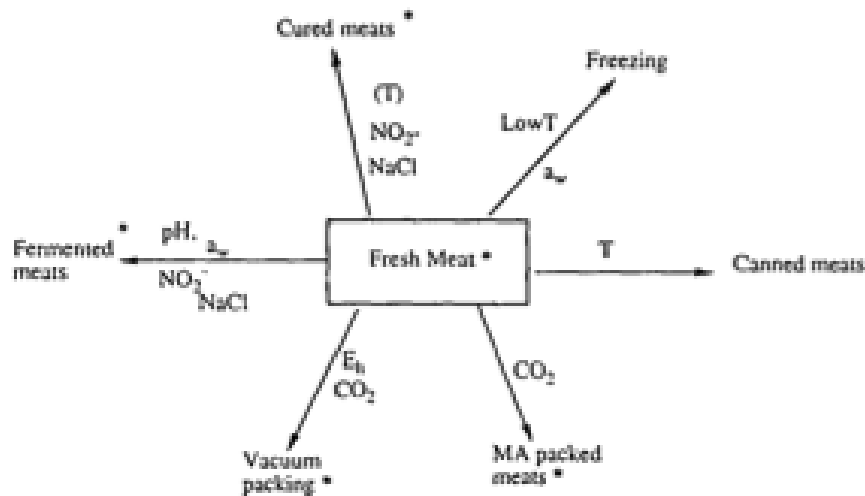
- **Atmosfera modificata:** CO_2 inibisce pseudomonadaceae e O_2 mantiene la carne rossa. Qui sviluppano batteri lattici e *Brochothrix thermosphacta*.



Caratteristiche colturali di alcuni batteri Gram negativi presenti sulla carne.

4.3.4 Prodotti di trasformazione

Di seguito nello schema vengono indicati gli ostacoli antimicrobici che sono alla base della lavorazione della carne.



*Meat and meat products. T indicates elevated temperature; E, low redox potential; pH, reduced pH; aw, reduced aw; and * stored at chill temperatures*

4.4 Pesce

In questo capitolo verrà trattato in generale dei prodotti della pesca con particolare riferimento al pesce (teleostei ed elasmobranchi). Storicamente l'estrema deperibilità del pesce ha limitato il consumo di prodotti freschi alle zone limitrofe ai punti di raccolta. Tuttavia l'applicazione di tecniche di lavorazione tradizionali quali la salagione, l'affumicatura e l'essiccamento, ha consentito un'ampia diffusione dei prodotti della pesca.

Anche se il pesce ha una composizione simile a quella della carne vanno citate le seguenti differenze:

- assenza di depositi visibili di grasso (anche se il tenore lipidico può raggiungere il 25%),
- basso contenuto di tessuto connettivo (3%, 25% nella carne),
- fibre muscolari corte.

Composizione: proteine 15-20%, grasso da 0,5% (teleostei quali il merluzzo) a 3-25% (pesci grassi quali le aringhe).

4.4.1 Microbiologia

Come per i mammiferi, anche i muscoli e gli organi interni dei pesci sani sono generalmente sterili. Su pelle, intestino e branchie si trovano diversi batteri. Pelle 10^2 - 10^7 /cm²; branchie e intestino 10^3 - 10^9 /g. Per lo più Gram negativi dei generi: *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Flavobacterium* e *Cytophaga*; Gram positivi come corinebatteri e micrococchi.

I pesci provenienti da mari freddi albergano batteri psicrotrofi. E' questo il motivo per il quale i pesci di regioni tropicali si conservano più a lungo in ghiaccio!!!

I batteri associati a pesci di mare dovrebbero tollerare le percentuali di sale presenti nell'habitat originario. Molti di questi batteri preferiscono terreni colturali contenenti 2-3% di sale, tuttavia quelli maggiormente responsabili di alterazioni del pesce pescato non sono gli alofili ma gli eurialini (cioè in grado di adattarsi a diverse concentrazioni di sale). Questi batteri sono infatti in grado di moltiplicarsi anche quando la superficie esterna del pesce è stata lavata dallo scioglimento del ghiaccio. Dopo la raccolta il pesce viene conservato in ghiaccio o in acqua di mare fredda fino al momento dello sbarco. E' una fase molto delicata ed è necessario che ghiaccio e acqua siano puliti e non riciclati, pena un rapido sviluppo batterico. La rimozione dell'intestino non è una pratica comune anche se, qualora ben eseguita, consente la rimozione della più importante fonte di batteri. Il taglio lascia tuttavia scoperte alcune zone suscettibili di rapidi fatti alterativi. In effetti ogni lesione della pelle rappresenta un punto da cui possono iniziare i processi alterativi. Lavorazioni successive che aumentano la superficie di contatto (preparazioni di filetti, affettamento etc...) rendono più facili le contaminazioni. In tutte le fasi successive, dallo sbarco, alla vendita, al trasporto, possono verificarsi ulteriori contaminazioni, anche con germi patogeni per l'uomo. In generale va però detto che le condizioni microbiologiche del pesce sono migliori di quelle della carne.

Malattie alimentari associate al consumo di pesce

Vibrio cholerae

Vibrio parahaemolyticus

Clostridium botulinum tipo E

Virus enterici

Paralytic shellfish poisoning

Scombroid fish poisoning

4.4.2 Crostacei e molluschi

I **crostacei** si alterano molto in fretta: se non è possibile mantenerli in vita fino alla cottura o al congelamento (come si fa con le aragoste) vanno lavorati al più presto (in mare o immediatamente dopo lo sbarco: è il caso dei gamberetti). I gamberetti, oltre alla flora endogena, vengono contaminati dai batteri presenti nella fanghiglia raccolta dalle reti.

Si sta diffondendo il consumo di gamberetti di allevamento venduti sgusciati e congelati:

- il primo rischio è associato alla contaminazione delle vasche degli allevamenti da parte dei mangimi o delle feci di uccelli,
- dopo la cottura (che dovrebbe eliminare le forme vegetative), l'esoscheletro chitinoso viene rimosso: in paesi dove la manodopera è conveniente questa operazione viene fatta a mano ⇒ secondo rischio: la manipolazione può comportare una contaminazione con germi patogeni successivamente al trattamento termico e immediatamente prima del congelamento!!!

I **molluschi**, a differenza dei crostacei e dei pesci contengono discrete quantità di glicogeno ($\sim 3\%$) e lo sviluppo batterico è più glicolitico che proteolitico \Rightarrow pH da 6,5 a 3,8.

Il tipo di alimentazione basata sulla filtrazione di grandi quantità di acqua, consente l'accumulo di batteri e virus. Il maggior rischio è legato al consumo di prodotti crudi o poco cotti.

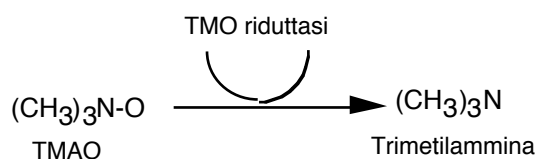
4.4.3 Alterazioni del pesce fresco

Molti fattori contribuiscono alla tipica alterabilità del pesce. per esempio nei pesci grassi l'alterazione può essere anche non batterica: gli acidi grassi poliinsaturi (di cui sono ricchi i pesci) vanno più facilmente incontro all'irrancidimento. Ma nella maggior parte dei casi i fatti alterativi sono di origine microbica. I muscoli di pesce contengono pochi carboidrati che si esauriscono durante le atroci fasi preagoniche (i pesci sono gli unici animali consumati dall'uomo che non vengono macellati). Questa condizione ha due conseguenze:

1) il pH post mortale dei tessuti non scende al di sotto di 6,2-6,3 (5,5 nei mammiferi). Infatti i pesci i cui tessuti hanno naturalmente un basso valore pH (per es. l'Halibut) si conservano più a lungo.

2) L'assenza di carboidrati fa sì che i batteri presenti utilizzino immediatamente le fonti di azoto producendo odori sgradevoli molto presto.

Tra i composti azotati non proteici va ricordato il TMAO (ossido di trimetilammina) che è presente in discrete quantità nei pesci marini come parte del sistema osmoregolatore. TMAO è l'accettore finale di elettroni nei batteri non fermentanti quali *Shewanella putrefaciens* (possono crescere in condizioni di microaerofilia o di anaerobiosi). Il prodotto di questa riduzione è la trimetilammina (TMA), un importante componente dell'odore del pesce. L'elevato potenziale redox del muscolo di pesce è dato dalla coppia TMAO/TMA: +19mV.



Gli elasmobranchi contengono alti livelli di urea:

\Rightarrow ureasi \Rightarrow ammoniaca \Rightarrow odore pungente che può guastare anche prodotti conservati nelle vicinanze.

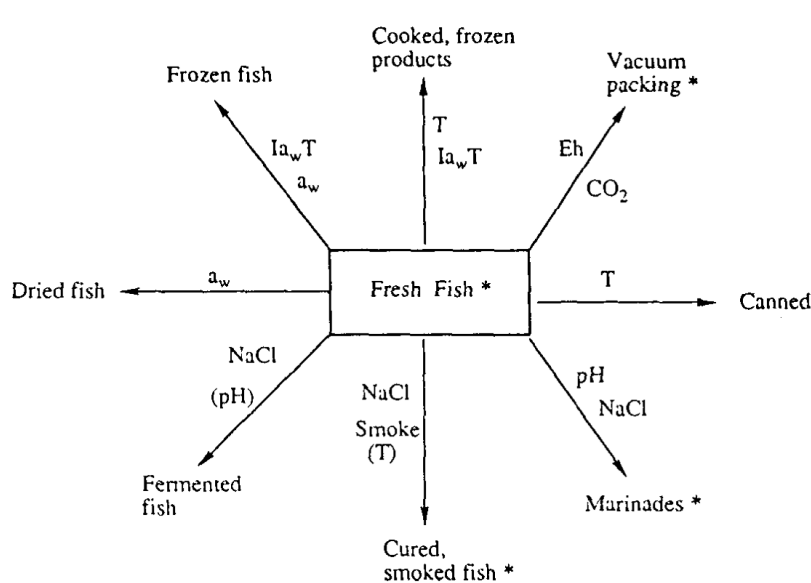
I molluschi e i crostacei hanno grandi riserve di azoto non proteico e vanno rapidamente incontro a fatti alterativi: è per questo che vengono mantenuti in vita fino al loro utilizzo.

Nei pesci di mari freddi prevalgono gli psicrotrofi \Rightarrow le alterazioni sono pertanto in rapporto alla presenza di Gram negativi bastoncellari (anche gli stessi della carne): in particolare

Shewanella putrefaciens e *Pseudomonas spp.* L'odore tipico di pesce in decomposizione è dato da un miscuglio di composti: idrogeno solforato (odore sulfureo), esteri, mercaptani (odore cosiddetto di "fruits"), scatolo (odore di feci umane).

4.4.4 Prodotti di trasformazione

Di seguito nello schema vengono indicati gli ostacoli antimicrobici che sono alla base della lavorazione del pesce. La combinazione di pH prossimo alla neutralità e disponibilità di TMAO quale accettore di elettroni, rende poco utile il confezionamento in atmosfera modificata. Non si assiste cioè allo stesso aumento della conservabilità ottenibile con la carne, ma nel migliore dei casi (alimenti con bassa carica batterica iniziale) si arriva a pochi giorni.



*Fish and fish products. T indicates elevated temperature; E, low redox potential; pH, reduced pH; a_w, reduced a_w; and * stored at chill temperatures*

#5 MALATTIE ALIMENTARI

Per l'OMS (Organizzazione Mondiale della sanità) malattia alimentare è "una malattia di natura infettiva o tossica causata dal consumo di cibo o acqua". Secondo l'OMS le malattie alimentari sono il più diffuso problema sanitario nel mondo contemporaneo e rappresentano un'importante causa di ridotta produttività economica. Uno studio effettuato negli Stati Uniti ha stimato in 7 miliardi di dollari il costo delle malattie alimentari. I costi sono relativi a: 1) analisi di laboratorio, 2) terapie, 3) spese familiari, 4) calo della richiesta/produzione. In Italia si è assistito a un calo nella richiesta di formaggio mascarpone dopo le segnalazioni confuse di questa estate su due casi di botulismo (estate 1996). Nelle regioni meno sviluppate il problema è ancora più serio: malattie alimentari caratterizzate da diarrea sono la causa più importante di morbilità e mortalità, soprattutto tra i bambini. Secondo stime attendibili, ogni anno vi sono un miliardo di episodi che causano la morte di cinque milioni di bambini al di sotto di cinque anni.

#6. BATTERI AGENTI DI MALATTIE ALIMENTARI.

6.1 *Aeromonas hydrophila*

6.2 *Brucella* spp.

6.3 *Bacillus cereus* e *Bacillus* spp.

6.4 *Campylobacter* spp.

6.5 *Clostridium botulinum*

6.6 *Clostridium perfringens*

6.7 *Escherichia coli**

6.8 *Listeria monocytogenes*

6.9 *Plesiomonas shigelloides*

6.10 *Salmonella* spp.*

6.11 *Shigella* spp.

6.12 *Staphylococcus aureus**

6.13 *Vibrio* spp.

6.14 *Yersinia enterocolitica*

#7. AGENTI NON BATTERICI CAUSA DI MALATTIE ALIMENTARI.

7.1 Elminti e nematodi

7.2 Protozoi

7.2.1 *Giardia lamblia*

7.2.2 *Entamoeba histolytica*

7.2.3 Sporozoa - Coccidia

7.2.4 Tossine algali (dinoflagellate, cianobatteri, diatomee)

7.2.5 Micotossine (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*)

7.3 Virus

7.4 Encefalopatie spongiformi

Family	Features	Viruses	Associated Diseases
Adenoviridae	Icosahedral particles with fibres. 100 nm, DNA.	Group F adenovirus Serotypes 40 and 41 (AdV).	Gastroenteritis
Astroviridae	28 nm particles with surface 'star' motif. ssRNA.	Human astrovirus, 7 serotypes (HuAV).	Mild gastroenteritis
Caliciviridae	34 nm particles with cup-shaped depressions on surface. ssRNA. Less distinct surface features.	Human enteric calicivirus. 5 or more serotypes (HuCV). Small round structured viruses (SRSV), e.g. Norwalk agent. 4-9 serotypes.	Gastroenteritis
		Hepatitis E virus* (Enterically transmitted, non-A, non-B hepatitis), (HEV).	Infectious hepatitis
Parvoviridae	22 nm featureless particles. ssDNA.	Parvovirus, e.g. Ditchling and Cockle agent.	Gastroenteritis, normally shellfish associated.
Picornaviridae	Featureless 28 nm icosahedral particles. ssRNA.	Poliovirus types 1-3. Echovirus types 1-65. Enterovirus now viruses numbered 68-71. Coxsackie A types 1-23. Coxsackie B types 1-6.	Meningitis, paralysis fever. Meningitis, rash, diarrhoea, fever, respiratory disease. Meningitis, herpangia, fever, respiratory disease. Myocarditis, congenital heart anomalies, pleurodynia, respiratory disease, fever, rash, meningitis. Infectious hepatitis.
		Hepatitis A virus (Hepatitis A).	Infectious hepatitis.
Reoviridae	Double shelled capsids, 70-80 nm segmented as RNA.	Reovirus	No disease associations known.
	Outer shell appears as 'spokes of a wheel'. 70 nm.	Rotavirus. Mainly Group A, occasionally B and C in humans.	Gastroenteritis.
Coronaviridae [#]	Fragile, pleomorphic, enveloped particles with prominent club-shaped spikes. ssRNA.	Human enteric coronavirus (HECV).	Gastroenteritis, possibly neonatal necrotizing enterocolitis.
Torovirus [#]	Fragile, doughnut-shaped, enveloped particles. ssRNA.	Human torovirus.	Gastroenteritis

(M. Carter)

* The taxonomy of HEV is currently under discussion. It may be assigned to a separate genus of the caliciviridae or as sole member of a distinct family.

[#] Potential agents not confirmed as human pathogens.