



Ricerca di Sistema elettrico

Sviluppo di un sistema (semi)automatico di progettazione di apparecchiature per la conservazione di alimenti attraverso campi elettrici pulsati, dotate di opportuni sistemi di monitoraggio e controllo.

P. Casti, M. Salmeri, A. Mencattini
F. Bonfà, S. Ferrari, I. Bertini

SVILUPPO DI UN SISTEMA (SEMI)AUTOMATICO DI PROGETTAZIONE DI APPARECCHIATURE PER LA
CONSERVAZIONE DI ALIMENTI ATTRAVERSO CAMPI ELETTRICI PULSATI, DOTATE DI OPPORTUNI SISTEMI DI
MONITORAGGIO E CONTROLLO.

P. Casti, M. Salmeri, A. Mencattini (Università degli Studi di Roma Tor Vergata),

F. Bonfà, S. Ferrari, I. Bertini (ENEA)

Settembre 2016

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA
Piano Annuale di Realizzazione 2015

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

Progetto: "Processi e macchinari industriali"

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

Responsabile del Progetto: Ing. Ilaria Bertini, ENEA



Il presente documento descrive le attività di ricerca svolte all'interno dell'Accordo di collaborazione "Analisi quantitativa descrittiva dello stato dell'arte in materia di PEF applicati alla conservazione degli alimenti"

Responsabile scientifico ENEA: Ing. Francesca Bonfà

Responsabile scientifico Università degli Studi di Roma Tor Vergata: Prof. Marcello Salmeri



"Un sistema va considerato complesso solo se è costituito da un gran numero di parti ciascuna con funzioni diverse, che interagiscono fra di loro in modo eterogeneo. Ma, come corollario, un sistema è complesso solo se non è né completamente regolare né completamente irregolare. In sostanza sono complessi i sistemi le cui parti interagiscono obbedendo a precise regole, così numerose ed eterogenee da non potersi riassumere in pochi principi o equazioni."

Giulio Tononi in Galileo e il fotodiode

Indice

SOMMARIO.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 LA CONTAMINAZIONE DEGLI ALIMENTI.....	5
1.2 PRINCIPALI MICRORGANISMI PATOGENI ALIMENTARI.....	5
1.3 QUALITÀ, SICUREZZA E RISPARMIO ENERGETICO.....	6
1.4 METODI DI CONSERVAZIONE DEGLI ALIMENTI.....	7
1.5 LA TECNOLOGIA PEF.....	8
2 ANALISI DELLA NORMATIVA NAZIONALE ED INTERNAZIONALE IN MATERIA DI PEF.....	11
2.1 STANDARD ISO 22000.....	11
2.2 NORMATIVA EUROPEA ED ITALIANA.....	12
3 ANALISI DELLA CINETICA DI INATTIVAZIONE MICROBICA DOVUTA AI PEF.....	15
3.1 TEORIA DELL'ELETTROPORAZIONE.....	15
3.2 VARIABILI DI INFLUENZA.....	16
3.2.1 Fattori di processo.....	16
3.2.2 Fattori microbiologici.....	17
3.2.3 Parametri di prodotto.....	18
3.3 MODELLI MATEMATICI DI INATTIVAZIONE MICROBICA.....	20
3.3.1 Modello di Hülshager and Niemann.....	21
3.3.2 Modello di Bigelow.....	21
3.3.3 Modello di Hülshager.....	21
3.3.4 Modello di Peleg.....	21
3.3.5 Modello di Weibull.....	21
4 STATO DELL'ARTE E APPLICAZIONI DEI CAMPI ELETTRICI PULSATI NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE.....	23
4.1 DEFINIZIONE DEL TARGET DI ANALISI E CRITERI DI INCLUSIONE.....	23
4.2 TRATTAMENTO DELL'ACQUA.....	24
4.3 TRATTAMENTO DI SUCCHI DI FRUTTA.....	26
4.4 TRATTAMENTO DEL LATTE.....	29
4.5 TRATTAMENTO DELLE UOVA.....	30
4.6 TRATTAMENTO DI BIRRA E VINO.....	31
5 ANALISI QUANTITATIVA DEI DATI RACCOLTI DALLA LETTERATURA.....	33
5.1 SINTESI ESPLORATIVA.....	33
5.2 ANALISI COMPARATIVA E SIGNIFICATIVITÀ STATISTICA.....	37
6 STUDIO PRELIMINARE PER LA REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA DI SUPPORTO ALLA PROGETTAZIONE.....	42
6.1 SULLA NECESSITÀ DI UN APPROCCIO STATISTICO.....	42
6.2 REGRESSIONE NON LINEARE.....	42
6.3 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	43
7 CONCLUSIONI.....	45
8 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI.....	46
9 ABBREVIAZIONI ED ACRONIMI.....	53

Sommario

Il presente lavoro si propone di esplorare l'applicabilità su vasta scala della tecnica di inattivazione microbica attraverso i campi elettrici pulsati (Pulsed Electric Fields, PEF) nel campo della conservazione degli alimenti in sostituzione delle attuali tecniche, più dispendiose da un punto di vista della efficienza energetica. Un'analisi di tipo quantitativo-descrittivo dello stato dell'arte è stata effettuata utilizzando le informazioni provenienti da studi e ricerche pubblicati nella letteratura scientifica dal 1980 al 2016. Dopo aver definito il target di analisi ed i criteri di valutazione da adottare, un campione di dati relativo a 194 diversi setting sperimentali, di cui 13 relativi all'acqua, 58 ai succhi di frutta, 38 al latte, 4 alle uova in forma liquida, e 17 a bevande alcoliche (vino, birra e sidro) è stato raccolto e tabulato. Ulteriori 64 dati si riferiscono a studi su mezzi di coltura, soluzioni saline o tamponi fosfato. Sulla base delle informazioni fornite dai singoli studi sono stati raccolti i valori corrispondenti dei parametri di processo, microbiologici, e di prodotto che possono influenzare la dinamica di inattivazione microbica e, conseguentemente, l'efficacia dei PEF ai fini della conservazione degli alimenti. Le documentazioni e norme elaborate da organismi internazionali di riferimento per la sicurezza alimentare visionate e presentate in questo lavoro, potranno eventualmente fornire alle autorità competenti utili spunti per integrare la regolamentazione riguardo alle procedure in questo specifico campo. Le tecniche di tipo statistico, applicate sia a singoli studi che di tipo complessivo forniscono le basi per l'impostazione di una metodologia multicriteriale e semiautomatica di supporto alla progettazione di apparecchiature PEF.

1 Introduzione

Nell'industria alimentare, una peculiare importanza è rivestita dalle procedure di conservazione, in grado di prolungare per un ragionevole lasso di tempo la durata di conservazione degli alimenti attraverso l'eliminazione o l'inattivazione di microrganismi naturalmente in essi presenti fin dalla loro preparazione e in grado di produrne il deterioramento. In particolare ci si riferisce a procedure di inattivazione microbica, intese come soppressione dell'attività funzionale di un microrganismo, cioè alla sua capacità di riprodursi e di produrre molecole o reazioni enzimatiche evidenti. Tali tecniche possono riferirsi all'intera popolazione di microrganismi o ad un suo sottoinsieme di microrganismi patogeni. L'attività batterica è regolata da diversi fattori ambientali, come la disponibilità di acqua, di nutrienti, di sostanze antimicrobiche naturali, il pH, l'umidità e la temperatura. Le tecniche di inattivazione microbica agiscono su uno o più di questi fattori rendendo più difficile o impossibile l'attività dei batteri [1].

In questo capitolo si introduce lo scenario di riferimento e vengono messe in evidenza le principali motivazioni alla base del presente lavoro. Sono illustrate le diverse tecniche esistenti per la conservazione degli alimenti. La tecnologia dei campi elettrici pulsati (Pulsed Electric Fields, PEF) viene presentata come tecnica innovativa per la conservazione degli alimenti.

1.1 La contaminazione degli alimenti

Gli alimenti sono sistemi dinamici dal punto di vista chimico, fisico e biologico. La maggior parte dei cibi crudi o processati contiene una o più comunità microbiche presenti già al momento della loro produzione. Si tratta normalmente di muffe, lieviti e batteri, poiché i virus non si moltiplicano negli alimenti. Alcuni di questi microrganismi hanno ruoli desiderabili, come ad esempio nella produzione di alimenti a fermentazione naturale, mentre altri causano il deterioramento degli alimenti stessi e, se ingeriti dall'uomo, determinano lo sviluppo di malattie di origine alimentare.

La contaminazione microbica che avviene in ciascun alimento è determinata essenzialmente dalla tipologia di materia prima. Numerosi fattori intrinseci, come acidità e presenza di acqua o ossigeno, ed estrinseci, come temperatura e modalità di confezionamento, influenzano la crescita e lo sviluppo di microrganismi che, per moltiplicarsi, necessitano di idonee condizioni fisico-chimiche. La contaminazione microbica, quindi, può verificarsi in tutti gli anelli della catena di approvvigionamento del prodotto, a partire dalla sua produzione, continuando con il confezionamento ed il trasporto, fino alla distribuzione al cliente.

Recenti studi indicano che fino al 25% dell'approvvigionamento alimentare nel mondo viene perso a causa di contaminazioni microbiche [2]. Le prime stime globali sulle malattie di origine alimentare sono state riportate, nel Dicembre 2015, dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) [3]. Secondo il rapporto dell'OMS ogni anno, nel mondo, 600 milioni di persone, circa 1 persona su 10, si ammalano a causa del consumo di alimenti contaminati. Le malattie di origine alimentare causano 420000 morti, di cui 125000 sono bambini di età inferiore ai 5 anni. In Europa, sono più di 23 milioni le persone che si ammalano per aver ingerito alimenti non sicuri, determinando 5000 morti ogni anno. L'infezione causata dal batterio *Listeria monocytogenes* ha l'impatto maggiore nella regione europea, causando circa 400 morti l'anno, in seguito allo sviluppo di setticemie o meningiti da *Listeria* [3].

1.2 Principali microrganismi patogeni alimentari

Tra i tre gruppi microbici, la più alta incidenza di deterioramento dei prodotti alimentari è causata da batteri, seguiti da lieviti e muffe. La moltiplicazione microbica è una componente importante nel deterioramento degli alimenti, per questo sono principalmente i batteri a causare un rapido deterioramento dei prodotti alimentari, in virtù del tempo più breve di generazione che li caratterizza.

I batteri sono organismi procarioti unicellulari, di dimensioni nel range $[0.5-1.0] \times [2.0-10] \mu\text{m}$, e hanno tre morfologie principali: sferica (cocchi), a bastoncello (bacilli), and a virgola (vibrioni). Sulla base della colorazione di Gram, i batteri possono essere classificati in Gram- e Gram+. I batteri appartenenti al primo gruppo, a cui appartengono ad esempio *Escherichia coli* e *Salmonella*, hanno una complessa parete cellulare costituita da una membrana esterna, una membrana centrale ed una membrana interna che determinano la resistenza dei batteri Gram- a numerosi enzimi. Infezioni da *Escherichia coli* o da *Salmonella*

possono essere contratte mediante ingestione di carne cruda o poco cotta, ma anche di succhi di frutta o latte non pastorizzati, e di acqua contaminata. La parete cellulare dei Gram+, come Staphilococcus e Listeria, è invece più semplice ed costituita per circa il 50-90% da peptoglicani che impediscono al colorante blu-violetto di penetrare all'interno della cellula. Lo Staphilococcus, ad esempio, può svilupparsi anche in alimenti con elevate concentrazioni di sale, in condizioni capaci di inibire la crescita della maggior parte delle altre specie batteriche, come prosciutti e carni lavorate, nonché in prodotti essiccati. Come nel caso della Listeria, anche per lo Staphilococcus oltre al latte e ai suoi derivati, carne, pesce e uova, rappresentano i generi alimentari più a rischio di contaminazione.

I lieviti e le muffe, a differenza dei batteri, sono organismi eucarioti, ovvero dispongono di un nucleo contenente materiale genetico e hanno dimensioni maggiori, dai 20 ai 100 μm . Mentre i lieviti, come il *Sacharomyces cerevisiae* e la *Candida*, sono organismi unicellulari motili, le muffe sono multicellulari e non-motili [2]. I lieviti possono avere forma ovale, sferica, o elongata. Quelli appartenenti al genere *Sacharomyces cerevisiae*, ad esempio, vengono utilizzati nella maggior parte delle fermentazioni industriali, per la produzione di vino, pane, e birra, ma possono causare anche il deterioramento degli alimenti mediante produzione di alcool and CO_2 [2].

Per quanto riguarda i virus, la loro crescita ha bisogno di cellule ospiti, per questo generalmente essi non si moltiplicano negli alimenti e non influenzano la qualità del cibo. Tuttavia, alcuni virus sono in grado di causare malattie enteriche, come l'epatite A, se presenti in un alimento.

Le caratteristiche delle varie tipologie di microrganismi patogeni alimentari e le loro relazioni con ciascun alimento dovranno essere tenute in considerazione per la realizzazione di metodologie efficaci di inattivazione microbica.

1.3 Qualità, sicurezza e risparmio energetico

La presenza di microrganismi, descritti nel paragrafo precedente, può alterare progressivamente le caratteristiche chimiche, fisiche, organolettiche, microbiologiche e strutturali degli alimenti se non si interviene con metodi di trattamento efficaci. I consumatori, tuttavia, sono alla ricerca di prodotti che mantengano caratteristiche simili al prodotto fresco, ossia con elevate qualità sensoriali e nutritive. Essi sono più consapevoli del contenuto nutrizionale degli alimenti e delle tecnologie utilizzate per elaborarli, mostrando una maggiore preferenza per prodotti naturali, privi di sostanze chimiche o additivi [4]. Colore, consistenza, odore, sapore, forma e assenza di anomalie sono considerate le qualità più importanti in questo ambito.

L'obiettivo delle tecnologie di conservazione è quello di mantenere i prodotti alimentari sicuri e vicini alla loro qualità originale. Tuttavia, la priorità assoluta nella conservazione degli alimenti e delle tecniche di processamento alimentare è di ridurre al minimo la presenza e la crescita di microrganismi che possono causare intossicazioni alimentari o infezioni di origine alimentare [5].

Il ruolo delle istituzioni di regolamentazione nei vari paesi è quello di fornire richieste di qualità chiari ai produttori e distributori di prodotti alimentari. I numerosi fattori che caratterizzano la qualità degli alimenti devono essere quantificati al fine di determinare una chiara linea di confine per cibi considerati inaccettabili. Per produrre cambiamenti rilevabili di colore, odore e consistenza di un alimento accompagnate con formazione melma o gas e l'accumulo di liquido, i microrganismi (principalmente batteri e lieviti) devono moltiplicarsi e raggiungere un determinato livello, definito come "livello di rilevamento del deterioramento." A seconda del tipo di alimento, della natura specifica del deterioramento e delle tipologie microbiche, il livello di rilevamento del deterioramento può variare da 10^6 a 10^8 cellule per g, ml o cm^2 di alimento [2]. Per ridurre il deterioramento microbico di un alimento, c'è bisogno di garantire sia un basso carico microbico iniziale (inattivazione microbica) ma anche di allungare il tempo di generazione di microrganismi alteranti durante la conservazione.

Le politiche dell'Unione Europea degli ultimi anni, in particolare attraverso la direttiva sull'efficienza energetica (2012/27/UE), impongono obiettivi nazionali per gli stati membri che siano indicativi di efficienza energetica per il 2020. Il Piano d'Azione Italiano per l'Efficienza Energetica del 2014, tra le categorie di intervento nei processi industriali, sottolinea la necessità di interventi mirati a "l'ottimizzazione energetica dei processi produttivi e dei layout d'impianto finalizzati a conseguire una riduzione oggettiva e

duratura dei fabbisogni di energia finale a parità di quantità e qualità della produzione”. In questo scenario, è necessario favorire lo sviluppo di metodiche innovative per la conservazione degli alimenti che possano perseguire gli obiettivi europei relativi all’efficientamento energetico. Parallelamente, per quanto riguarda il settore alimentare, la necessità di utilizzare metodi di trattamento che possano raggiungere l’inattivazione microbica, mantenendo le caratteristiche dei cibi freschi e fornendo prodotti ecocompatibili, ad un costo ragionevole, deve essere considerata. Da queste considerazioni nasce l’attuale sfida di numerosi scienziati e tecnologi alimentari in tutto il mondo ed, in particolare, si inquadrano gli obiettivi di questo lavoro.

1.4 Metodi di conservazione degli alimenti

Diversi tecniche di conservazione degli alimenti si sono evolute nel corso della storia e sono attualmente accettate in tutto il mondo come affidabili. Questi metodi spesso servono come standard nello sviluppo di nuove tecnologie e sono molteplici in relazione alle caratteristiche dell’alimento. Nel 2004 la U.S. National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) ha definito la pastorizzazione come *“Qualsiasi processo, trattamento, o loro combinazione che viene applicato al cibo per ridurre la maggior parte dei microrganismi di rilevanza per la salute pubblica ad un livello tale da non poter presentare un rischio per la salute pubblica stessa in normali condizioni di distribuzione e stoccaggio”* [6], estendendo il termine pastorizzazione anche a metodi non termici di conservazione degli alimenti. I metodi di pastorizzazione non necessariamente raggiungono la sterilità commerciale, la quale invece prevede la distruzione di tutte le forme di microrganismi (incluse le spore). Per questo la maggior parte degli alimenti pastorizzati devono essere congelati o refrigerati successivamente per poter preservare nel tempo la qualità del prodotto.

I metodi di conservazione chimici sono tra i più efficaci ed ampiamente usati perché non solo eliminano la popolazione microbica durante il trattamento iniziale, ma limitano anche la probabile contaminazione durante il confezionamento, il trasporto e lo stoccaggio dell’alimento. Questi possono essere naturali (sali, zuccheri, alcool, olio, aceto) o artificiali (additivi chimici). Diversi additivi chimici, come solfiti e nitriti, e organici, come l’acido benzoico e sorbico, sono approvati da organismi di regolamentazione per essere utilizzati all’interno dei prodotti alimentari. Tuttavia questi possono aggiungere un gusto non desiderabile al prodotto ed una parte della popolazione mondiale è allergica a particolari conservanti. Inoltre, il dibattito è aperto circa la cancerogenicità di alcuni tra questi agenti conservanti. Per questo, i regolamenti vigenti obbligano i produttori ad etichettare i prodotti alimentari con il tipo e la quantità di conservanti utilizzati.

Nei metodi biologici, come la fermentazione, particolari microrganismi vengono utilizzati per produrre nuovi alimenti. I nuovi prodotti di solito mostrano una lunga durata a causa della presenza della cultura di lievito nel prodotto. Inoltre, il processo di fermentazione cambia la composizione chimica del prodotto – l’acidità aumenta mentre lo zucchero è consumato dalla cultura di lievito dominante, che viene accuratamente monitorata durante il processo.

Metodi fisici, o fisico-chimici di conservazione, includono l’affumicamento, l’acidificazione, la disidratazione, il confezionamento sottovuoto e la atmosfera controllata. Il confezionamento sottovuoto elimina quasi totalmente la crescita di microbi che richiedono ossigeno. Oltre al controllo microbico, la rimozione di ossigeno riduce anche la velocità delle reazioni chimiche anch’esse ossigeno-dipendenti. Anche l’introduzione di gas con effetto inibitorio sui batteri, come la CO₂, è un metodo di conservazione economico che incide su diverse popolazioni microbiche diverse da quelle dipendenti dall’ossigeno. La riduzione del valore di pH degli alimenti ai livelli di 4,2-4,5 è letale per la maggior parte di essi, ad eccezione di alcuni batteri e muffe. La crescita microbica, inoltre, dipende fortemente dall’attività dell’acqua presente negli alimenti. Pertanto, un maggiore tempo di conservazione può essere ottenuto rimuovendo l’acqua dal prodotto (essiccamento). Il congelamento (T<-18 °C) o il raffreddamento (T≈0 °C) sono metodi fisici che aiutano la conservazione degli alimenti senza influenzare significativamente la loro struttura primaria. Le reazioni biologiche dipendono dalla temperatura ed, in tal modo, quasi tutte le reazioni vengono fermate ed i microrganismi presenti nell’alimento cessano di funzionare. Tuttavia, questo metodo non uccide i batteri esistenti e la contaminazione, dopo lo scongelamento o al ripristino della temperatura ambiente, può essere causata da una carica microbica preesistente.

I *metodi termici* sono, tra i metodi fisici, i più utilizzati nell'industria alimentare, questi includono la bollitura, il riscaldamento (pastorizzazione e sterilizzazione), le microonde ed il riscaldamento ohmico. La maggior parte delle proteine subiscono un processo di degradazione a 90 °C. Sfruttando questa proprietà, i trattamenti ad alta temperatura permettono di conservare gli alimenti inattivando con efficacia quasi tutti i microrganismi. L'efficacia dei processi di inattivazione microbica di tipo termico avviene al costo di alterare le caratteristiche del prodotto stesso, influenzandone il gusto, il sapore, e a volte anche inducendo cambiamenti di colore. Per questo, le tecnologie non termiche rappresentano una nuova area di sviluppo per la conservazione degli alimenti e sono attualmente esplorate su scala globale; la ricerca è cresciuta rapidamente negli ultimi anni, in particolare.

Tecnologie innovative includono l'elevata pressione idrostatica (High Hydrostatic Pressure, HHP), i PEF, le radiazioni ionizzanti, i raggi ultravioletti (UV) e gli ultrasuoni, e sono in grado di inattivare i microrganismi a temperatura ambiente o subletali. Questi hanno il vantaggio, rispetto ai metodi termici, di mantenere inalterata la qualità finale dei prodotti, ad esempio, nel sapore, colore e aspetto generale; per questo permettono la produzione di alimenti sicuri con valori sensoriali e nutrizionali elevati. La scelta di una tecnica di applicazione industriale dipende ovviamente dalle proprietà dei singoli alimenti e dalle necessità di progettazione del processo. L'HPP e le radiazioni ionizzanti sono idonee per applicazioni su alimenti solidi e liquidi. L'utilizzo di UV è invece limitato al trattamento delle superfici degli alimenti, a causa della scarsa capacità di penetrazione dei raggi UV. I PEF permettono il trattamento di alimenti liquidi in modo rapido e continuativo.

1.5 La tecnologia PEF

Il trattamento con i campi elettrici pulsati (PEF) prevede l'applicazione di impulsi di breve durata (1-10 ms) ad alta tensione (tipicamente 20-80 kV/cm) sugli alimenti che vengono posti tra due elettrodi. Esso è condotto per meno di 1 s a temperatura ambiente, sub-ambiente o leggermente al di sopra della temperatura ambiente, e la perdita di energia dovuta al riscaldamento dei cibi viene minimizzata. Come anticipato, la tecnologia PEF è considerata superiore ai trattamenti termici tradizionali degli alimenti perché evita o riduce notevolmente le variazioni delle proprietà organolettiche e fisiche degli alimenti [7].

Alcuni aspetti importanti della tecnologia PEF coinvolgono la generazione di elevate intensità di campo elettrico, la progettazione di camere di trattamento che permettono una distribuzione uniforme del campo elettrico sull'alimento con aumento minimo della temperatura, e la progettazione di elettrodi che minimizzano l'effetto di elettrolisi. Le grandi intensità di campo sono raggiunte attraverso l'immagazzinamento dell'energia proveniente da un alimentatore in corrente continua (DC) in una batteria di condensatori; questa viene poi scaricata sotto forma di impulsi ad alta tensione sull'alimento [8].

I PEF possono essere applicati sotto forma di impulsi esponenziali, a onda quadra, bipolari, o impulsi oscillatori. Un'onda di tensione a decadimento esponenziale è una tensione unidirezionale che sale rapidamente ad un valore massimo e decade lentamente a zero. Gli impulsi ad onda quadra sono più letali e più efficienti di quelli esponenziali [7]. Una forma d'onda quadra può essere ottenuta utilizzando un circuito formatore di impulsi costituito da un array di condensatori e induttori e da un relè allo stato solido. Gli impulsi bipolari sono caratterizzati da tensione positiva e negativa con diverse larghezze e intensità di picco. In virtù dell'inversione improvvisa dell'orientazione del campo elettrico generato, essi producono uno stress alternato sulle membrane cellulari dei microrganismi target, incrementando la suscettibilità della membrana al trattamento. Gli impulsi con cambio di carica istantaneo, a differenza degli impulsi bipolari, non prevedono un tempo di rilassamento tra un impulso ed il successivo e sono in grado di ridurre drasticamente il fabbisogno energetico del trattamento. Gli impulsi oscillatori, al contrario, sono meno efficienti, perché non permettono ai microrganismi di essere esposti ad un campo elettrico ad alta intensità per un periodo prolungato di tempo, impedendo così alla membrana cellulare di essere intaccata su una vasta area [9].

L'efficienza di processo dipende anche dalla configurazione della camera di trattamento: a piastre parallele, a cilindri coassiali, o a configurazione co-lineare sono stati valutati per la trasformazione dei prodotti alimentari liquidi [8]. Diverse camere di trattamento pilota sono stati progettate su scala di laboratorio ed utilizzate per il trattamento PEF degli alimenti. Le camere possono essere classificate come statiche o

continue. È stato dimostrato sperimentalmente che tra tutte le configurazioni per le camera di trattamento, la camera a configurazione co-lineare può consentire una più alta densità di energia dell'impulso a parità di tensione applicata [5]. Questo consente una temperatura di uscita più bassa, che contribuisce a non produrre effetti negativi sulla qualità del prodotto. Maggiori dettagli sulle configurazioni delle camere di trattamento possono essere reperiti in un report della U.S. Food and Drug Administration, FDA, di recente pubblicazione [7].

Particolare attenzione durante la progettazione di un sistema PEF dovrebbe essere rivolta anche al materiale degli elettrodi, in quanto diversi materiali possiedono limitazioni differenti sulla durata dell'impulso a causa di variazioni elettrochimiche nella elettrochimica doppio strato di capacità. Il materiale preferito nell'industria alimentare è acciaio inossidabile, perché è economico, facile da modellare, e resistente all'usura. Tuttavia, sono stati osservati problemi connessi con elettrolisi, la formazione di bolle, la corrosione dell'elettrodo di corrosione ed il rilascio di particelle di metallo quando gli elettrodi in acciaio inox sono stati utilizzati nel trattamento PEF di dei prodotti alimentari [5]. Sono stati proposti materiali alternativi per elettrodi come il platino (Pt) [10] o rivestimenti polimerici [11]. Tuttavia, il loro uso sembra poco pratico in questo momento perché il Pt è costoso, e l'uso di rivestimenti polimerici nell'industria non è stato ancora completamente sviluppato. È necessaria una ricerca elettrochimica dettagliata per valutare diversi materiali elettrodi ed il loro impatto sull'efficienza del trattamento e sulla sicurezza.

Lo schema di un sistema di trattamento PEF a flusso continuo per la lavorazione degli alimenti PEF è illustrato in Figura 1. Il sistema è costituito da cinque componenti principali: un alimentatore ad alta tensione, il generatore di impulsi, una camera di trattamento, una pompa per condurre l'alimento verso la camera di trattamento, un dispositivo di raffreddamento oltre ad un computer per controllare le operazioni.

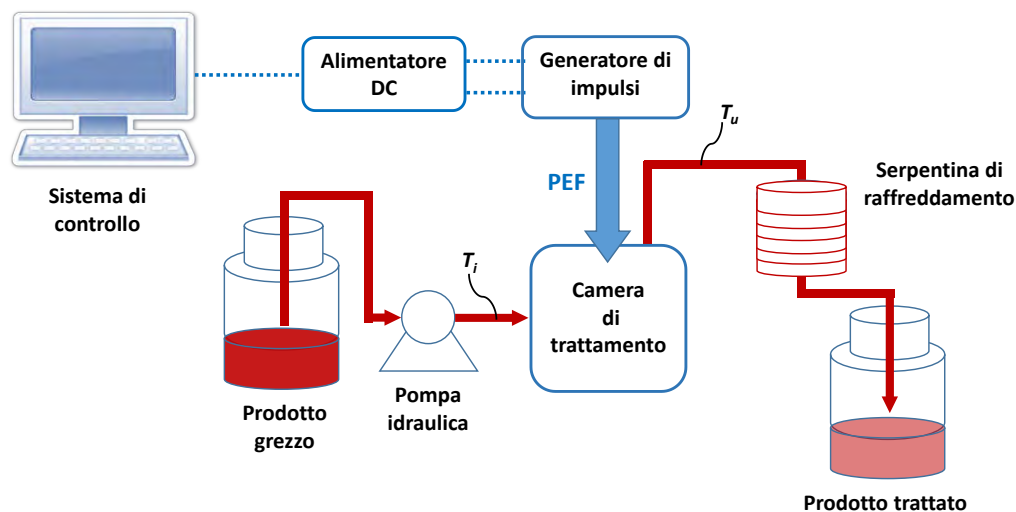


Figura 1. Schema di un sistema di trattamento PEF a flusso continuo.

Gli studi sul fabbisogno di energia hanno concluso che PEF è un processo a basso consumo energetico rispetto alla pastorizzazione termica, in particolare relativamente ai sistemi a flusso continuo [12, 13, 14]. Ad esempio, l'energia richiesta per portare 50 ml di acqua da una temperatura ambiente di 20 °C ad una temperatura di 72 °C è di circa 11 kJ. L'energia richiesta per trattare la stessa quantità di acqua con la metodica PEF è di circa 12 J, con un ovvio vantaggio in termini di risparmio energetico nell'utilizzo dei PEF [15]. A seconda del tipo di applicazione il consumo specifico di energia varia in un intervallo tra 10 e 100 kJ/l di prodotto. Più piccole sono cellule bersaglio, maggiore è l'intensità di trattamento richiesto. Su scala commerciale deve essere previsto un costo totale di 10 euro/ton (1 Eurocent per litro o kg) per l'inattivazione microbica [16]. Attualmente, ci sono diverse realtà aziendali che realizzano sistemi PEF per il trattamento degli alimenti: PurePulse Technologies, Inc. in Olanda, Elea Quakenbrück in Germania, PulseMaster in Stati Uniti e Olanda, Scandinova in Svezia. PulseMaster, ad esempio, ha sviluppato un dispositivo su scala industriale con capacità di trattamento fino a 5000 l/h per l'inattivazione microbica. Il generatore di impulsi e diverse camere di trattamento sono disponibili per soddisfare esigenze specifiche di

ricerca in versione compatta e modulare, per una facile integrazione nei diversi sistemi industriali. L'azienda è disponibile a collaborazioni con imprese commerciali ed enti di ricerca interessati ad esplorare applicazioni specifiche della tecnologia PEF per l'inattivazione microbica negli alimenti.

2 Analisi della normativa nazionale ed internazionale in materia di PEF

Come per tutti i beni di consumo, la qualità dei prodotti alimentari, ossia la capacità di soddisfazione dei bisogni del consumatore, è il risultato di un insieme di fattori. Tra questi sicuramente sono da considerare:

1. igiene e salubrità (sicurezza alimentare);
2. caratteristiche organolettiche e nutrizionali (sapore, odore, aroma, colore, componenti nutritivi, etc.);
3. elementi di utilizzazione (conservabilità, facilità d'uso, tipo di confezionamento, etc.).

A ciascuna di tali esigenze occorre dare risposta tramite individuazione dei requisiti che ne garantiscono il soddisfacimento (riferimenti normativi) e verifica e attestazione della conformità a tali requisiti (certificazione di conformità). La sicurezza alimentare costituisce il requisito di base che deve essere sempre e comunque soddisfatto. Tra le procedure che influiscono sui fattori su menzionati, ci sono sicuramente le procedure di conservazione. Queste, oltre a garantire l'eliminazione o l'inattivazione dei microorganismi che pregiudicano la qualità dell'alimento nel tempo, devono garantire anche il mantenimento delle sue caratteristiche originarie. Per questo motivo la normativa prevede per alcune procedure precisi limiti di salvaguardia. È questo il caso delle procedure di trattamento attraverso radiazioni ionizzanti. In questo capitolo viene presentato il quadro normativo di riferimento relativo alla sicurezza alimentare e ai campi elettrici pulsati. Vista l'assenza di regolamentazione specifica relativa all'utilizzo dei PEF nell'industria alimentare, a titolo di riferimento, si riportano alcuni dettagli relativi all'irraggiamento con radiazioni ionizzanti e alla relativa normativa.

2.1 Standard ISO 22000

Un documento di riferimento nel campo della sicurezza alimentare è costituito dallo standard ISO 22000. Questo è stato analizzato al fine di verificare eventuali vincoli per l'uso di PEF in campo alimentare.

La ISO 22000 "Food safety management systems--Requirements for any organization in the food chain" [17] è uno standard volontario per la certificazione di sistemi di gestione della sicurezza in campo alimentare. Essa è stata concepita per essere compatibile e armonizzata con le altre norme internazionali per i sistemi di gestione come ad esempio la norma ISO 9001. Si tratta quindi di una norma che può essere integrata con i sistemi e i processi già esistenti.

La norma ISO 22000 è applicabile a tutte le aziende che operano in forma diretta o indiretta lungo tutta la filiera agroalimentare, inclusi i produttori di packaging o detergenti, le imprese di pulizia, le società di disinfestazione, le lavanderie industriali, fornitori di servizi, etc.

Questa norma consente alle imprese del settore di valutare e dimostrare la conformità dei prodotti in termini di sicurezza alimentare e di garantire un controllo efficace dei fattori di rischio. Lo standard garantisce la sicurezza agroalimentare dalla produzione agricola alla tavola sulla base di elementi fondamentali riconosciuti a livello internazionale da tutti gli operatori del settore.

Con la certificazione ISO 22000 le aziende hanno la possibilità di:

1. armonizzare i differenti standard specifici riguardanti la sicurezza alimentare;
2. fornire uno strumento per sviluppare il metodo HACCP in tutto il sistema produttivo del settore alimentare;
3. pianificare, attuare, rendere operativo, mantenere e aggiornare un sistema per la gestione della sicurezza alimentare;
4. assicurare la conformità ai requisiti di legislativi applicabili per la sicurezza alimentare;
5. valutare e definire i requisiti del cliente e dimostrarne la conformità al fine di aumentarne la soddisfazione;
6. organizzare e dare uno scopo alla sicurezza alimentare attraverso la comunicazione con i propri partner commerciali;
7. ottimizzare le risorse lungo la filiera.

Il tutto si basa su dei prerequisiti: adozione degli schemi di Good Manufacturing Practice, Good Hygiene Practice, Good Agricultural Practice, Principi HACCP e delle procedure di manutenzione per attrezzature ed edifici e di disinfestazione evitando appesantimenti di carattere burocratico. I vantaggi della certificazione ISO 22000 perciò sono molteplici, ma il principale è rappresentato dai miglioramenti tangibili e dimostrabili

nelle prestazioni in ambito di sicurezza agroalimentare e da maggiori livelli di garanzia del rispetto della conformità legislativa, comprendere e identificare i rischi effettivi ai quali sono potenzialmente esposti sia l'azienda sia i consumatori. Implementare strumenti finalizzati a misurare, monitorare e ottimizzare in modo efficace tutte le performance relative alla sicurezza agroalimentare. Rispettare in modo ottimale i vincoli imposti dalla legislazione e i requisiti aziendali. Si tratta anche di un elemento particolarmente importante per dimostrare l'impegno di un'azienda nei confronti della sicurezza alimentare nel pieno rispetto dei requisiti di Corporate Governance, Responsabilità Sociale d'Impresa e Bilancio di Sostenibilità. Lo sviluppo, l'implementazione e la certificazione secondo la norma ISO 22000 costituiscono un percorso in evoluzione che permette all'azienda di operare secondo una logica di miglioramento continuo. Le verifiche effettuate da una terza parte indipendente sono un elemento fondamentale di questo processo.

2.2 Normativa europea ed italiana

Il riferimento normativo europeo riguardo le problematiche alimentari con particolare riguardo alla sicurezza si possono trovare sul sito web http://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/index_en.htm. In particolare su http://ec.europa.eu/food/safety/biosafety/index_en.htm si trovano i riferimenti relativamente alla cosiddetta "sicurezza biologica" (biological safety). Pericoli biologici includono batteri, virus, parassiti, prioni, biotossine. Alcuni di questi pericoli hanno posto seri rischi per la salute pubblica per cui l'esposizione dei consumatori attraverso gli alimenti deve quindi essere evitata il più possibile.

Un quadro giuridico completo è stato istituito dalla Commissione Europea per aumentare il livello di sicurezza alimentare in Europa, costruendo nel tempo la fiducia dei consumatori europei, evitando crisi alimentari. Essa si basa sul parere scientifico espresso dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA).

Le misure sulla sicurezza biologica degli alimenti sono complementari ad altre norme, come quelle sui sottoprodotti di origine animale non destinati al consumo umano, la salute e benessere degli animali, l'igiene dei mangimi.

Riguardo ai PEF, la ricerca di specifica normativa europea e italiana tuttavia non ha portato ad alcun risultato.

Oltre alla regolamentazione esistente sono stati consultati anche i ricercatori dell'Istituto Superiore di Sanità che hanno confermato di non essere a conoscenza di alcuna normativa in proposito. Questo rende la ricerca in questo settore non vincolata da normativa esistente.

Nella sicurezza biologica riveste particolare importanza l'irraggiamento degli alimenti che ha una sezione propria. A titolo di riferimento per eventualmente fornire alle autorità competenti utili spunti per integrare la regolamentazione anche riguardo alle procedure in questo specifico campo, si riportano alcuni dettagli relativi all'irraggiamento con radiazioni ionizzanti e alla relativa normativa esistente.

L'irraggiamento rappresenta una tecnologia di conservazione che ha lo scopo di promuovere la sicurezza e la qualità igienica degli alimenti. Il processo consiste nel sottoporre l'alimento a quantità ben definite di radiazioni ionizzanti per inattivare il materiale genetico delle cellule microbiche inibendone la suddivisione, e per alterare l'attività degli enzimi degradativi presenti negli alimenti rallentandone il deterioramento. L'irraggiamento trova quindi applicazione nell'inibizione della germogliazione dei tuberi e dei bulbi, nella riduzione della carica microbica di batteri saprofiti in carni, pollame e pesci freschi, nella inattivazione dei batteri patogeni in prodotti deperibili e in alimenti congelati, nella inattivazione degli insetti infestanti, inclusi gli stati larvali, e i parassiti.

Attualmente in Europa il trattamento con radiazioni ionizzanti è disciplinato dalle direttive quadro 1999/2/CE e 1999/3/CE recepite nel nostro Paese dal DL.vo 30 gennaio 2001, n. 94. Tali direttive stabiliscono, a maggior tutela della libera scelta del consumatore, che tutti gli alimenti e/o ingredienti che vengono sottoposti al trattamento con radiazioni ionizzanti, debbano riportare in etichetta la dicitura "irradiato" e che ogni stato membro debba effettuare controlli sugli alimenti presenti sul mercato al fine di individuare la correttezza dell'etichettatura.

A tal fine, la normativa vigente demanda all'ISS il compito di segnalare alle autorità sanitarie preposte ai controlli, i metodi atti ad identificare un alimento irradiato e di fornire supporto tecnico-scientifico alle strutture che operano per il controllo ufficiale degli alimenti.

In tale ambito il dipartimento svolge:

- attività di formazione
- attività di consulenza
- attività di ricerca, sviluppo ed estensione dei metodi di identificazione sia di tipo chimico che fisico
- valutazione critica dei diversi metodi di identificazione al fine di elaborare documenti utili per indirizzare i laboratori deputati al controllo alla scelta dei metodi di analisi più idonei
- programmi di monitoraggio al fine di individuare problematiche emergenti relativamente alla presenza sul mercato nazionale di alimenti e/o ingredienti che risultano non correttamente etichettati.

In particolare il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare collabora con il Dipartimento di Tecnologie e Salute per lo studio e lo sviluppo dei metodi di tipo fisico basati sulle tecniche di luminescenza e di risonanza di spin elettronico.

L'attività di ricerca e sviluppo dei metodi di analisi viene svolta attraverso la partecipazione a:

- programmi di interconfronti sia nazionali che internazionali;
- progetti finanziati dal Ministero della Salute, a cui partecipano alcuni IZZSS e altri enti di ricerca, con l'obiettivo finale della creazione di una rete di laboratori in grado di effettuare i controlli e monitorare la presenza sul mercato di prodotti non conformi.

Il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare inoltre si occupa delle problematiche relative alla sicurezza d'uso e alla adeguatezza nutrizionale degli alimenti irradiati.

Il trattamento con radiazioni ionizzanti e la commercializzazione degli alimenti irradiati sono attualmente disciplinati dal DL.vo 30 gennaio 2001, n. 94 che dà attuazione alle direttive comunitarie 1999/2/CE e 1999/3/CE relative al riavvicinamento delle legislazioni degli Stati membri.

La normativa stabilisce il campo di applicazione, le finalità e le condizioni del trattamento, ivi comprese le sorgenti di radiazioni che possono essere utilizzate per il trattamento, le procedure per calcolare la dose globale media assorbita dall'alimento durante il trattamento e i requisiti igienici dei prodotti alimentari da sottoporre al trattamento stesso. La normativa stabilisce anche che il trattamento dei prodotti con radiazioni ionizzanti deve avvenire solo in impianti muniti di autorizzazione. Le direttive comunitarie hanno inoltre previsto l'adozione di una lista positiva di prodotti che possono essere trattati con radiazioni ionizzanti. Attualmente tale lista comprende una sola categoria di prodotti: le erbe, le spezie e i condimenti vegetali alla dose massima di 10 kGy. In attesa che a livello comunitario vengano inserite altre tipologie alimentari, la direttiva prevede che ogni stato membro possa mantenere le autorizzazioni nazionali vigenti, purché l'irradiazione e l'immissione sul mercato siano effettuate in conformità alle disposizioni dettate dalla direttiva.

In particolare in Italia oltre alle erbe aromatiche e spezie, autorizzate con il Decreto Ministeriale del 18 luglio 1996, è consentito il trattamento a scopo antigermogliativo di patate, cipolle ed aglio (DM 30 agosto 1973).

La lista degli alimenti che sono stati autorizzati negli altri stati membri è riportata nell'Elenco delle autorizzazioni degli Stati membri relative agli alimenti e ai loro ingredienti che possono essere trattati con radiazioni ionizzanti. La normativa vigente stabilisce inoltre che i prodotti trattati con radiazioni ionizzanti devono riportare in etichetta la dicitura "irradiato" con l'indicazione della denominazione e dell'indirizzo dell'impianto che ha effettuato l'irradiazione oppure il suo numero di riferimento.

A tutela del consumatore, le direttive comunitarie ribadiscono l'importanza dei controlli ufficiali che tutti gli Stati membri devono effettuare sui prodotti in fase di commercializzazione. Questi controlli hanno lo scopo di identificare un alimento come irradiato o non irradiato permettendo così la verifica della corrispondenza dell'etichetta alla normativa vigente.

La disponibilità di metodi atti ad identificare gli alimenti irradiati è un prerequisito richiesto da molti paesi per l'autorizzazione all'irraggiamento. Tali metodi devono offrire la possibilità di verificare inequivocabilmente se un alimento sia stato trattato o meno con radiazioni ionizzanti e devono poter essere applicati sull'alimento in fase di commercializzazione. L'applicazione di tali metodi rappresenta uno strumento essenziale per verificare la corretta etichettatura, per controllare gli scambi commerciali e per informare i consumatori e le aziende.

Le ricerche sui metodi di identificazione degli alimenti irradiati, condotte negli ultimi dieci anni, hanno portato fino ad ora all'emanazione da parte del CEN (Comitato di Normazione Europeo), di un numero sufficiente di metodi, alla cui validazione hanno contribuito anche i ricercatori dell'ISS attraverso la partecipazione a progetti europei e internazionali.

Allo stato attuale non esiste nessun metodo generale applicabile a tutti i tipi di alimenti irradiati, ma metodiche specifiche per matrici alimentari diverse.

Inoltre i metodi finora standardizzati sono di tipo qualitativo; i controlli sulla corretta applicazione delle dosi consentite sono parte della verifica delle buone pratiche di irraggiamento degli impianti, durante la quale vengono fatti controlli di dosimetria dai quali si può risalire direttamente alla dose applicata. Attualmente l'attività di ricerca in tale settore è finalizzata anche alla verifica dell'applicabilità di alcuni dei metodi di identificazione per una valutazione quantitativa attraverso la quale è possibile risalire alla dose di trattamento. I metodi che si prestano di più a questo tipo di analisi sono quelli la termoluminescenza, la GC-MS e la risonanza di spin elettronico.

Di seguito viene riportato l'elenco dei metodi attualmente disponibili suddivisi in metodi di screening e metodi di conferma. I metodi di screening offrono il vantaggio di essere semplici, rapidi e poco costosi e sono utilizzati generalmente dai laboratori deputati alle analisi di prima istanza. I metodi di conferma, più complessi, attualmente sono utilizzati dall'ISS per l'analisi di revisione e per la conferma di campioni risultati positivi nei piani di monitoraggio attuati a livello regionale, e dall'Istituto Zooprofilattico della Puglia e Basilicata che è al momento l'unico Laboratorio accreditato per i metodi di conferma di tipo fisico, sia su matrici animali che vegetali.

Si riportano, di seguito, le specifiche norme riguardanti metodi di screening e metodi di conferma. La normativa sui metodi di screening è inclusa in

- EN 13783/2001 (Conta diretta su filtro in epifluorescenza/conta in piastra) applicabile ad erbe e spezie
- EN 13784/2001 (DNA comet assay) applicabile a vari tipi di carni, semi, frutta secca e spezie
- EN 13751:2002 (Luminescenza stimolata otticamente) applicabile a erbe, spezie, molluschi e crostacei
- EN 14569: 2004 (LAL test/conta gram negativi) applicabile a carne di pollo

Mentre per i metodi di conferma ci si riferisce a

- EN 1784:2003 (Gascromatografia degli idrocarburi) applicabile a pollo, maiale e manzo, camembert, avocado, papaya e mango
- EN 1785:2003 (Gascromatografia /spettrometria di massa dei 2-alchilciclobutanoni) applicabile a pollo e maiale, uova
- EN 1786:1996 (Risonanza di spin elettronico dell'idrossiapatite) applicabile a pollo, manzo, trote contenenti osso
- EN 1787:2000 (Risonanza di spin elettronico della cellulosa) applicabile a pistacchi, paprika, fragole
- EN 1788:2001 (Termoluminescenza) applicabile a erbe, spezie, gamberetti, patate, frutta e vegetali
- EN 13708:2001 (Risonanza di spin elettronico della cellulosa) applicabile a mango, papaia, uvetta essiccati

Informazioni relative agli scopi, ai principi, alle limitazioni e alla validazione di ciascun metodo sono riportate nel Rapporto ISTISAN 04/21 pubblicato dall'Istituto. Il Rapporto ISTISAN 07/4 riporta i dati dell'indagine effettuata all'importazione su spezie ed erbe, incluse quelle utilizzate negli integratori alimentari, effettuata dall'ISS.

3 Analisi della cinetica di inattivazione microbica dovuta ai PEF

La conservazione degli alimenti mediante trattamento PEF è il risultato della distruzione delle cellule microbiche presenti e potenzialmente patogene. Tale distruzione avviene mediante un fenomeno definito come elettroporazione e che coinvolge il comportamento fondamentale delle cellule e di tutte le membrane a doppio strato fosfolipidico. La comprensione dei meccanismi fondamentali alla base dell'elettroporazione e delle variabili che influenzano tale fenomeno in relazione all'applicazione dei PEF è molto importante, e fornisce la motivazione di questa analisi.

In questo capitolo vengono discusse le caratteristiche principali della teoria dell'elettroporazione, le variabili che influenzano tale fenomeno ed i modelli teorici che sono state proposti per descrivere i risultati sperimentali ottenuti dalla ricerca scientifica nel settore. I principali modelli cinetici basati su studi di laboratorio sono stati analizzati e riportati, insieme alle loro potenzialità e limitazioni. In questo modo, è stato possibile analizzare l'effetto di alcuni parametri di trattamento sul tasso di inattivazione dei vari microrganismi ed, in particolare, di quantificare tale effetto in termini di riduzione logaritmica.

3.1 Teoria dell'elettroporazione

L'elettroporazione è il fenomeno per il quale una cellula esposta a campi elettrici pulsati ad alta intensità destabilizza temporaneamente il doppio strato lipidico e le proteine della propria membrana cellulare [18]. La teoria attuale propone che il processo di elettroporazione sia dovuto all'effetto fisiologico di formazione di pori transmembrana [19]. L'ipotesi venne formulata da Kinosita e Tsong per la prima volta nel 1977, dimostrando che un campo elettrico di 2,2 kV/cm generava pori di circa 1 nm di diametro nelle cellule eritrocitarie umane [20]. Il termine elettroporazione venne coniato qualche anno più tardi da Neumann e da i suoi colleghi [21]. Quando l'elettroporazione conduce alla lisi cellulare si parla di elettroporazione irreversibile, questa avviene quando il campo elettrico è tale da provocare una permeabilizzazione permanente della membrana cellulare. Al contrario, nella elettroporazione reversibile, una volta cessata l'applicazione del campo elettrico, la capacità della membrana di ricostruire la sua struttura permette ad una data cellula di sopravvivere e proliferare anche dopo il trattamento, in seguito alla richiusura dei pori [22].

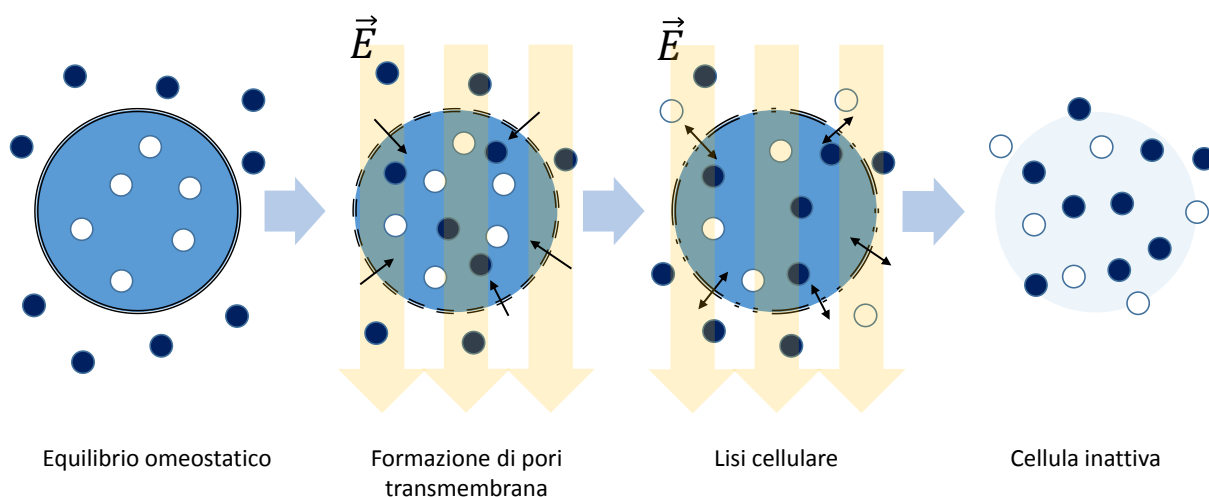


Figura 2. Meccanismo d'azione dell'elettroporazione irreversibile di una cellula.

Una rappresentazione schematica del processo di elettroporazione è mostrata in Figura 2. Dopo essere stato esposto ad un campo elettrico, pori idrofobi vengono spontaneamente e casualmente generati a causa del moto termico delle molecole di fosfolipidi in seguito ad un aumento del potenziale transmembrana indotto. La posizione e le dimensioni di questi pori variano in modo casuale. Se il potenziale transmembrana supera un valore critico, viene superata una barriera di energia che porta alla formazione di pori idrofili, molto più stabili, seguita da un'espansione tempo-dipendente delle dimensioni

dei pori. In questo modo la membrana plasmatica delle cellule diventa permeabile a piccole molecole, e poi a molecole sempre più grandi. Tale permeazione provoca il rigonfiamento della cellula e l'eventuale rottura della membrana cellulare, o lisi cellulare [23]. Pori di dimensioni maggiori possono essere ottenuti aumentando l'intensità del campo elettrico e la durata dell'impulso o riducendo la forza ionica del mezzo di sospensione. È stato dimostrato che un potenziale transmembrana dell'ordine di 1 V è sufficiente a condurre le cellule ad una elettroporazione irreversibile [24, 25].

Per le caratteristiche appena elencate, l'elettroporazione è un metodo efficace per incrementare la permeabilità delle membrane cellulari a diverse molecole, altrimenti non in grado di attraversare il doppio strato fosfolipidico (è il caso dell'elettroporazione reversibile) o per distruggere classi di cellule bersaglio (nel caso di elettroporazione irreversibile). Essa, quindi, è una tecnica che può essere utilizzata in diverse applicazioni tecnologiche, come l'introduzione di chemioterapici o geni specifici all'interno di cellule malate [26, 27], la fusione per favorire la rigenerazione tissutale [28], l'ablazione dei tessuti danneggiati o tumorali [29], e la conservazione di alimenti [5]. Tuttavia, a causa della mancanza di una teoria accertata relativa ai processi molecolari in atto durante l'applicazione dei PEF, i modelli cinetici per l'inattivazione microbica sono prevalentemente di tipo empirico e si basano su esperimenti specifici con particolari prodotti e ceppi di microrganismi [5]. Prima di descrivere i modelli di inattivazione microbica utilizzati in letteratura, i fattori che influenzano l'efficacia dei PEF

3.2 Variabili di influenza

Dai lavori scientifici pubblicati riguardanti l'elettroporazione, l'efficacia del trattamento PEF (ovvero l'inattivazione microbica mediante PEF) risulta dipendente da diverse variabili di influenza. Queste possono essere raggruppate in tre classi principali:

1. Fattori di processo: le variabili determinate dalla modalità di erogazione dei PEF e dalle caratteristiche della strumentazione di trattamento (intensità del campo elettrico, durata dell'impulso, tempo di trattamento, temperatura, forma d'onda degli impulsi, etc.);
2. Fattori microbiologici: le variabili determinate dalle caratteristiche dei microrganismi da inattivare, quindi potenzialmente patogeni, presenti nel prodotto (tipologia, dimensione, concentrazione, stadio di crescita, etc.);
3. Fattori di prodotto: le variabili determinate dalle caratteristiche dell'alimento (pH, conducibilità elettrica, densità, etc.).

In seguito vengono forniti ulteriori dettagli, reperiti dalla letteratura scientifica, relativi alle variabili di influenza e a come queste possono avere impatto sull'inattivazione microbica.

3.2.1 Fattori di processo

Tra tutte le variabili di influenza, l'intensità del **campo elettrico** applicato è sicuramente il principale fattore in grado di determinare l'entità dell'inattivazione microbica ottenuta [7]. In particolare, la percentuale di inattivazione aumenta all'aumentare dell'intensità del campo elettrico solo al di sopra un valore di soglia, definito campo elettrico critico, E_c , al di sotto del quale, al contrario, non si verifica l'inattivazione dei microrganismi presenti. Questo risultato, rilevato dagli studi sperimentali, è coerente con la teoria dell'elettroporazione (cfr. paragrafo 4.1) secondo la quale la differenza di potenziale transmembrana indotta è proporzionale al campo elettrico applicato. Tuttavia, come vedremo nel seguito di questo lavoro, il valore di E_c dipende, a sua volta, dalla tipologia di microrganismo bersaglio, dalle sue dimensioni e struttura, o dall'orientamento del campo elettrico [19, 30], ma anche dalle proprietà del mezzo di sospensione [7].

Il **tempo di trattamento**, definito come il prodotto del **numero di impulsi** e della **durata del singolo impulso** [7], è a sua volta responsabile dell'effetto ottenuto mediante PEF sulla vitalità dei microrganismi. I valori di lunghezza dei singoli impulsi utilizzati in letteratura variano dall'ordine dei ns all'ordine dei ms. Studi sperimentali hanno mostrato come lunghezze maggiori portino ad una riduzione del valore di E_c e che la richiusura dei pori transmembrana può avvenire tra un impulso e l'altro. Tuttavia, un elevato numero di impulsi a lunga durata, o a maggiore frequenza, determina un incremento di temperatura eccessivo e può anche condurre alla generazione di reazioni chimiche avverse sulla superficie degli elettrodi [5]. Inoltre,

alcuni studi hanno evidenziato che il numero di impulsi applicato comporta un livello di saturazione [31]. Esiste quindi anche un tempo critico, t_c , dopo il quale l'applicazione di impulsi aggiuntivi non ha influenza sul livello di inattivazione. Il valore di t_c dipende, a sua volta, dal campo elettrico applicato e diminuisce all'aumentare del campo elettrico [7]. Il gruppo di Barbosa-Cánovas ha riportato che utilizzando un'intensità di campo elettrico di 1,5 volte superiore a E_c , il valore di t_c rimane costante [31]. Utilizzando treni di impulsi intervallati da periodi di pausa è possibile lavorare con campi elettrici inferiori; bisogna però fare in modo di mantenere bassa la temperatura del campione trattato [32].

Una ulteriore ed importante fattore di processo è la **forma dell'impulso**. Sono state testate diverse forme d'onda che, come visto nel paragrafo 2.5, possono essere rettangolari, esponenziali decrescenti, oscillatorie, o bipolari [5]. Non è stata ancora determinata in modo univoco la forma dell'impulso più efficiente per la conservazione dei cibi. Diversi studi di confronto sull'efficienza delle diverse forme d'onda suggeriscono che gli impulsi rettangolari sono i più vantaggiosi dal punto di vista energetico [7, 33, 34]. Utilizzando impulsi bipolari, inoltre, si ottiene un cambiamento alternato delle molecole polari transmembrana e questo causa uno stress aggiuntivo alla cellula, favorendone l'inattivazione. L'utilizzo di impulsi ad inversione di carica istantanea, che abbattano il tempo di rilassamento tra un impulso e l'altro rispetto agli impulsi bipolari anche ad alta frequenza, può permettere di sfruttare al meglio questa proprietà. La creazione di alti livelli di ampiezza dell'impulso, con lunghezze basse, ad oggi, richiede attrezzature speciali ed ingombranti. Un'ulteriore sfida tecnologica è la creazione di un impulso di forma rettangolare con lunghezza nell'ordine dei nanosecondi.

È necessario considerare che l'obiettivo fondamentale nell'utilizzo di tecnologie non termiche è quello di eliminare gli effetti collaterali delle elevate temperature raggiunte dai trattamenti termici mantenendo il prodotto sicuro. La **temperatura** del prodotto durante tutte le fasi del trattamento PEF è quindi un fattore critico per l'efficienza e per la qualità del processo stesso [31, 35, 5]. La temperatura determina una variazione dell'efficacia del trattamento PEF a causa della sua influenza sulla fluidità (ovvero sulla permeabilità) e stabilità della membrana cellulare [35, 5, 7]. Diversi studi di laboratorio hanno riportato significativi miglioramenti dell'efficienza del trattamento a moderate temperature (50-60°C) [5, 7]. Inoltre, diverse ricerche hanno dimostrato che un moderato aumento della temperatura da 30 a 37 °C facilita una tenuta dei pori in membrana e quindi consente ad alcuni microrganismi di sopravvivere, mentre l'incubazione a basse temperature tra i 4 e 10 °C riesce a stabilizzare i pori, aumentando così il tasso di inattivazione [36, 20]. Questo mostra che un sistema di raffreddamento dovrebbe essere attuato al termine del processo di trattamento per stabilizzare i pori, mentre un dispositivo di riscaldamento deve precedere il processo al fine di aumentare la percentuale di formazione di pori più grandi [5]. Una particolare attenzione deve essere rivolta ai cambiamenti di conducibilità elettrica del prodotto all'interno della camera di trattamento che sono dovuti alle variazioni di temperatura e che possono causare: 1) cadute di potenza e 2) inomogeneità del campo elettrico. Il primo effetto deve essere monitorato mediante un sistema di controllo, il secondo, che può essere dovuto alle temperature più elevate che si generano all'interfaccia prodotto-camera di trattamento, può essere minimizzato mediante l'ottimizzazione della geometria della camera di trattamento in funzione di distribuzioni di campo più omogenee [37].

3.2.2 Fattori microbiologici

L'efficacia dei PEF, da un punto di vista microbiologico, dipende da una serie di fattori microbici indipendenti della tecnica di inattivazione stessa. Sono state infatti osservate differenze significative nei valori critici, E_c e t_c , necessari per l'inattivazione di varietà diverse e ceppi di microrganismi [38]. Tra i fattori microbiologici individuati ci sono il tipo di microrganismo bersaglio (dimensioni, forma, genere, specie), la fase di crescita, la storia di stress ambientale subita, la concentrazione cellulare, e la fase di crescita [30, 39, 38, 40, 41, 22, 31, 42, 43, 22].

È stato dimostrato che l'intensità del campo elettrico critico aumenta quando la **dimensione della cellula** (il raggio per le cellule sferiche o l'asse minore per le cellule ellittiche) diminuisce [7]. A parità di dimensioni, anche le variazioni di **forma delle cellule** influenzano il campo elettrico necessario alla loro disattivazione. Ad esempio, una cella a bastoncino richiede un campo elettrico cinque volte più forte di quello richiesto da una cellula sferica di dimensioni paragonabili [30].

In Tabella 1 vengono riassunte alcune caratteristiche morfologiche e la classe di appartenenza dei principali microrganismi patogeni responsabili della contaminazione degli alimenti.

Tabella 1. Classificazione, geometria e dimensioni medie per i principali microrganismi di interesse [44]

Organismo	Classificazione	Geometria	Dimensioni medie (μm)
Listeria monocytogenes / innoqua	Gram +	Bastoncello	0.4-0.5 x 0.5-2
Listeria mesenteroides	Gram +	Bastoncello	0.5-0.7 x 0.7-1.2
Yersinia enterocolitica	Gram -	Bastoncello	0.5-0.8 x 1-3
Pseudomonas aeruginosa	Gram -	Bastoncello	0.5-0.6 x 1.5
Pseudomonas fluorescens	Gram -	Bastoncello	0.3-0.5 x 1-1.8
Lactobacillus brevis	Gram +	Bastoncello	0.7-1.0 x 2-4
Bacillus subtilis	Gram+	Bastoncello	0.5-2.5 x 1.2-10
Lactobacillus plantarum	Gram +	Bastoncello	0.9-1.2 x 3-8
Salmonella	Gram -	Bastoncello	0.7-1.5 x 2-5
Klebsiella Pneumoniae	Gram -	Bastoncello	0.3-0.5 x 5
Escherichia coli	Gram -	Bastoncello	1-1.5 x 2-6
Saccharomyces cerevisiae	Lievito	Ellissoidale	3-15 x 2-8
Staphilococcus aureus	Gram +	Sferica	0.8-1
Pediococcus parvulus	Gram +	Sferica	0.7-1.1
Candida albicans	Lievito	Ellissoidale	2-10 x 2-10
Leuconostoc Mesenteroides	Gram +	Ellissoidale	0.5-0.7 x 0.7-1.2

Differenze nell'efficacia del trattamento PEF sono dovute sia a variazioni morfologiche che alle proprietà biochimiche delle varie parti che compongono le cellule, in modo particolare della loro membrana cellulare [85]. La **struttura della membrana cellulare** varia tra batteri Gram+ e Gram-. Alcuni studi comparativi hanno verificato che i batteri Gram+ ed i lieviti sono meno sensibili al trattamento PEF rispetto a batteri Gram- [5]. I risultati sono però possono essere contrastanti e mostrano che diverse assunzioni generali funzionano, in realtà, solo in condizioni particolari, ad esempio a parità di pH o di numero di impulsi. Il meccanismo molecolare che può spiegare le differenze e contribuire a prevedere il campo elettrico necessario a disattivare le varie tipologie di batteri non è ancora chiaro e ulteriori studi sono ancora necessari per quantificare e caratterizzare le differenze riscontrate.

La **concentrazione iniziale** di microrganismi è un parametro in grado di influenzare l'efficienza del trattamento PEF [7]. Questo effetto potrebbe essere dovuto alla clusterizzazione delle cellule nelle regioni a bassa intensità di campo elettrico, ma anche in questo caso i risultati riportati in letteratura sono contrastanti.

Un'indicazione generale è fornita per quanto riguarda lo **stadio di crescita** della cultura cellulare: le cellule in fase logaritmica sono più sensibili allo stress indotto dai PEF rispetto alle cellule in fase stazionaria [7]. Questo perché la crescita microbica in fase logaritmica è caratterizzata da una elevata percentuale di cellule in fase di divisione, durante la quale la membrana cellulare è più suscettibile al campo elettrico applicato. Tuttavia, uno studio eseguito da Molinari e colleghi [43], nel quale è stata investigata l'influenza della fase di crescita e della concentrazione cellulare sull'efficienza del trattamento PEF, per esempio, ha concluso che nel lievito l'inattivazione dipende dalla concentrazione cellulare, ma non dalla fase di crescita cellulare. Il meccanismo molecolare della resistenza microbica ai PEF nella fase di crescita stazionaria è una questione ancora aperta e di crescente interesse. Alcuni studiosi suggeriscono che la resistenza delle cellule non dipenda dalla fase di crescita, ma piuttosto riguarda una capacità intrinseca delle cellule di riparare i danni subiti durante queste fasi, mediante la sintesi di proteine specifiche [22].

3.2.3 Parametri di prodotto

Poiché i prodotti alimentari da trattare sono materiali complessi, le loro caratteristiche possono influenzare sia le variabili fisiche del processo, come la reale intensità di campo elettrico sviluppata o le variazioni di temperatura, sia i fattori biologici, come il tasso di crescita e l'efficienza nella richiusura dei pori

transmembrana, poiché l'alimento rappresenta il terreno di coltura dei microrganismi. La proprietà dielettriche di un alimento sono strettamente legate alla sua struttura e composizione chimico-fisica.

La **conducibilità** elettrica di un mezzo, definita come la sua abilità di condurre la corrente elettrica, è una variabile importante nel trattamento PEF. Alimenti con elevata conducibilità generano valori di picco inferiori di campo elettrico attraverso la camera di trattamento e non sono per questo adatti al trattamento PEF [7].

Da un punto di vista elettrico, l'alimento o mezzo di sospensione all'interno della camera di trattamento può essere modellato da un resistore in parallelo ad condensatore. Il valore della resistenza, R , e della capacità, C , corrispondenti dipendono entrambi dalla geometria della camera di trattamento. Mentre C dipende dalla permittività dielettrica dell'alimento, che in genere è prossima a quella dell'acqua ($\epsilon \approx 80$ F/m), il valore di R è inversamente proporzionale alla conducibilità elettrica dell'alimento. Poiché la costante di tempo del sistema è inferiore a $1 \mu\text{s}$ di diversi ordini di grandezza, il mezzo di sospensione può essere modellato semplicemente come un resistore per la durata dell'impulso. In virtù del comportamento resistivo del carico, la forma d'onda di tensione, corrente ed intensità di campo elettrico sono quasi identiche.

La conducibilità elettrica del liquido, k , determina la caduta di tensione attraverso la camera di trattamento. La potenza specifica, W , richiesta per unità di volume, V , durante il tempo, t_t , di trattamento per generare un campo elettrico, E , dipende dalla conducibilità elettrica del mezzo:

$$W = \frac{1}{V} \int_0^{t_t} k \cdot E(t)^2 dt.$$

Tale potenza viene dissipata per effetto Joule producendo un incremento della temperatura, ΔT , che in condizioni adiabatiche equivale a

$$\Delta T = \frac{W}{V} c_p,$$

dove c_p indica il calore specifico del mezzo. L'incremento di temperatura causa variazioni della conducibilità del mezzo e della distribuzione di campo elettrico, aumentando le prestazioni energetiche richieste del sistema [30]. La dipendenza di k dalla temperatura può essere approssimata da una funzione lineare [30]. In Tabella 2 sono riportate le principali proprietà fisiche degli alimenti adatti al trattamento PEF, inclusi i valori della pendenza, dk/dW , della retta approssimante la dipendenza della conducibilità dalla temperatura. A parità di potenza applicata, un aumento della conducibilità elettrica genera valori inferiori di picco del campo elettrico all'interno della camera di trattamento con conseguente diminuzione del tasso di inattivazione microbica [45]. Questo comporta delle limitazioni nel range di conduttività degli alimenti in cui gli impulsi elettrici possono essere applicati, nell'intervallo da 0,1 a 0,5 S/m [38]. Prodotti con elevata conducibilità elettrica riducono la resistenza della camera e quindi richiedono più energia per ottenere una determinata intensità di campo elettrico. Pertanto, quando si elaborano prodotti ad alto contenuto di sale, il sale dovrebbe essere aggiunto dopo il processamento in modo da aumentare l'efficienza del trattamento. Inoltre, durante le scariche elettriche, la temperatura del mezzo dipende sempre dall'energia erogata nell'unità di volume (cfr. paragrafo 4.2.1). Questo porta a cambiamenti della conduttività media e quindi, della distribuzione del campo elettrico, e aumenta il consumo di energia necessario al sistema [8, 30]. Infine, la presenza di particolato in un alimento liquido causa la formazione di archi elettrici all'interfaccia liquido-particella in virtù del "salto" nelle caratteristiche dielettriche tra di essi. Per le considerazioni fatte, liquidi omogenei a bassa conducibilità elettrica offrono quindi le condizioni ideali. In Tabella 2 si riportano le proprietà fisiche di alcuni alimenti adatti al trattamento PEF [46].

Tabella 2. Proprietà fisiche di alcuni alimenti adatti al trattamento PEF [46]

Prodotto	Conducibilità elettrica k (S/m) per $T=20$ °C	Calore specifico c_p (kJ/K·kg)	Variazione di conducibilità dk/dW (S·kJ/m·Kg)	Densità ρ (kg/m ³)	Conducibilità termica λ (W/m·K)	Diffusività termica a (10 ⁻⁷ m ² /s)	Viscosità μ (10 ⁻³ Pa·s)	Numero di Prandtl Pr (—)
Acqua	0.06	4.18	0.301×10^{-3}	998	0.60	1.45	1.00	7.0
Birra (Lager)	0.20	3.80	1.211×10^{-3}	1007	0.52	1.36	1.45	10.6
Succo di mela	0.29	3.85	1.958×10^{-3}	1040	0.56	1.40	1.93	13.3
Succo d'arancia	0.44	3.77	2.801×10^{-3}	1040	0.55	1.40	1.78	12.2
Latte (1.5% di grassi)	0.57	4.14	3.019×10^{-3}	1033	0.58	1.36	1.34	9.6
Uova liquide	0.57	3.20	3.906×10^{-3}	1043	0.50	1.50	6.00	38.4
Bianco d'uovo	0.65	3.81	n.a.	1045	0.59	1.48	4.31	27.8
Succo di pomodoro	1.50	3.98	7.915×10^{-3}	1010	0.50	1.24	5.60	44.6

Dal momento che il **pH** è uno dei fattori più importanti che riguardano i sistemi biologici, il suo livello sia all'esterno che all'interno della cellula potrebbe influenzare l'efficacia dei PEF. Alcune indagini su questo parametro non hanno mostrato alcuna relazione tra pH e l'efficacia dei PEF [47], mentre altre hanno riportato un incremento del tasso di inattivazione microbica dovuto ad una diminuzione del pH per organismi specifici [48, 23, 49]. Alcuni autori hanno proposto che un diverso tipo di danno e, quindi, un diverso tipo di inattivazione, avviene durante il trattamento PEF a seconda del pH del prodotto trattato [22].

Anche l'**attività dell'acqua**, o a_w , che indica il rapporto tra la pressione di vapore dell'acqua in un certo alimento e la pressione di vapore dell'acqua pura, influenza il trattamento PEF. In primo luogo, essa determina fortemente la tipologia di microrganismi che proliferano in un dato alimento e, secondo gli studi riportati in letteratura, reprime anche l'effetto di inattivazione dei PEF [50]. Alcuni prodotti secchi, come le spezie e la farina, sono stati trattati con PEF ma con un successo molto limitato (riduzioni microbiche inferiori a 1 Log), presumibilmente a causa del loro basso contenuto di acqua [51, 52]. Alcuni autori hanno proposto che, in presenza di ridotto contenuto di acqua, la riduzione di efficacia dei PEF sia dovuta ad un restringimento delle dimensioni della cellula causato dalla pressione osmotica [50] o ad un ispessimento della membrana cellulare in seguito alla riduzione della sua permeabilità e fluidità [53].

3.3 Modelli matematici di inattivazione microbica

Diversi modelli empirici sono stati sviluppati per prevedere la crescita di microrganismi negli alimenti a partire dai dati generati da studi di laboratorio. L'elevato numero di parametri di processo e di prodotto, le differenze nei sistemi di trattamento e nelle condizioni sperimentali limitano la generalizzabilità delle relazioni trovate. In aggiunta, la mancanza di conoscenze riguardanti i meccanismi di azione e la loro dipendenza dai parametri di processo e di prodotto limitano lo sviluppo di modelli di inattivazione basati sul significato fisiologico dei dati ottenuti. I modelli proposti finora si sono stati basati su osservazioni empiriche, tuttavia queste possono essere utilizzate come base di partenza per impostare dei limiti realizzativi alle varie apparecchiature da utilizzare per il trattamento PEF.

3.3.1 Modello di Hülshager and Niemann

Il primo modello di inattivazione microbica fu proposto da Hülshager and Niemann [54]. Esso assume una cinetica di inattivazione del primo ordine e quindi una relazione lineare tra il logaritmo dell'indice di sopravvivenza microbica, S , ed il campo elettrico, E :

$$\log(S) = -b_E(E - E_c)$$

dove S esprime il rapporto tra la concentrazione dell'agente microbico alla fine del trattamento e la concentrazione iniziale dello stesso agente, b_E è la costante di regressione lineare, mentre E_c corrisponde al valore di campo elettrico critico al di sotto del quale si ha il 100% di sopravvivenza dei microrganismi. Il valore della costante E_c dipende dal tipo di microrganismo ed, in particolare, dalle sue dimensioni e dalla durata dell'impulso. Maggiore è la dimensione delle cellule, minore è il valore di E_c , ovvero microrganismi di

dimensione maggiore sono più sensibili alla tecnologia PEF. Inoltre il valore di E_c risulta minore per i batteri gram-negativi che per i batteri gram-positivi essendo, i primi, più sensibili al trattamento con i PEF.

3.3.2 Modello di Bigelow

Sulla base degli studi di Bigelow [55], Hülshager e Niemann [47] hanno verificato una relazione esistente di tipo lineare tra il logaritmo del tasso di sopravvivenza, S , ed il logaritmo del tempo di trattamento:

$$\log(S) = -b_t \log\left(\frac{t}{t_c}\right).$$

In questo caso b_t è la costante di regressione lineare, mentre t_c corrisponde al tempo critico, in s , prima del quale si osserva ancora il 100% di sopravvivenza dei microrganismi trattati.

3.3.3 Modello di Hülshager

Dalla combinazione dei due modelli precedenti, il modello di Hülshager [41] introduce come parametri di input sia il valore del campo elettrico, E , che la durata del trattamento, t :

$$S(E, t) = \left(\frac{t}{t_c}\right)^{-\frac{(E-E_c)}{k}}.$$

Il parametro k è una costante che dipende dal tipo di microrganismo, si esprime in cm/kV , ed è indicativa della suscettibilità di un dato microrganismo ai PEF. Maggiore è il valore di k , maggiore sarà la velocità di riduzione microbica al passare del tempo t . I modelli di Hülshager e colleghi si sono adattati molto bene ai dati sperimentali relativi a latte e uova liquide per l'inattivazione dell'Escherichia Coli.

3.3.4 Modello di Peleg

Nel 1995 Peleg ha proposto una descrizione matematica dell'indice di sopravvivenza microbica, S , basata su una curva sigmoideale avente come parametri di input intensità del campo elettrico, E , e numero di impulsi, n [56]:

$$S(E, n) = \frac{1}{1 + e^{\left[\frac{E-E_c(n)}{a(n)}\right]}}.$$

Il modello di Peleg prevede la determinazione di due costanti di regressione, $E_c(n)$ e $a(n)$, entrambe dipendenti dal numero di impulsi in modo esponenziale. In questo caso $E_c(n)$, espressa in kV/cm rappresenta il valore del campo elettrico tale da determinare la morte del 50% dei microrganismi presenti nel mezzo. Questo modello è risultato efficace per la descrizione dell'inattivazione della Salmonella mediante tecnica PEF nel latte scremato [57].

3.3.5 Modello di Weibull

Studi più recenti [58, 59] hanno utilizzato la distribuzione di Weibull per la descrizione delle curve di inattivazione di alcuni microrganismi. Il modello mette in relazione il \log_{10} dell'indice di sopravvivenza microbica con il tempo di trattamento, t :

$$\text{Log}(S) = -\frac{1}{2.303} \left(\frac{t}{b(E)}\right)^{n(E)},$$

dove $n(E)$ e $b(E)$ sono costanti che dipendono dal campo elettrico ma anche dal tipo di microrganismo e dal mezzo di trattamento.

È importante notare come i modelli descritti rappresentano il campo elettrico con una sola dimensione. Questa semplificazione rappresenta una scelta efficace nel settore dell'industria alimentare dove la maggior parte delle configurazioni geometriche per la metodica PEF sono di tipo monodimensionale.

4 Stato dell'arte e applicazioni dei campi elettrici pulsati nell'industria alimentare

Una revisione dettagliata dello stato dell'arte in materia di PEF, con particolare riferimento all'industria alimentare viene presentata in questo capitolo. Dopo aver definito il target di analisi ed i criteri di inclusione per l'analisi, le informazioni relative alle variabili di processo, microbiologiche e di prodotto sono state raccolte e suddivise per tipologia di alimento.

4.1 Definizione del target di analisi e criteri di inclusione

Al fine di fornire le basi per un'analisi quantitativo-comparativa dei lavori tecnico-scientifici prodotti dalla ricerca internazionale in materia di conservazione degli alimenti mediante PEF è stato, in primo luogo, identificato come target di analisi l'insieme degli studi che hanno determinato, sperimentalmente, gli effetti dei PEF su alimenti in forma liquida: acqua, latte, succhi di frutta, uova liquido, birra e vino. Tale scelta è volta a presentare la metodica PEF come alternativa, energeticamente vantaggiosa, alla pastorizzazione ed è sostanziata dalla efficacia dei PEF riportata dagli studi analizzati per quanto riguarda gli alimenti in forma liquida in virtù delle loro caratteristiche dielettriche. In aggiunta ai cibi solidi o densi, sono stati esclusi dal target le bevande gassate o disomogenee per presenza di particolato, per le quali l'utilizzo dei PEF è ostacolato dalla formazione di archi elettrici.

L'analisi della letteratura ha spesso evidenziato una mancanza di organicità e di uniformità nella descrizione dei parametri di processo, con informazioni rilevanti spesso mancanti. Questo ha comportato l'esclusione di diversi studi dal target di analisi.

Al fine di esplorare l'effetto dei PEF sulle diverse tipologie di batteri sono stati inclusi studi effettuati su mezzo di coltura, soluzioni saline o tampone fosfato che, a parità di condizioni sperimentali, hanno esplorato l'effetto dei PEF sulle varie tipologie di microorganismi. Questi potranno eventualmente essere utilizzati per un'analisi esplorativa microbo-specifica.

Sono stati individuati due fattori di processo principali: l'intensità del campo elettrico, E , in kV/cm e la durata complessiva del trattamento, T , in ms. Tali fattori sono i più importanti parametri di input responsabili dell'inattivazione dei microrganismi e la disponibilità dei loro valori in fase sperimentale ha determinato l'inclusione degli studi e dei dati corrispondenti. L'effetto sull'inattivazione è stato valutato in termini di riduzione logaritmica, $-\log(S)$, ovvero come logaritmo del rapporto tra la concentrazione dell'agente microbico alla fine del trattamento e la concentrazione iniziale dello stesso agente. Tale parametro fornisce l'output del sistema e quantifica l'efficacia del trattamento. Solo i lavori tecnico-scientifici che hanno riportato i valori di S , E , e T sono stati considerati ed i corrispondenti dati sperimentali sono stati tabulati. Se non esplicitato, il valore di T è stato ricavato come prodotto del numero di impulsi, N , e durata del singolo impulso, Δt , ove disponibili. Sono state inoltre riportate informazioni sulla tipologia di trattamento, se a camera statica o con trattamento a flusso continuo, e sulla forma d'onda applicata (quadrata, esponenziale, oscillatoria o a polarità invertita). Dove disponibili, sono stati riportati anche i valori di N e Δt , del volume della camera di trattamento e del flusso applicato (solo per trattamenti a flusso continuo). Questi rappresentano alcuni dei fattori secondari che, sebbene meno determinanti rispetto ai parametri di input principali già riportati, possono influenzare la dinamica del processo di inattivazione microbica e, conseguentemente, l'efficacia dei PEF ai fini della conservazione degli alimenti. La loro influenza verrà valutata in fase di analisi dei dati.

Tra i fattori secondari, importanti sono le proprietà strutturali e morfologiche delle cellule microbiche ed, in particolare, anche le caratteristiche della membrana plasmatica. I vari agenti microbici analizzati negli studi selezionati sono stati quindi catalogati e raggruppati in tre categorie macroscopiche: Gram+, Gram-, e lieviti. Anche le caratteristiche di forma, a bastoncino, globulare, ellissoidale, o sferica e le dimensioni medie sono state catalogate per le analisi successive (cfr. paragrafo 4.2.2).

4.2 Trattamento dell'acqua

L'acqua è utilizzata per produrre, elaborare e, in determinate condizioni, per immagazzinare i cibi. La qualità dell'acqua può influenzare notevolmente la qualità di alimenti. Esistono infatti casi di contaminazione di alimenti mediante batteri patogeni, virus e parassiti dall'acqua.

Alcuni studi hanno investigato gli effetti dei campi elettrici pulsati sull'inattivazione di microrganismi presenti nell'acqua. La tecnologia PEF può essere utilizzata come metodo di disinfezione dell'acqua in alternativa a metodi termici come la bollitura o all'utilizzo di biocidi, come cloro, diossido di cloro, cloroammine e ozono.

Una riduzione di 4 Log di una popolazione di *Escherichia coli* è stata ottenuta in acqua utilizzando un'intensità di campo elettrico di 110 kV/cm e una durata degli impulsi di 200 ns, con un consumo energetico totale di 40 J/cm³ [14]. Vernhes et al. [40] hanno riportato un successo nell'inattivazione di una forma di ameba, la *Naegleria lovaniensis*, in acqua dolce. Nella fase di crescita logaritmica, l'inattivazione cellulare ha superato il 99% con un'intensità di campo elettrico di 2 kV/cm, mentre solo l'80% delle cellule in fase stazionaria è stata interessata dal trattamento[40].

Mizuno e Hori hanno realizzato l'inattivazione mediante PEF di cellule di *Saccharomyces cerevisiae* disperse in acqua deionizzata. Sono stati testati quattro tipologie diverse di elettrodi che hanno determinato notevoli variazioni sull'energia specifica necessaria per completare la distruzione delle cellule. I risultati sperimentali hanno inoltre indicato che la sopravvivenza dei microrganismi approssimava la distribuzione di Weibull (vedi paragrafo 4.3.5). In uno studio effettuato su varie soluzioni acquose da Ho e colleghi [15], è stata analizzata la disattivazione di *Pseudomonas fluorescens* al variare di alcuni parametri di processo e delle proprietà dielettriche del mezzo di sospensione acquoso. I ricercatori hanno concluso che valori di campo elettrico superiori a 10 KV/cm realizzati con almeno 10 impulsi a polarità inversa, permettono un significativo controllo dell'attività microbica, con riduzioni logaritmiche maggiori di 6. Lo studio ha comunque evidenziato una dipendenza dell'efficacia del trattamento dalla forma d'onda e dalle proprietà dielettriche delle soluzione acquosa in relazione alla presenza di sali o componenti zuccherine. La Tabella 3 riporta i parametri di processo utilizzati e resi disponibili dai singoli studi in merito all'acqua; la riduzione logaritmica ottenuta per ciascuna configurazione di trattamento è riportata per quantificarne l'efficacia.

Tabella 3. Inattivazione di microrganismi presenti nell'acqua mediante PEF.

Fonte	Microrganismo	Campo elettrico (kV/cm)	Durata impulso (μ s)	Numero impulsi	Tempo di trattamento (ms)	Forma d'onda	Trattamento	Riduzione Logaritmica
[14]	<i>Bacillus subtilis</i>	110	0,2	130	0,03	Esponenziale	Continuo	1,0
[14]	<i>Bacillus subtilis</i>	110	0,2	80	0,02	Esponenziale	Continuo	1,0
[14]	<i>Escherichia coli</i>	110	0,179	85	0,02	Esponenziale	Continuo	5,0
[14]	<i>Escherichia coli</i>	75	0,179	70	0,01	Esponenziale	Continuo	2,0
[14]	<i>Escherichia coli</i>	95	0,179	70	0,01	Esponenziale	Continuo	3,0
[14]	<i>Escherichia coli</i>	110	0,179	70	0,01	Esponenziale	Continuo	4,0
[14]	<i>Escherichia coli</i>	110	0,2	50	0,01	Esponenziale	Continuo	3,0
[14]	<i>Escherichia coli</i>	110	0,2	70	0,01	Esponenziale	Continuo	4,0
[14]	<i>Escherichia coli</i>	110	0,2	45	0,01	Esponenziale	Continuo	1,0
[60]	<i>Naegleria lovaniensis</i>	1,5	0,02	10	$0,2 \cdot 10^{-3}$	Quadra	Continuo	1,0
[60]	<i>Naegleria lovaniensis</i>	2	0,01	10	$0,1 \cdot 10^{-3}$	Quadra	Continuo	2,0
[15]	<i>Pseudomonas fluorescens</i> *	25	2	20	0,04	Bipolare	Statico	6,0
	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i> **	20	160	175	28	Esponenziale	Statico	6,0

* Acqua distillata

** Acqua deionizzata

Diversi studi [61, 39, 40, 62, 54, 63, 45, 64, 41] hanno valutato l'efficacia del trattamento PEF utilizzando mezzi di sospensione come mezzi di coltura, tampone fosfato o soluzioni saline adatte alla crescita microbica. Sebbene tali risultati non possano essere direttamente relazionati ad un alimento in particolare, essi possono essere un valido strumento per la valutazione statistica delle prestazioni del sistema PEF al

variare delle condizioni di processo e dei microrganismi a parità di mezzo di sospensione. In Tabella 4 vengono riportati, per completezza, i dati sperimentali corrispondenti riportati nella letteratura.

Tabella 4. Inattivazione di microrganismi presenti in mezzi di coltura o soluzioni saline mediante PEF.

Fonte	Microrganismo	Campo elettrico (kV/cm)	Durata impulso (μs)	Numero impulsi	Tempo di trattamento (ms)	Forma d'onda	Trattamento	Riduzione Logaritmica
[61]	Escherichia coli	40	3	64	0,19	n.d.	Statico	6,0
[61]	Saccharomyces cerevisiae	40	3	16	0,05	n.d.	Statico	5,5
[39]	Escherichia coli	25	2	20	0,04	Quadra	Continuo	2,4
[39]	Escherichia coli	25	2	40	0,08	Quadra	Continuo	2,7
[39]	Escherichia coli	25	4	20	0,08	Quadra	Continuo	3,9
[39]	Escherichia coli	25	4	40	0,16	Quadra	Continuo	6,3
[39]	Escherichia coli	30	2	20	0,04	Quadra	Continuo	3,1
[39]	Escherichia coli	30	2	40	0,08	Quadra	Continuo	3,6
[39]	Escherichia coli	30	4	20	0,08	Quadra	Continuo	5,4
[39]	Escherichia coli	30	4	40	0,16	Quadra	Continuo	8,0
[39]	Escherichia coli	35	2	20	0,04	Quadra	Continuo	3,8
[39]	Escherichia coli	35	2	40	0,08	Quadra	Continuo	5,0
[39]	Escherichia coli	35	4	20	0,08	Quadra	Continuo	6,2
[39]	Escherichia coli	35	4	40	0,16	Quadra	Continuo	7,7
[39]	Leuconostoc mesenteroides	25	2	20	0,04	Quadra	Continuo	0,2
[39]	Leuconostoc mesenteroides	25	2	40	0,08	Quadra	Continuo	0,3
[39]	Leuconostoc mesenteroides	25	4	20	0,08	Quadra	Continuo	0,8
[39]	Leuconostoc mesenteroides	25	4	40	0,16	Quadra	Continuo	0,5
[39]	Leuconostoc mesenteroides	30	2	20	0,04	Quadra	Continuo	0,3
[39]	Leuconostoc mesenteroides	30	2	40	0,08	Quadra	Continuo	0,3
[39]	Leuconostoc mesenteroides	30	4	20	0,08	Quadra	Continuo	1,6
[39]	Leuconostoc mesenteroides	30	4	40	0,16	Quadra	Continuo	3,4
[39]	Leuconostoc mesenteroides	35	2	20	0,04	Quadra	Continuo	0,3
[39]	Leuconostoc mesenteroides	35	2	40	0,08	Quadra	Continuo	0,5
[39]	Leuconostoc mesenteroides	35	4	20	0,08	Quadra	Continuo	2,9
[39]	Leuconostoc mesenteroides	35	4	40	0,16	Quadra	Continuo	7,0
[39]	Listeria innocua	25	2	20	0,04	Quadra	Continuo	0,0
[39]	Listeria innocua	25	2	40	0,08	Quadra	Continuo	0,2
[39]	Listeria innocua	25	4	20	0,08	Quadra	Continuo	0,4
[39]	Listeria innocua	25	4	40	0,16	Quadra	Continuo	0,8
[39]	Listeria innocua	30	2	20	0,04	Quadra	Continuo	0,2
[39]	Listeria innocua	30	2	40	0,08	Quadra	Continuo	0,5
[39]	Listeria innocua	30	4	20	0,08	Quadra	Continuo	1,4
[39]	Listeria innocua	30	4	40	0,16	Quadra	Continuo	2,7
[39]	Listeria innocua	35	2	20	0,04	Quadra	Continuo	0,4
[39]	Listeria innocua	35	2	40	0,08	Quadra	Continuo	1,0
[39]	Listeria innocua	35	4	20	0,08	Quadra	Continuo	3,2
[39]	Listeria innocua	35	4	40	0,16	Quadra	Continuo	8,1
[39]	Saccharomyces cerevisiae	25	2	20	0,04	Quadra	Continuo	1,5
[39]	Saccharomyces cerevisiae	25	2	40	0,08	Quadra	Continuo	3,2

[39]	Saccharomyces cerevisiae	25	4	20	0,08	Quadra	Continuo	5,0
[39]	Saccharomyces cerevisiae	25	4	40	0,16	Quadra	Continuo	5,3
[39]	Saccharomyces cerevisiae	30	2	20	0,04	Quadra	Continuo	5,2
[39]	Saccharomyces cerevisiae	30	2	40	0,08	Quadra	Continuo	4,6
[39]	Saccharomyces cerevisiae	30	4	20	0,08	Quadra	Continuo	6,3
[39]	Saccharomyces cerevisiae	30	4	40	0,16	Quadra	Continuo	6,4
[39]	Saccharomyces cerevisiae	35	2	20	0,04	Quadra	Continuo	6,3
[39]	Saccharomyces cerevisiae	35	2	40	0,08	Quadra	Continuo	6,5
[39]	Saccharomyces cerevisiae	35	4	20	0,08	Quadra	Continuo	6,1
[39]	Saccharomyces cerevisiae	35	4	40	0,16	Quadra	Continuo	6,4
[61]	Escherichia coli	40	3	16	0,05	n.d.	Statico	3,0
[40]	Escherichia coli	19,5	20	10	0,20	n.d.	Statico	2,0
[62]	Saccharomyces cerevisiae	5,4	90	10	0,90	n.d.	Statico	2,0
[54]	Escherichia coli	20	30	10	0,30	n.d.	Statico	3,5
[63]	Saccharomyces cerevisiae	35	20	4	0,08	n.d.	Statico	1,3
[45]	Listeria brevis	25	46	200	9,20	n.d.	Statico	9,0
[64]	Salmonella typhimurium	83	1	20	0,02	Esponenziale	Statico	5,0
[41]	Candida albicans	20	36	30	1,08	Esponenziale	Statico	4,5
[41]	Escherichia coli	20	36	30	1,08	Esponenziale	Statico	3,5
[41]	Klebsiella pneumoniae	20	36	30	1,08	Esponenziale	Statico	3,0
[41]	Listeria monocytogenes	20	36	30	1,08	Esponenziale	Statico	2,0
[41]	Pseudomonas aeruginosa	20	36	30	1,08	Esponenziale	Statico	3,5
[41]	Saccharomyces cerevisiae	20	36	30	1,08	Esponenziale	Statico	3,4
[41]	Staphylococcus aureus	20	36	30	1,08	Esponenziale	Statico	3,0

4.3 Trattamento di succhi di frutta

Sebbene la pastorizzazione venga considerata lo standard attuale per l'inattivazione microbica nei succhi di frutta, diversi studi hanno dimostrato che i PEF, relativamente alle variazioni di pH, colore, acidità totale, contenuto di composti fenolici e volatili, sono superiori alla pastorizzazione che invece comporta cambiamenti più significativi di queste proprietà [65].

Raso e colleghi [66] hanno applicato il trattamento PEF su varie tipologie di succhi di frutta contenenti una popolazione di cellule vegetative di *Zygosaccharomyces bailii*, uno dei pochi lieviti che sopravvive anche in assenza di ossigeno. Mantenendo la temperatura a 20 °C ed utilizzando due impulsi di durata di 2 µs con una intensità di campo elettrico da 32 a 36 kV/cm, sono stati ottenuti fino a 5 Log di riduzione logaritmica del lievito, mentre inferiore è stata la riduzione delle sue endospore [66]. In uno studio successivo, gli stessi autori hanno confermato che lieviti e muffe sospesi nei succhi di frutta sono molto sensibili ai PEF e possono essere inattivati da un basso numero di impulsi ad intensità di campo elettrico moderata [67]. Tuttavia, lo studio ha anche evidenziato la resistenza di una tipologia di spore al trattamento PEF. Per questo gli autori suggeriscono ulteriori indagini in modo da determinare l'effetto dei PEF sui vari enzimi endogeni responsabili della alterazione dei succhi di frutta durante la conservazione [67]. Wu e colleghi [68] hanno verificato l'inattivazione di microrganismi naturalmente presenti nel succo d'uva bianco e rosso mediante trattamento PEF. Nel succo d'uva rossa, è stata ottenuta una riduzione del conteggio microbico fino a 5,9 Log applicando 20 impulsi di 65 kV/cm alla temperatura di 50 °C. Gli autori, tuttavia, hanno anche riportato una significativa variazione del contenuto di vitamina C nel succo d'uva dovuta al trattamento PEF [68].

In uno studio sul succo di mela [69] gli autori hanno riportato che il trattamento PEF ha esteso la durata di conservazione [22-25] °C per il succo di mela fresco e per il succo di mela concentrato, rispettivamente, a 56 e 32 giorni. Le rilevazioni effettuate non hanno evidenziato nessun cambiamento apparente nelle proprietà fisico-chimiche dei succhi di frutta trattati [69]. Evrendilek e colleghi [70] hanno investigato l'effetto del trattamento PEF sull'inattivazione di *Escherichia coli* e sulla durata di conservazione nel succo di mela confezionato. Il trattamento PEF è stato applicato con intensità del campo elettrico variabili di 34, 31, 28, 25, e 22 kV/cm ed un tempo di trattamento medio di 166 µs. Il trattamento ha esteso la durata di conservazione dei campioni di succo a più di 67 giorni a 4 °C e a 14 giorni a 37 °C, in confronto ai campioni di controllo con tempo di conservazione di circa 14 giorni a 4 °C e meno di 3 giorni a 37 °C. La temperatura

durante il trattamento PEF è stata mantenuta al di sotto dei 38 °C per eliminare effetti termici indesiderati e non sono stati riportati cambiamenti significativi di colore e contenuto di vitamina C [70]. Una valutazione della durata di conservazione del succo d'arancia trattato con un sistema di impianto PEF pilota è stata eseguita da Zhang et al. [71]. Il sistema utilizzato è costituito da una serie di camere di co-trattamento dove la temperatura viene mantenuta prossima alla temperatura ambiente grazie all'utilizzo di dispositivi di raffreddamento tra le camere. Gli autori hanno riportato riduzioni da 3 a 4 Log con valori di intensità di campo elettrico di 32 kV/cm. Se conservati a 4 °C, sia i succhi di frutta trattati con PEF che quelli trattati con trattamento termico tradizionale avevano una durata di conservazione superiore a 5 mesi. Le perdite di vitamina C, tuttavia, erano più basse nei succhi trattati con PEF rispetto a quelli trattati termicamente ed anche il colore era generalmente meglio conservato [71].

Nel 2003, il gruppo di Min e colleghi [72] ha studiato i diversi effetti della trasformazione PEF sulla stabilità microbica, sul contenuto di acido ascorbico, composti aromatici, colore, pH, e sulle proprietà sensoriali del succo d'arancia. I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli ottenuti dal succo di frutta trattato termicamente. Sia i succhi di frutta trattati termicamente che quelli trattati con PEF hanno mostrato una durata di conservazione di 196 giorni a 4 °C ma, anche in questo studio, i campioni di succo di frutta trattati con i PEF hanno mantenuto maggiormente acido ascorbico, aroma, e colore di succo rispetto al succo trattato termicamente [72].

Il contenuto di Salmonella typhimurium è stato ridotto di 5,9 Log nel succo d'arancia appena spremuto e senza polpa trattato con 50 impulsi a 90 kV/cm, ad una temperatura di 55 °C [73]. L'aggiunta di due agenti antimicrobici, nisina e lisozima, ha determinato un ulteriore effetto battericida di 1,37 Log [73]. Ceppi di Listeria innocua ed Escherichia coli sono stati inattivati fino a 5 Log con un campo elettrico di intensità di 30 kV/cm alla temperatura di 50 °C [74].

Elez-Martinez e colleghi [75] hanno ottenuto un'inattivazione massima di 5,1 Log per una popolazione di Saccharomyces cerevisiae nel succo d'arancia. I PEF sono stati applicati per 1 ms con impulsi bipolari della durata 4 µs a 35 kV/cm. In uno studio successivo [76], cellule di Lactobacillus brevis sono state inattivate a fino a 5,8 Log nel succo d'arancia, quando questo è stato trattato utilizzando un'intensità di campo elettrico di 35 kV/cm per 1 ms con impulsi ad onda quadra della durata di 4 µs. Gli autori hanno analizzato diverse condizioni di processo, in particolare sono stati confrontati i risultati ottenuti con impulsi bipolari e ad onda quadra, rivelando prestazioni migliori di questi ultimi in termini di riduzione microbica ottenuta a parità di condizioni di processamento [76]. El-Hag e colleghi [77] hanno confrontato l'inattivazione microbica ottenuta per microrganismi naturalmente presenti nel succo d'arancia con quella ottenuta per i microrganismi inoculati. I risultati ottenuti a parità di condizioni di processamento hanno evidenziato una minore riduzione degli organismi naturalmente presenti, 2 Log, rispetto ai 3 Log ottenuti con gli organismi inoculati.

I dati raccolti sull'inattivazione di microrganismi nei succhi di frutta mediante PEF sono riportati in Tabella 5.

Tabella 5. Inattivazione di microrganismi presenti nei succhi di frutta mediante PEF.

Fonte	Microrganismo	Campo elettrico (kV/cm)	Durata impulso (µs)	Numero impulsi	Tempo di trattamento (ms)	Forma d'onda	Trattamento	Riduzione Logaritmica
[66]	Zygosaccharomyces bailii *	34,3	2	2	4·10 ⁻³	n.d.	Continuo	4,7
[66]	Zygosaccharomyces bailii **	32,3	2,5	2	5·10 ⁻³	n.d.	Continuo	4,8
[66]	Zygosaccharomyces bailii ***	35	2,3	2	4,6·10 ⁻³	n.d.	Continuo	5
[66]	Zygosaccharomyces bailii ****	33	2,2	2	4,4·10 ⁻³	n.d.	Continuo	4,3
[66]	Zygosaccharomyces bailii *****	36,5	3,3	2	6,6·10 ⁻³	n.d.	Continuo	4,6
[68]	Microrganismi naturalmente presenti ***	80	2	20	0,04	Bipolare	Statico	[0,8-2,2]

[70]	Escherichia coli **	22	4	n.d.	166	Bipolare	Continuo	1
[70]	Escherichia coli **	25	4	n.d.	166	Bipolare	Continuo	2
[70]	Escherichia coli **	28	4	n.d.	166	Bipolare	Continuo	2,5
[70]	Escherichia coli **	31	4	n.d.	166	Bipolare	Continuo	3,5
[70]	Escherichia coli **	34	4	n.d.	166	Bipolare	Continuo	4,5
[74]	Escherichia coli *	30	2	6	0,01	n.d.	n.d.	5,0
[74]	Listeria innocua *	30	2	6	0,01	n.d.	n.d.	5,0
[75]	Saccharomyces cerevisiae*	35	4	n.d.	0,15	Bipolare	n.d.	5,1
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	0,15	Quadra	Continuo	0,9
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	0,15	Quadra	Continuo	1,5
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	0,15	Quadra	Continuo	1,5
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	0,15	Quadra	Continuo	2
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	0,30	Quadra	Continuo	1,4
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	0,30	Quadra	Continuo	2,8
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	0,30	Quadra	Continuo	2,7
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	0,30	Quadra	Continuo	3,5
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	0,60	Quadra	Continuo	1,9
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	0,60	Quadra	Continuo	3,7
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	0,60	Quadra	Continuo	3,7
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	0,60	Quadra	Continuo	5,1
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	1	Quadra	Continuo	2,4
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	1	Quadra	Continuo	4
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	1	Quadra	Continuo	4,4
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	1	Quadra	Continuo	5,8
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	0,15	Bipolare	Continuo	0,5
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	0,15	Bipolare	Continuo	1,5
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	0,15	Bipolare	Continuo	1,4
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	0,15	Bipolare	Continuo	1,9
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	0,30	Bipolare	Continuo	0,9
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	0,30	Bipolare	Continuo	2,9
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	0,30	Bipolare	Continuo	2,8
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	0,30	Bipolare	Continuo	3,2
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	0,60	Bipolare	Continuo	1,2
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	0,60	Bipolare	Continuo	3,8
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	0,60	Bipolare	Continuo	3,9
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	0,60	Bipolare	Continuo	4,4
[76]	Lactobacillus brevis *	15	4	n.d.	1	Bipolare	Continuo	1,8
[76]	Lactobacillus brevis *	25	4	n.d.	1	Bipolare	Continuo	4,7
[76]	Lactobacillus brevis *	30	4	n.d.	1	Bipolare	Continuo	4,8
[76]	Lactobacillus brevis *	35	4	n.d.	1	Bipolare	Continuo	5
[78]	Saccharomyces cerevisiae *	6,75		5	0,01	n.d.	Statico	5,0
[73]	Salmonella typhimurium *	90	2	50	0,10	n.d.	n.d.	5,9
[79]	Escherichia coli **	29	4	43	0,17	n.d.	n.d.	5,0
[79]	Escherichia coli **	29	4	43	0,17	n.d.	n.d.	5,4
[80]	Saccharomyces cerevisiae **	12	180	20	3,60	Esponenziale	Statico	4,0
[80]	Saccharomyces cerevisiae **	12	180	20	3,60	Quadra	Statico	4,2
[12]	Saccharomyces cerevisiae **	25	11	150	1,65	Esponenziale	Continuo	7,0
[12]	Saccharomyces cerevisiae **	50	2,5	2	0,01	Esponenziale	Continuo	6,0
[81]	Saccharomyces cerevisiae **	12	90	6	0,54	Esponenziale	Statico	4,0
[81]	Saccharomyces cerevisiae **	12	90	6	0,54	Quadra	Statico	3,5

[82]	Bacillus subtilis *****	33	2	30	0,06	Esponenziale	Continuo	5,3
[82]	Escherichia coli *****	33	2,00	30	0,06	Esponenziale	Continuo	6,5

- * Succo d'arancia
- ** Succo di mela
- *** Succo d'uva
- **** Succo d'ananas
- ***** Succo di mirtillo
- ***** Succo di pera

4.4 Trattamento del latte

Uno studio è stato condotto da Dunn e Pearlman sulla durata di conservazione del latte omogeneizzato inoculato con Salmonella dublin e trattato con 40 impulsi a un'intensità di campo elettrico di 36,7 kV/cm per un periodo di tempo di 25 minuti [83]. La Salmonella dublin non è stata rilevata dopo il trattamento PEF nè dopo conservazione a 7-9 °C per 8 giorni. Al contrario, la proliferazione della popolazione batterica è aumentata a 107 cfu/ml nel latte non trattato. Ulteriori studi hanno indicato una minore alterazione del sapore e minori cambiamenti chimico-fisici nella qualità del latte per la produzione del formaggio trattato con PEF [84]. Fernandez-Molina e colleghi [85] hanno studiato la durata di conservazione del latte scremato (0,2% di grassi). Il latte è stato trattato con PEF utilizzando 30 impulsi a decadimento esponenziale con valori di intensità di campo elettrico di picco di 50 kV/cm ed un tempo di trattamento di 2 µs. Il tempo di conservazione del latte è stato di 2 settimane se conservato a 4 °C. Il trattamento di latte scremato a 80 °C per 6 s seguiti da trattamento PEF con 30 impulsi a 30 kV/cm, con una larghezza di impulso di 2 µs ha aumentato la durata di conservazione fino a 22 giorni. Durante il trattamento PEF la temperatura di lavorazione non ha superato i 28 °C [85].

Qin et al. [86] hanno riportato che il latte sottoposto a 20 impulsi con una intensità di campo elettrico di 40 kV/cm ha raggiunto una durata di conservazione di 2 settimane a temperatura di refrigerazione. Gli autori non hanno rilevato cambiamenti significativi nelle proprietà fisiche e chimiche del latte nè significative variazioni nelle caratteristiche sensoriale del latte trattato rispetto al latte pastorizzato [86].

Una riduzione microbica di una popolazione di Listeria innocua di 2,4 Log è stata realizzata con il trattamento PEF su latte scremato, applicando un campo elettrico di 50 kV/cm [87]. Nello stesso anno, altri autori [88] hanno riportato una riduzione di 4 Log per la Listeria monocytogenes utilizzando un campo elettrico di 30 kV/cm e 400 impulsi da 1,5 µs. Lo studio ha evidenziato differenze significative di prestazioni tra latte intero e latte scremato [88].

In campioni di latte scremato è stato eseguito un trattamento PEF con un tempo di trattamento totale di 450 µs e 35 kV/cm d'intensità di campo elettrico ottenendo una riduzione di più di 3 Log per una popolazione di Staphylococcus aureus; la temperatura è stata mantenuta inferiore a 40 °C [89].

Un trattamento combinato PEF-termico a 35 kV/cm e 60 °C è stato efficace per l'inattivazione di batteri e microflora, Pseudomonas e Enterobacteriaceae, nel latte scremato [90]. Le riduzioni logaritmiche per la popolazione totale microbica di Pseudomonas e Enterobacteriaceae sono state rispettivamente di 5,9 e 2,1. Mentre le basse temperature (T=15 °C) hanno significativamente ridotto l'efficacia del trattamento PEF per il latte [90]. Ulteriori ricerche hanno dimostrato che una riduzione di almeno 5 Log per la specie Pseudomonas, la principale specie di batteri patogeni nel latte, possono essere raggiunti mediante combinazione di trattamento PEF a 31 kV/cm e da un trattamento termico a 55 °C [91]. In un altro studio è stato osservato che una coltura pura di Escherichia coli è più resistente al trattamento PEF rispetto ai microbi indigeni presenti nel latte naturale [92]. Lo stesso studio ha mostrato che nel latte a contenuto di grasso del 2% e del 18% si è ottenuto un grado inferiore di riduzione logaritmica dei microbi indigeni, questo ha confermato che la presenza di grasso influenza in modo significativo l'inattivazione microbica mediante PEF [92]. La Tabella 5 riporta i risultati ottenuti dagli studi su latte e trattamento PEF e il setting sperimentale corrispondente.

Tabella 5. Inattivazione di microrganismi presenti nel latte e alcuni derivati mediante trattamento PEF.

Fonte	Microrganismo	Campo elettrico (kV/cm)	Durata impulso (µs)	Numero impulsi	Tempo di trattamento (ms)	Forma d'onda	Trattamento	Riduzione Logaritmica
[83]	Salmonella dublin	36,7	36	40	1,44	n.d	Statico	4,0

[93]	Listeria innocua *	29	0,8	312	0,25	n.d	n.d	2,0
[88]	Listeria monocytogenes *	30	1,5	400	0,60	n.d	n.d	4,0
[94]	Escherichia coli **	41	2,5	63	0,16	n.d	n.d	4,0
[95]	Escherichia coli **	45	1,80	64	0,12	n.d	Continuo	2,0
[96]	Escherichia coli **	50	2	48	0,10	Quadra	Continuo	3,5
[96]	Escherichia coli **	50	2	62	0,12	Polarità inversa	Statico	2,5
[61]	Escherichia coli **	40	3	16	0,05	n.d	Statico	0,5
[61]	Escherichia coli **	40	3	64	0,19	n.d	Statico	3,0
[87]	Listeria innocua **	50	2	32	0,06	Esponenziale	Continuo	2,4
[85]	Listeria innocua **	50	2	100	0,20	Esponenziale	Continuo	2,6
[94]	Listeria innocua **	41	2,5	63	0,16	n.d	n.d	3,9
[97]	Listeria monocytogenes **	20	3,25	10	0,03	n.d	n.d	1,0
[85]	Pseudomonas fluorescens **	50	2	30	0,06	n.d	Continuo	2,7
[57]	Salmonella dublin **	35	1	164	0,16	n.d	n.d	4,0
[89]	Staphilococcus aureus **	35	3,7	n.d.	460	n.d	n.d	3,7
[98]	Staphilococcus aureus **	35	4	600	2,40	n.d	n.d	1,0
[95]	Escherichia coli **	40	6	64	0,38	n.d	Statico	3,0
[99]	Bacillus subtilis ***	16	250	50	12,50	Esponenziale	Statico	4,5
[80]	Bacillus subtilis ***	16	180	13	2,34	Polarità inversa	Statico	5,5
[80]	Bacillus subtilis ***	16	180	13	2,34	Monopolare	Statico	4,5
[100]	Escherichia coli ***	16	250	60	15	n.d	Statico	4,0
[80]	Escherichia coli ***	40	180	4	0,72	Polarità inversa	Statico	3,0
[80]	Escherichia coli ***	40	180	4	0,72	Monopolar	Statico	3,0
[80]	Escherichia coli ***	40	180	8	1,44	Oscillatoria	Statico	1,5
[80]	Escherichia coli ***	40	180	8	1,44	Oscillatoria	Statico	3,0
[96]	Escherichia coli ***	50	2	48	0,10	Quadra	Continuo	3,6
[80]	Escherichia coli ***	60	40	10	0,40	Esponenziale	Continuo	3,5
[80]	Escherichia coli ***	60	40	20	0,80	Esponenziale	Continuo	6,0
[80]	Escherichia coli ***	60	40	30	1,20	Esponenziale	Continuo	7,5
[80]	Escherichia coli ***	60	40	40	1,60	Esponenziale	Continuo	7,8
[80]	Escherichia coli ***	60	40	50	2	Esponenziale	Continuo	8,2
[100]	Lactobacillus delbrueckii ***	16	250	40	10	Esponenziale	Statico	4,5
[80]	Staphilococcus aureus ***	60	40	10	0,4	Esponenziale	Continuo	2,5
[80]	Staphilococcus aureus ***	60	40	20	0,8	Esponenziale	Continuo	4,0
[80]	Staphilococcus aureus ***	60	40	30	1,2	Esponenziale	Continuo	4,5
[80]	Staphilococcus aureus ***	60	40	40	1,6	Esponenziale	Continuo	5,0
[100]	Staphilococcus aureus ***	16	250	60	15	Esponenziale	Statico	3,5

* Latte intero

** Latte scremato

*** Latte ultrafiltrato simulato

4.5 Trattamento delle uova

Alcuni dei primi studi sul trattamento delle uova sono stati condotti da Dunn e Pearlman nel 1987 [83] utilizzando una camera di trattamento statica ad elettrodi paralleli posti a 2 cm di distanza. Utilizzando una serie di 25 impulsi a decadimento esponenziale con tensione di picco di circa 36 kV, i risultati sono stati confrontati con gli ovoprodotti pastorizzati, con e senza aggiunta di conservanti. Lo studio ha dimostrato l'efficacia della tecnica PEF nell'estensione della durata di conservazione degli alimenti trattati che è stata

di 4 e 10 giorni alle temperature di 10°C e 4°C, rispettivamente, contro le poche ore dei campioni pastorizzati.

Altri studi condotti su uova intere liquide trattate con PEF [96] hanno dimostrato che il trattamento PEF riduce la viscosità dei prodotti trattati ma ne aumenta l'intensità di colore, in termini di concentrazione di beta-carotene rispetto alle uova fresche. Anche l'analisi statistica della valutazione sensoriale non ha rivelato differenze tra le torte preparate con uova intere liquide trattate con PEF e fresche. Le informazioni quantitative raccolte relativamente al trattamento delle uova sono riportate in Tabella 6.

Tabella 6. Inattivazione di microrganismi presenti nelle uova liquide mediante PEF.

Fonte	Microrganismo	Campo elettrico (kV/cm)	Durata impulso (µs)	Numero impulsi	Tempo di trattamento (ms)	Forma d'onda	Trattamento	Riduzione Logaritmica
[101]	Escherichia coli	11	2	40	0,08	n.d.	n.d.	4,0
[102]	Escherichia coli	26	4	100	0,40	n.d.	n.d.	6,0
[103]	Escherichia coli	32,89	0,17	180	0,03	n.d.	n.d.	4,7
[87]	Listeria innocua	50	2	32	0,06	Esponenziale	Continuo	3,4

4.6 Trattamento di birra e vino

Anche se le bevande alcoliche tendono ad essere più resistenti alla contaminazione da microrganismi grazie all'elevato contenuto di alcool e alla loro acidità, anch'esse sono suscettibili di contaminazione microbica [104]. Attualmente il trattamento per la birra consiste nella pastorizzazione termica con problemi spesso legati alla fase di riempimento. Una sfida aperta è però quella di inattivare i microrganismi resistenti al calore. Anche il vino è attualmente trattato con un processo termico e con l'aggiunta di anidride solforosa (SO₂), ma questo comporta un'alterazione della percezione del gusto in diverse persone. Poiché sempre più i consumatori manifestano allergie all'SO₂, il suo uso è attualmente in fase di revisione. Anche la filtrazione è un metodo molto efficiente nel controllo della crescita microbica nel vino ma anch'essa può influenzarne negativamente il colore ed il sapore [104].

Uno studio riguardante i risultati sperimentali circa l'inattivazione mediante PEF di lieviti e batteri nei vini dimostra che la popolazione di *Dekkera bruxellensis*, *Dekkera anomala*, *Saccharomyces bayanus*, *Lactobacillus hilgardii* e *Lactobacillus plantarum* può essere ridotta di 5 Log dopo l'applicazione di un campo elettrico di 31 kV/cm ed una energia richiesta superiore a 300 kJ/kg [105]. Su campioni di vino (Cote de Bordeaux, 2010) è stata raggiunta l'inattivazione totale (fino a 5 Log) di diversi ceppi di microrganismi, utilizzando un trattamento PEF di 20 kV/cm, con impulsi esponenziali di 10 µs. Gli autori hanno riportato un costo energetico per l'intero processo di 320 kJ/kg [106].

Il primo brevetto per un dispositivo che riduce il numero di microrganismi nella birra mediante PEF A 25 °C è stato realizzato da Heinz Doevenspeck nel 1971 [107]. A questa invenzione, sono seguiti una serie di studi, tra cui il lavoro pubblicato da Ulmer e colleghi su popolazioni di *Lactobacillus plantarum* nella birra, nel quale sono stati eseguiti esperimenti usando diverse combinazioni di intensità di campo e di input di energia [108]. L'inattivazione totale dei batteri è stata osservata a intensità di campo nel range [28-34,8] kV/cm ed energie in ingresso superiori a 30 kJ/kg [108]. Beveridge e colleghi hanno ottenuto l'inattivazione completa di *Lactobacillus brevis*, quando sono stati applicati 200 impulsi della durata di 2 µs a 26 kV/cm per la birra Guinness e 60 impulsi a 25 kV/cm per il vino Sauvignon Blanc [104, 109]. La disattivazione del lievito *Zygosaccharomyces bailii* ha invece richiesto 90 impulsi per la birra e 30 impulsi per il Sauvignon Blanc. Il trattamento PEF si è rivelato efficace per la disattivazione di lieviti e batteri patogeni in campioni di birra con valori di intensità di campo elettrico di 20 kV/cm e 41 kV/cm, rispettivamente per il lieviti ed i batteri [110]. Le due diverse forme di microrganismi hanno necessitato di valori differenti di durata dei singoli impulsi e durata complessiva del trattamento. I vari esperimenti hanno portato a 4,1, 4,3, 4,7, 5,8 e 4,8 Log di riduzione rispettivamente per *Saccharomyces uvarum*, *Rhodotorula rubra*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus damnosus* e *Bacillus subtilis* [110]. Tuttavia, i ricercatori hanno riportato una significativa migrazione di Fe, Cr, Zn e Mn nei campioni di birra trattati provenienti dagli elettrodi in acciaio inox. Questo ha provocato una perdita significativa del sapore ed una diversa sensazione al palato della birra [110]. La

Tabella 7 mostra i parametri di processo utilizzati dai singoli studi nei vari esperimenti e le riduzioni logaritmiche ottenute in relazione al microrganismo trattato.

Tabella 7. Inattivazione di microrganismi presenti nella birra e nel vino mediante PEF.

Fonte	Microrganismo	Campo elettrico (kV/cm)	Durata impulso (μ s)	Numero impulsi	Tempo di trattamento (ms)	Forma d'onda	Trattamento	Riduzione Logaritmica
[106]	Brettanomyces bruxellensis *	20	10	400	4,00	Esponenziale	Statico	3,5
[106]	Oenococcus oeni *	20	10	400	4,00	Esponenziale	Statico	4,0
[106]	Oenococcus oeni *	20	10	400	4,00	Esponenziale	Statico	1,0
[106]	Pediococcus parvulus *	20	10	400	4,00	Esponenziale	Statico	1,0
[48]	Escherichia coli **	90	2	10	0,02	n.d	n.d.	5,9
[110]	Saccharomyces uvarum ***	22	14	n.d.	0,216	Quadra	Continuo	4,1
[110]	Rhodotorula rubra ***	22	14	n.d.	0,216	Quadra	Continuo	4,3
[110]	Lactobacillus plantarum ***	41	4	n.d.	0,175	Quadra	Continuo	4,7
[110]	Pediococcus damnosus ***	41	4	n.d.	0,175	Quadra	Continuo	5,8
[110]	Bacillus subtilis ***	41	4	n.d.	0,175	Quadra	Continuo	4,8
[109]	Lactobacillus brevis ***	26	2	90	0,18	Quadra	Continuo	4,2
[109]	Lactobacillus brevis ***	26	2	200	0,4	Quadra	Continuo	8
[109]	Zygosaccharomyces bailii ***	26	2	30	0,06	Quadra	Continuo	1,9
[109]	Zygosaccharomyces bailii ***	26	2	60	0,12	Quadra	Continuo	6
[109]	Zygosaccharomyces bailii ***	26	2	90	0,18	Quadra	Continuo	7
[109]	Lactobacillus brevis *	25	2	90	0,18	Quadra	Continuo	8
[109]	Zygosaccharomyces bailii *	26	2	30	0,06	Quadra	Continuo	7

* Vino

** Sidro di mela

*** Birra

5 Analisi quantitativa dei dati raccolti dalla letteratura

L'analisi dello stato dell'arte presentata nel capitolo precedente ha sostanziato l'efficacia dei PEF come metodo di conservazione degli alimenti e ha fornito le basi per la raccolta dati. In questo capitolo viene fornita una sintesi quantitativa del campione di dati raccolto al fine di evidenziarne le principali caratteristiche. Diverse classi di dati sono state confrontate tra loro in relazione ai diversi alimenti trattati per poter avere un quadro di riferimento specifico per ogni alimento. È stata valutata la significatività statistica delle differenze di alcuni valori riportati.

5.1 Sintesi esplorativa

Sulla base dei criteri definiti nel paragrafo precedente sono stati raccolti dati relativi a 194 campioni, di cui 13 relativi all'acqua, 58 ai succhi di frutta, 38 al latte, 4 alle uova in forma liquida, e 17 a bevande alcoliche (vino, birra e sidro). Ulteriori 64 campioni si riferiscono a studi su mezzi di coltura, soluzioni saline o tamponi fosfato. In Figura 3 è mostrata una sintesi dei dati per alimento.

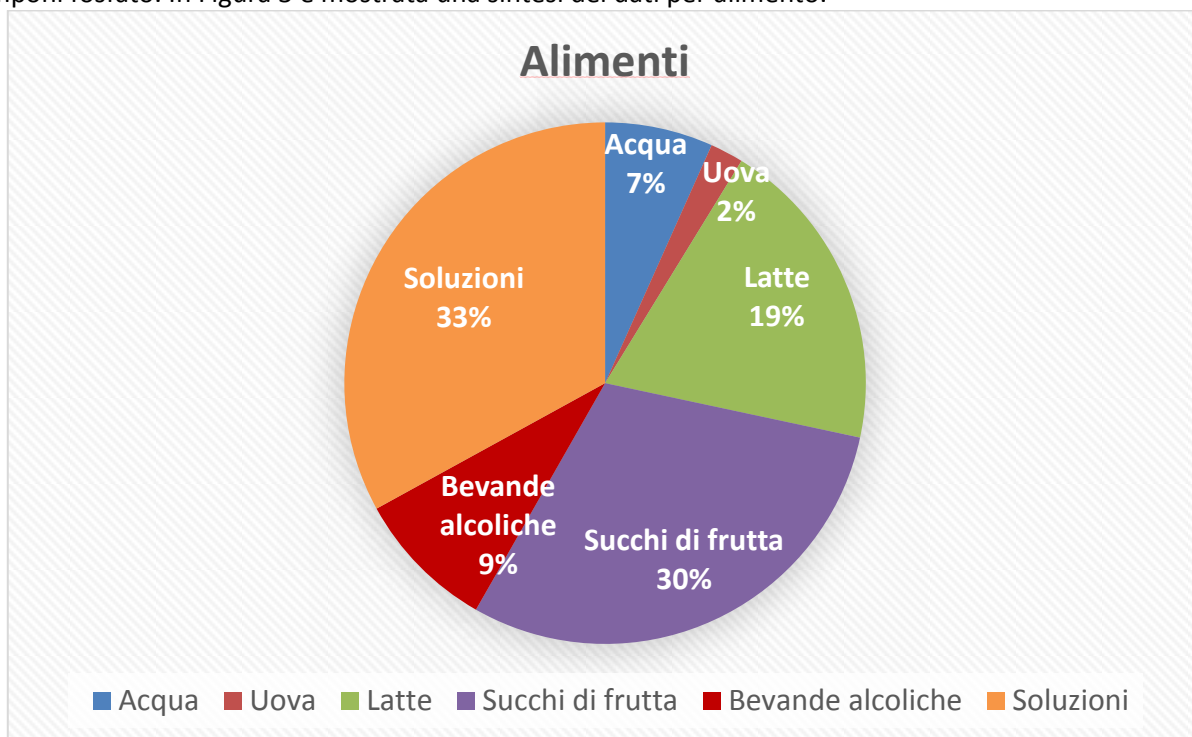


Figura 3. Sintesi dei dati raccolti per alimento su un campione di 194 dati.

Relativamente ai microrganismi presenti, la maggior parte dei dati raccolti si riferisce al trattamento di batteri Gram + (95 campioni), 58 campioni sono relativi al trattamento di batteri Gram -, 38 campioni ai lieviti e 3 campioni ad amebe od organismi naturalmente presenti nell'alimento di varia natura. La sintesi corrispondente è mostrata con il grafico a torta in Figura 4.

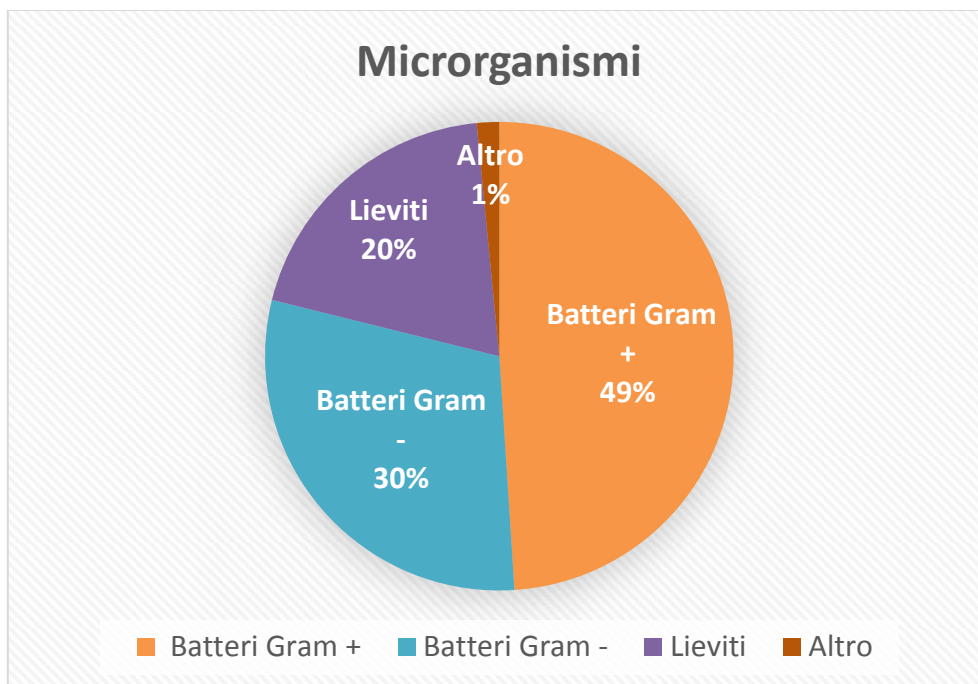


Figura 4. Sintesi dei dati raccolti per microrganismo su un campione di 194 dati.

I parametri di processo utilizzati dai vari studi, variano in relazione all'alimento e al microrganismo trattato. Le Figure 5 e 6 riportano i boxplot dei principali parametri utilizzati per l'intero campione di dati analizzato. In rosso è indicato il valore della mediana, e gli estremi del box blu rappresentano i valori del primo e terzo quartile che corrispondono, rispettivamente, al 25° e al 75° percentile. I valori della media campionaria (e deviazione standard) di intensità di campo elettrico e durata complessiva del trattamento sono stati, rispettivamente di 34,8 (20,7) kV/cm e 0,91 (2,85) ms. A questi, corrisponde una riduzione media logaritmica ottenuta di 3.62 e deviazione standard di 2.03, equivalente a più del 99,99 % di microrganismi disattivati, in media, relativo all'intero campione di dati raccolto. Anche le modalità di erogazione degli impulsi variano da studio a studio. Complessivamente, per il campione analizzato, sono stati utilizzati durata e numero dei singoli impulsi uguali a 21,4 (51,1) μ s e 57,6 (89,2). Non tutti gli studi analizzati hanno riportato questa informazione. Inoltre, i valori elevati di deviazione standard ottenuti, indicano una maggiore dispersione relativa ai parametri di processo utilizzati. Questo, da un lato permette una variabilità in ingresso per lo sviluppo di modelli regressivi più robusti, dall'altro indica una necessità, da parte dei ricercatori in questo settore, di valutare le prestazioni del sistema di trattamento PEF al variare dei parametri di processo. Tale variabilità, infatti, si mantiene anche ad alimento e tipologia di microrganismi fissati a conferma del fatto che la determinazione del setting sperimentale ottimo per ogni dato alimento o microrganismo processato è ad oggi uno sviluppo di ricerca ancora aperto.

Per quanto riguarda la tipologia di trattamento, continua o statica, e la forma d'onda degli impulsi applicati, la numerosità delle varie opzioni analizzate è mostrata nei diagrammi a torta in Figura 7; non tutti gli autori i cui esperimenti sono stati inseriti nel campione hanno riportato l'informazione corrispondente.

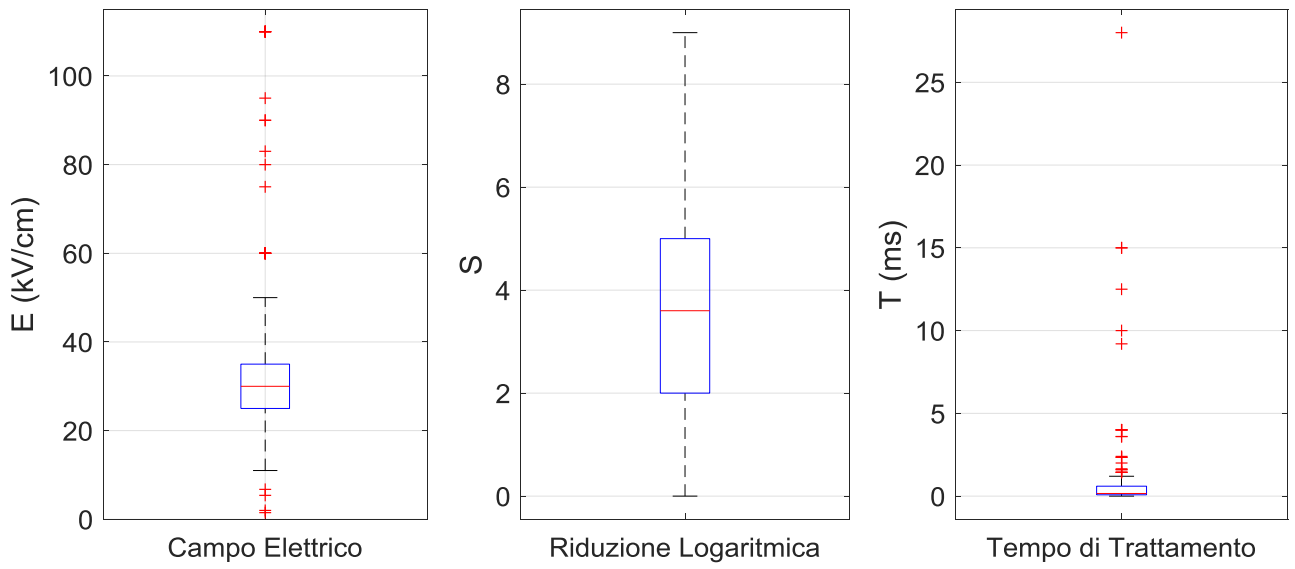


Figura 5. Boxplot di alcuni parametri di processo fondamentali relativi al campione di dati raccolto.

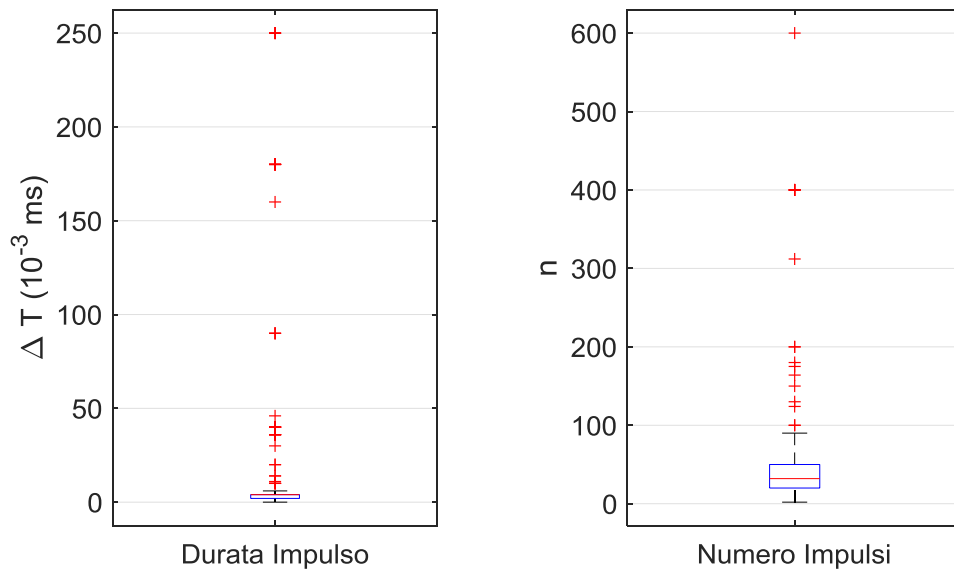


Figura 6. Boxplot di alcuni parametri di processo fondamentali relativi al campione di dati raccolto.

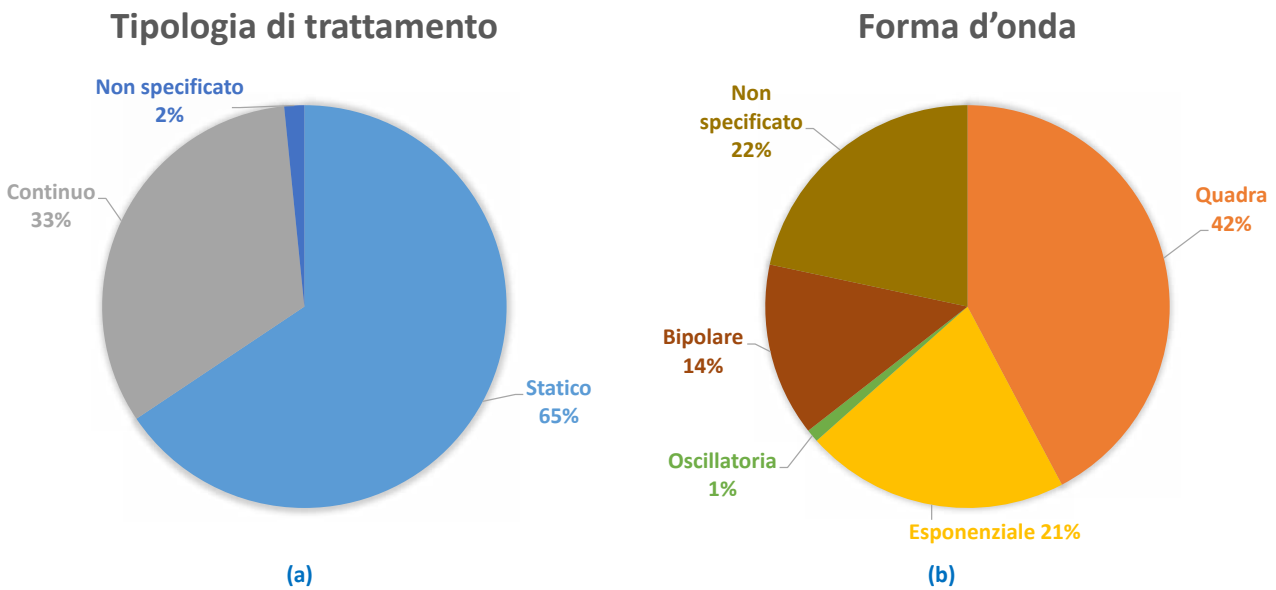


Figura 7. Sintesi dei dati raccolti per tipologia di trattamento (a) e forma d'onda (b) su un campione di 194 dati.

Vogliamo ora attribuire ai parametri raccolti da un campione di dimensione n ($n=194$) i valori medi, μ , corrispondenti della popolazione incognita. Per il teorema del limite centrale, per $n \rightarrow \infty$, la statistica

$$Z = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{\sigma}{\sqrt{n}}}$$

è una variabile aleatoria che segue la distribuzione normale standardizzata. Poiché, nel nostro caso, la varianza della popolazione, σ , non è nota, il suo valore può essere sostituito dallo scarto quadratico medio, s , del campione e, nell'ipotesi che la popolazione (ignota) abbia una distribuzione normale, la statistica

$$T = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

è una variabile aleatoria che segue la distribuzione t-Student con grado di libertà $\nu = n - 1 = 193$.

Da questo possiamo asserire, con un livello di confidenza pari a $1 - \alpha$, che è soddisfatta la seguente disuguaglianza

$$\bar{X} - z_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} < \mu < \bar{X} + z_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}$$

dove $z_{\alpha/2}$ corrisponde al valore critico, e affermare con probabilità $1 - \alpha$ (livello di confidenza) che l'intervallo di confidenza $\left[\bar{X} - z_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}}, \bar{X} + z_{\alpha/2} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \right]$ contiene il valore medio μ della popolazione [111]. Gli intervalli di confidenza ottenuti per le probabilità di 95% e 99% sono riportati in Tabella 8, insieme al range totale dei valori, alla media campionaria, allo scarto quadratico medio e alla numerosità del campione corrispondente, per i principali parametri di processo raccolti dalla letteratura scientifica internazionale in materia di PEF.

Tabella 8. Sintesi esplorativa del campione di dati raccolto dalla letteratura scientifica internazionale in materia di conservazione di alimenti attraverso campi elettrici pulsati.

	Numerosità del campione n	Media campionaria \bar{X}	Scarto quadratico medio s	Intervallo di confidenza $I_{95\%}$	Intervallo di confidenza $I_{99\%}$	Range totale [min - max]
Campo elettrico (kv/cm)	194	34,8	20,7	[31,8 – 37,7]	[30,9 – 38,7]	[1,5 – 110,0]
Durata trattamento (ms)	194	0,91	2,85	[0,51 – 1,32]	[0,38 – 1,45]	[0,1 10 ⁻³ – 28,0]
Riduzione logaritmica (-)	194	3,62	2,03	[3,33 – 3,91]	[3,24 – 4,00]	[0 – 9]
Numero impulsi (-)	151	57,60	89,21	[43,28 – 71,92]	[38,72 – 76,48]	[2 – 600]
Durata singolo impulso (μs)	193	21,44	51,10	[14,19 – 28,70]	[11,88 – 31,01]	[0,01–250,00]

In Figura 8 è mostrata una sintesi delle caratteristiche del campione di dati raccolto in relazione ai diversi raggruppamenti: alimenti, microrganismi, forme d’onda e tipologia di trattamento.

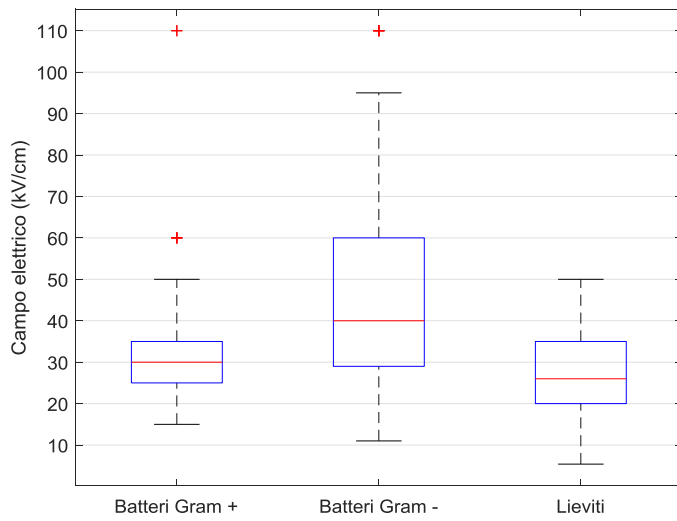


Figura 8. Sintesi dei raggruppamenti all’interno del campione dati raccolto

5.2 Analisi comparativa e significatività statistica

Una prima analisi comparativa è stata fatta relativamente ai valori di intensità di campo elettrico utilizzati in relazione alla classe di microrganismo analizzato. I boxplot in Figura 9 (a) mostrano differenze nelle distribuzioni di valori del campo elettrico relativi a batteri Gram +, batteri Gram - e lieviti, con valori medi (e deviazione standard) di 26,43 (9,62), 46,42 (26,94) e 31,24 (15,43), rispettivamente. È stato effettuato il t-test per studiare la significatività delle differenze ottenute. I p-values calcolati per le coppie di distribuzioni analizzate sono riportati in Figura 9 (b). Una significatività elevata della differenza è stata ottenuta per il

confronto delle distribuzioni di valori di intensità di campo elettrico relative al trattamento di batteri Gram + e Gram - e per il confronto delle distribuzioni relative al trattamento di batteri Gram - e lieviti.

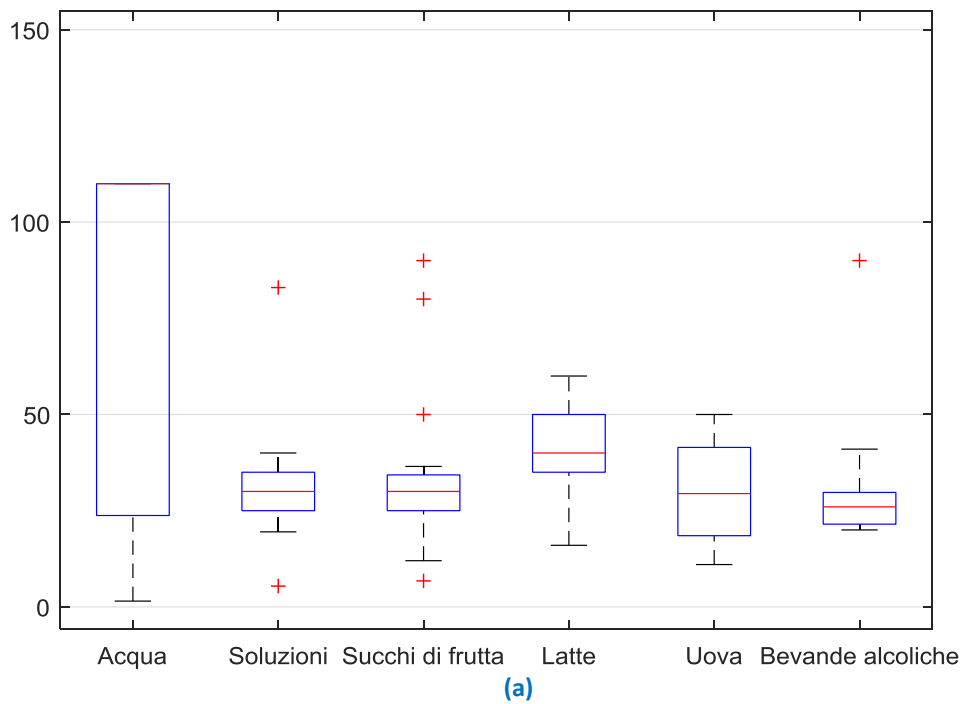


(a)

	Gram + (n=95)	Gram - (n=58)	Lieviti (n=38)
Gram + (n=50)	-	$1,78 \cdot 10^{-5} **$	0,08
Gram - (n=52)	$1,78 \cdot 10^{-5} **$	-	$3,00 \cdot 10^{-5} **$
Lieviti (n=25)	0,08	$3,00 \cdot 10^{-5} **$	-

(b)

Figura 9. Confronto valori di intensità di campo elettrico utilizzati in relazione alla tipologia di microorganismo trattato. Boxplot relativi al trattamento di microrganismi specifici trattati (a) e p-values del t-test relativo alla differenza delle coppie di distribuzioni confrontate. Il doppio asteristico indica una elevata significatività statistica della differenza.



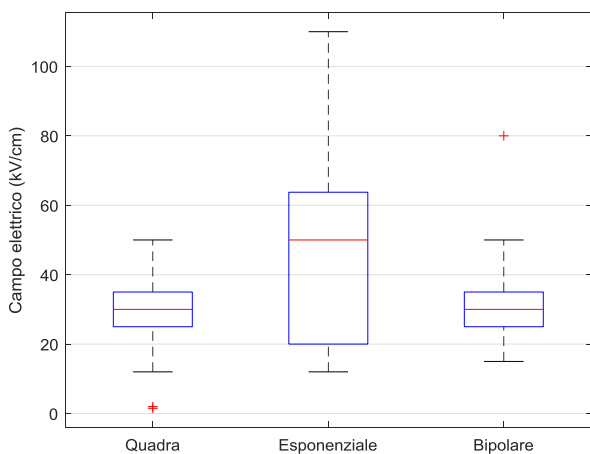
(a)

	Acqua (n = 13)	Soluzioni (n = 64)	Succhi di frutta (n=58)	Latte (n=38)	Uova (n=4)	Bevande alcoliche (n=17)
Acqua (n = 13)	-	$8,01 \cdot 10^{-11} **$	$3,83 \cdot 10^{-9} **$	$1,32 \cdot 10^{-4} **$	0,07	$7,37 \cdot 10^{-4} **$
Soluzioni (n = 64)	$8,01 \cdot 10^{-11} **$	-	0,74	$4,66 \cdot 10^{-6} **$	0,92	0,75
Succhi di frutta (n=58)	$3,83 \cdot 10^{-9} **$	0,74	-	$7,10 \cdot 10^{-5} **$	0,87	0,68
Latte (n=38)	$1,32 \cdot 10^{-4} **$	$4,66 \cdot 10^{-6} **$	$7,10 \cdot 10^{-5} **$	-	0,17	0,02 *
Uova (n=4)	0,07	0,92	0,87	0,17	-	0,96
Bevande alcoliche (n=17)	$7,37 \cdot 10^{-4} **$	0,75	0,68	0,02 *	0,96	-

(b)

Figura 10. Confronto valori di intensità di campo elettrico utilizzati in relazione all’alimento trattato. Boxplot relativi al trattamento di alimenti specifici trattati (a) e p-values del t-test relativo alla differenza delle coppie di distribuzioni confrontate. Il doppio asteristico indica una elevata significatività statistica della differenza ($p < 0.01$), l’asterisco una significatività statistica ($p < 0.05$).

Un confronto analogo è stato eseguito sulle distribuzioni di valori di intensità di campo elettrico relative al trattamento dei diversi alimenti, alle diverse forme d’onda utilizzate e alla tipologia di trattamento; i risultati ottenuti sono riportati in Figura 10, 11 e 12, rispettivamente. Il campione relativo alla forma d’onda sinusoidale non è stato inserito nell’analisi relativa alla forma d’onda perché di numerosità troppo bassa ($n=2$).

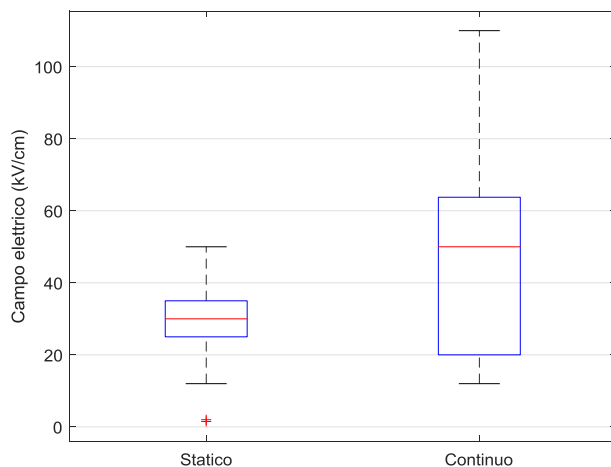


(a)

	Quadra (n=82)	Esponenziale (n=41)	Bipolare (n=27)
Quadra (n=82)	-	$3,15 \cdot 10^{-8} **$	0,05 *
Esponenziale (n=41)	$3,15 \cdot 10^{-8} **$	-	0,63
Bipolare (n=27)	0,05 *	0,63	-

(b)

Figura 11. Confronto valori di intensità di campo elettrico utilizzati in relazione alla forma d’onda utilizzata durante il trattamento PEF. Boxplot relativi alle forme d’onda specifiche utilizzate (a) e p-values del t-test relativo alla differenza delle coppie di distribuzioni confrontate. Il doppio asteristico indica una elevata significatività statistica della differenza ($p < 0.01$), l’asterisco una significatività statistica ($p < 0.05$).



(a)

	Statico (n=43)	Continuo (n=133)
Statico (n=43)	-	$3,15 \cdot 10^{-8} **$
Continuo (n=133)	$3,15 \cdot 10^{-8} **$	-

(b)

Figura 12. Confronto valori di intensità di campo elettrico utilizzati in relazione alla tipologia di trattamento PEF. Boxplot relativi al trattamento specifico utilizzato (a) e p-values del t-test relativo alla differenza delle coppie di distribuzioni confrontate. Il doppio asterisco indica una elevata significatività statistica della differenza ($p < 0.01$).

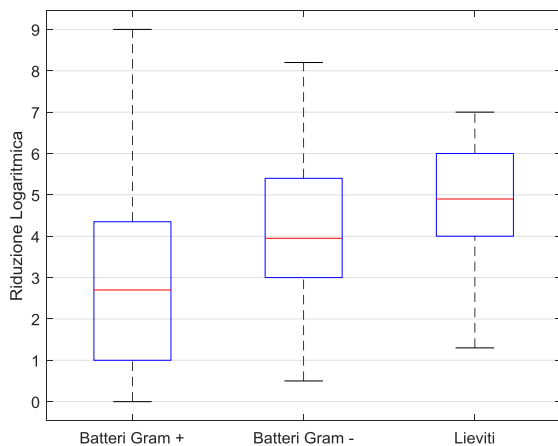
La significatività delle differenze riscontrata dall'analisi comparativa evidenzia una necessità, da parte degli autori nei diversi esperimenti riportati in letteratura, di adattare i valori di intensità di campo elettrico in relazione a tipologia di microrganismo, alimento trattato, forma d'onda e tipologia di trattamento. Questo ci permette di ipotizzare che un modello predittivo realizzato sulla base di dati così eterogenei debba considerare, in modo specifico, le diverse variabili di influenza.

Una valutazione complessiva della variabilità tra i vari gruppi di dati raccolti e l'effetto di questa variabilità sull'efficacia del trattamento è stata effettuata mediante l'analisi della varianza (ANOVA, dall'inglese Analysis of Variance) [112]. I p-values ottenuti, riportati in Tabella 9, si riferiscono alla probabilità che i dati di tutti i gruppi abbiano la stessa distribuzione stocastica e che le loro differenze siano dovute solo al caso (ipotesi nulla). Valori $p < 0.01$ indicano, con un'elevata significatività statistica che questa ipotesi deve essere rigettata e che, quindi, le differenze rilevate nei valori di campo elettrico, tempo di trattamento e riduzione logaritmica sono dovute alla presenza di fattori che influenzano il trattamento PEF in modo significativo e non al caso.

Tabella 9. ANOVA: analisi della varianza.

Raggruppamento	Campo elettrico	Tempo di trattamento	Riduzione Logaritmica
Microrganismo	$2,82 \cdot 10^{-15} **$	0,51	$7,62 \cdot 10^{-8} **$
Alimento	$2,58 \cdot 10^{-15} **$	0,02 *	0,14
Forma d'onda	$1,14 \cdot 10^{-8} **$	$1,11 \cdot 10^{-4} **$	0,18
Tipologia di trattamento	$3,14 \cdot 10^{-8} **$	$1,41 \cdot 10^{-4} **$	0,28

I p-values relativi al campo elettrico e al tempo di trattamento hanno valori $p < 0,05$ al contrario dei p-values relativi alla riduzione logaritmica. L'unica eccezione è rappresentata dal raggruppamento per classi di microrganismi. Questo risultato indica che le proprietà dielettriche dei diversi alimenti, la forma d'onda ed la tipologia di trattamento applicata hanno comportano la necessità di utilizzare parametri di trattamento differenti al fine di ottenere la disattivazione microbica desiderata. I p-values relativi alla riduzione logaritmica, infatti, sono un'indicazione del fatto che la variazione di tali parametri ha determinato, statisticamente, la stessa efficacia del trattamento. L'unica eccezione è rappresentata dai diversi gruppi di microrganismi da trattare per i quali si riportano in Figura 12 (a) i boxplot relativi alle distribuzioni di riduzione logaritmica ottenute.



(a)

	Gram +	Gram -	Lieviti
Gram +	-	$4 \cdot 10^{-5}$	$2 \cdot 10^{-6}$
Gram -	$4 \cdot 10^{-5}$	-	0,004
Lieviti	$2 \cdot 10^{-6}$	0,004	-

(b)

Figura 12. Boxplot della riduzione logaritmica ottenuta per le diverse classi di microrganismi (a) e p-values corrispondenti ottenuti con il test di Kolmogorov-Smirnov (b).

Il test di Kolmogorov-Smirnov effettuato sulle combinazioni di coppie di classi ha confermato ($p < 0.01$) la significatività statistica della differenza nei valori di riduzione logaritmica ottenuti. I p-values sono riportati in Figura 12 (b). Questi mostrano come i lieviti siano i più sensibili mentre i batteri Gram + mostrano una resistenza maggiore alle condizioni di trattamento PEF applicate in letteratura. Tuttavia, solamente per quanto riguarda i lieviti entrambi i parametri di trattamento utilizzati non sono risultati significativamente differenti rispetto ai parametri utilizzati per i batteri. Per questo possiamo ipotizzare che esista un limite di natura biologica che determina valori diversi di disattivazione per lieviti e batteri utilizzando il trattamento PEF.

6 Studio preliminare per la realizzazione di un sistema di supporto alla progettazione

Il presente studio preliminare è volto allo sviluppo di un modello matematico di tipo statistico che possa esprimere in modo accurato il comportamento di una data popolazione microbica quando questa è soggetta ad un campo elettrico pulsato a differenti condizioni ambientali. L'obiettivo è quello non solo di descrivere matematicamente i risultati sperimentali ottenuti ma, soprattutto, di riuscire a predire la risposta dei microrganismi all'applicazione dei PEF con un dato margine di errore, nell'ottica di realizzare uno strumento di progettazione automatica o semiautomatica.

6.1 Sulla necessità di un approccio statistico

L'elevato numero di parametri che influenzano il fenomeno dell'elettroporazione in relazione alle diverse applicazioni PEF nell'industria alimentare, evidenzia la necessità di fornire una metodologia matematica per la pianificazione del trattamento che garantisca che l'alimento trattato subisca condizioni elettriche tali da distruggere gli agenti patogeni in esso presenti. La teoria attuale propone che una cellula esposta a campi elettrici pulsati ad alta intensità destabilizzi temporaneamente il doppio strato lipidico e le proteine della propria membrana cellulare secondo un processo definito di elettroporazione, dovuto alla formazione di pori transmembrana. Tuttavia, la mancanza di conoscenze riguardanti i meccanismi di azione specifici dei PEF e la loro dipendenza dai parametri di processo e di prodotto hanno, ad oggi, limitato lo sviluppo di modelli di inattivazione basati su meccanismi fisiologici. Un possibile approccio consiste nell'introdurre un modello matematico di tipo statistico che possa esprimere il comportamento delle popolazioni microbiche in un dato alimento quando queste vengono soggette ad un campo elettrico pulsato a differenti condizioni ambientali. Tale metodologia non potrà basarsi su considerazioni di tipo deterministico, perché le popolazioni batteriche o i lieviti che "abitano" gli alimenti presentano caratteristiche di tipo non stazionario, ovvero le loro caratteristiche (dimensione, orientazione, disposizione spaziale, stadio di sviluppo) all'interno dell'alimento sono di tipo non omogeneo e non uniforme al variare del tempo. Questo comportamento è dovuto alla variabilità che contraddistingue gli organismi viventi in un ambiente favorevole alla loro crescita e al loro sviluppo e deve essere considerato nello sviluppo di modelli predittivi. Abbiamo visto come alcuni dei primi studi nel campo dell'industria alimentare [40] abbiano riconosciuto nell'elettroporazione, quindi nell'inattivazione microbica da parte di PEF, un evento di tipo statistico (cfr. paragrafo 3.1). A titolo di esempio ricordiamo l'innata capacità degli organismi viventi di reagire a stimoli esterni, anche di tipo distruttivo, come nel caso dei microrganismi che sono in grado di richiudere i pori transmembrana generati dagli impulsi elettrici una volta terminata l'applicazione dei PEF [36, 22]. Un ulteriore sostegno dell'approccio statistico che si intenderà adottare nel lavoro dei prossimi anni è dato dalla mancanza di una teoria esatta che possa spiegare gli effetti dei PEF sui microrganismi. Come studio preliminare, nei paragrafi successivi, viene descritta l'applicazione al campione di dati raccolto di uno dei modelli cinetici esistenti al fine di verificarne potenzialità e limitazioni.

6.2 Regressione non lineare

L'obiettivo della costruzione di un modello di regressione è quello di trovare i valori di un set di parametri β che minimizzano lo scarto quadratico medio tra le risposte osservate, y , e le previsioni di un dato modello teorico. Nel paragrafo 3.2, sono stati descritti diversi modelli empirici proposti per la previsione della crescita/inattivazione di microrganismi negli alimenti a partire dai dati generati da studi di laboratorio. Tra questi, il modello di Hülshager [3] introduce come parametri di input sia il valore del campo elettrico, E , che la durata del trattamento, T , ed esprime il tasso di sopravvivenza, S , secondo una legge esponenziale che riportiamo per comodità di lettura:

$$S(E, T) = \left(\frac{T}{T_c}\right)^{\frac{(E-E_c)}{k}}$$

Il parametro k è una costante che dipende dal tipo di microrganismo, si esprime in cm/kV , ed è indicativa della suscettibilità di un dato microrganismo ai PEF. Maggiore è il valore di k , maggiore sarà la velocità di riduzione microbica al passare del tempo T . T_c ed E_c corrispondono al tempo critico, in ms , e al valore di campo elettrico critico, in kV/cm , rispettivamente, al di sotto dei quali si osserva ancora il 100% di sopravvivenza dei microrganismi trattati. La stima dei tre parametri, $\beta = [T_c, E_c, k]$, è stata realizzata in ambiente Matlab utilizzando l'algorithm dei minimi quadrati Levenberg-Marquardt [113] a partire dal campione di dati raccolto. L'algorithm utilizza un procedimento iterativo che necessita di un set iniziale per i valori di β (initial guess). In accordo con i valori sperimentali riscontrati in letteratura il sistema è stato inizializzato con $\beta_0 = [0,9 \text{ ms}, 30 \text{ kV/cm}, 2]$.

6.3 Risultati e discussione

Sull'intero campione di dati raccolto, l'algorithm dei minimi quadrati Levenberg-Marquardt non ha raggiunto convergenza, indicando un'eterogeneità dei dati dal punto di vista dei valori di tempo di trattamento, campo elettrico e riduzione logaritmica tale da non ricondursi al modello ipotizzato. L'analisi comparativa riportata nel capitolo precedente, d'altra parte, aveva già evidenziato delle differenze statisticamente significative, in relazione alle diverse variabili di influenza analizzate, che giustificano questo risultato. L'eterogeneità nell'efficacia del trattamento in relazione ai valori di tempo di trattamento e campo elettrico può essere confermata, visivamente, in Figura 13, dove sono stati rappresentati i diversi valori di riduzione logaritmica con il colore.

Sulla base dell'analisi comparativa, riportata nel precedente capitolo e che ha evidenziato un limite di natura biologica che determina valori diversi di disattivazione al variare dei microrganismi target, il modello è stato addestrato, singolarmente, sui dati relativi alle diverse classi di microrganismi: Gram +, Gram – e Lieviti. In tutti e tre casi, tuttavia, sono stati ottenuti valori del coefficiente di determinazione, $R^2 < 0,3$. Questi valori, esprimendo una proporzione tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato (che si riconduce al quadrato del coefficiente di correlazione nelle regressioni lineari semplici), e discostandosi dal valore unitario, indicano che il modello utilizzato non riesce a "spiegare" i dati se nessun'altra condizione viene imposta per la selezione dei dati sperimentali. Risultati analoghi sono stati ottenuti andando a selezionare dati relativi a singoli alimenti, forme d'onda o tipologie di trattamento.

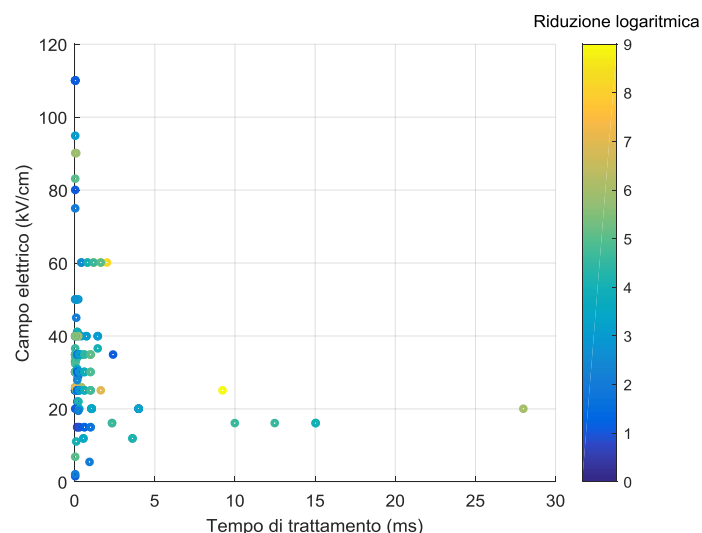


Figura 13. Distribuzione dei dati all'interno dell'intero campione raccolto in relazione a tempo di trattamento, campo elettrico e riduzione logaritmica.

Si riporta un risultato incoraggiante relativo alla disattivazione di batteri Gram- nel latte, per i quali è stato ottenuto un coefficiente di determinazione $R^2 = 0,99$ con un Root Mean Square Error (radice dell'errore quadratico medio tra i valori dei dati sperimentali ed i valori stimati dal modello), $\text{RMSE} = 0.008$. I valori

ottenuti per le costanti di regressione sono: $T_c = 0,04$ ms, $E_c = 13$ kV/cm e $k = 1,8$. In Figura 14 è mostrato il grafico del modello di regressione ottenuto utilizzando l'equazione di Hülshager.

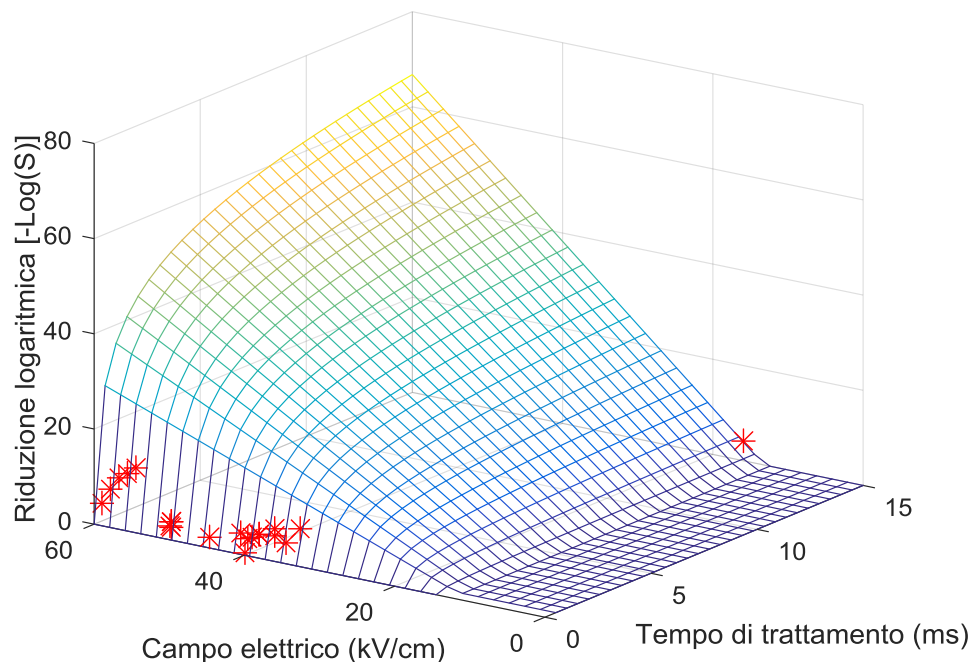


Figura 14. Modello di regressione non lineare ottenuto per la disattivazione di batteri Gram- nel latte. Gli asterischi indicano i dati sperimentali utilizzati per la regressione.

Nel grafico riportato, l'uscita del modello è espressa in termini di riduzione logaritmica, $-\text{Log}(S)$, mentre i dati sperimentali utilizzati per la regressione sono indicati con gli asterischi. Si può osservare come la maggior parte dei dati sperimentali preveda tempi di trattamento inferiori a 2 ms, con un unico dato relativo ad un tempo di trattamento di 15 ms. Questo ha comunque permesso la stima, mediante regressione, della riduzione logaritmica per diverse combinazioni di campo elettrico e tempo di trattamento. Tuttavia, l'effetto sulla temperatura non è considerato nel modello, mentre possiamo ipotizzare che per valori di $T = 15$ ms e $E > 20$ si ottenga un incremento di temperatura indesiderato per gli scopi previsti, nonostante i valori di riduzione logaritmica ottenuti.

Questo studio preliminare ha evidenziato i limiti dei modelli cinetici esistenti e la loro scarsa generalizzabilità ai diversi alimenti o parametri microbiologici. Il risultato ottenuto relativamente al latte ed alla classe di batteri Gram-, tuttavia, mostra che a parità di determinate condizioni, è possibile ottenere modelli predittivi adeguati. Lo sviluppo di un nuovo modello descrittivo della cinetica di inattivazione microbica mediante PEF potrà prevedere l'utilizzo di alcune variabili mancanti nei modelli esistenti come, ad esempio, le caratteristiche dielettriche del prodotto trattato o la forma ed il numero di impulsi utilizzati per il trattamento. Anche i parametri microbiologici potranno essere introdotti nell'analisi come fattori di forma o come valori della dimensione media delle cellule trattate. Come alternativa, si può prevedere lo sviluppo di un sistema semiautomatico multicriteriale basato su diversi modelli cinetici selezionati sulla base di informazioni raccolte sul campione da trattare o sull'attrezzatura disponibile.

7 Conclusioni

Con questo lavoro, è stato presentato lo stato dell'arte in materia di campi elettrici pulsati (PEF) e ne è stata esplorata l'applicabilità su vasta scala nel campo della conservazione degli alimenti in sostituzione delle attuali tecniche, più dispendiose da un punto di vista energetico. Numerosi studi in letteratura hanno affrontato, sperimentalmente, lo studio dell'influenza dei vari parametri di processo, microbiologici e di prodotto, fornendo dati empirici importanti che sono stati raccolti e tabellati nel presente lavoro. Tali studi, nonostante la mancanza di un ausilio teorico ben stabilito, hanno confermato l'estrema efficacia della metodica PEF per la preservazione degli alimenti e danno sostegno allo sviluppo industriale che avverrà nel campo alimentare nei prossimi anni. I dati raccolti, che sono stati caratterizzati dal punto di vista statistico e resi disponibili per analisi successive, potranno essere utilizzati per la generazione di un nuovo modello statistico di tipo predittivo.

L'analisi quantitativo/comparativa riportata nel presente lavoro ha evidenziato la necessità di sviluppare e valutare modelli cinetici che prendano in considerazione i fattori critici che influenzano l'inattivazione microbica e che permettano di ottimizzarli e controllarli al fine di garantire l'efficacia microbiologica. L'elevato numero di parametri di processo, microbiologici e di prodotto riscontrati, insieme alle differenze delle condizioni sperimentali, infatti, limitano la generalizzabilità dei risultati riportati dalla letteratura scientifica internazionale. In particolare, attraverso lo studio preliminare affrontato in questo lavoro per la realizzazione di un sistema di supporto alla progettazione, è stato evidenziato come le curve di sopravvivenza estrapolate da valori sperimentali basati su singoli studi, al momento, non possano calcolare correttamente la cinetica di inattivazione microbica al fine di ottenere parametri cinetici affidabili su larga scala. I modelli esistenti, come il modello Hülshager, non tengono conto di parametri di influenza come la durata e la forma degli impulsi elettrici applicati. Inoltre, la resistenza dei microrganismi ai PEF può aumentare in relazione a diversi parametri che dipendono dalle caratteristiche di prodotto o dal particolare ceppo di microrganismo target. Per accertare la sicurezza alimentare, un modello predittivo adeguato della risposta ai PEF dovrebbe prevedere margini di sicurezza per i meccanismi di adattamento delle cellule. I risultati preliminari ottenuti in questo studio ed i modelli proposti finora potranno però essere utilizzati come base di partenza per lo sviluppo di un nuovo modello cinetico che si possa adattare alle diverse condizioni di trattamento ed in grado di impostare dei limiti realizzativi e di progettazione alle varie apparecchiature PEF. Questo sarà oggetto del lavoro nei prossimi anni. Ulteriori sviluppi della presente ricerca includono: 1) l'ottimizzazione ed il controllo dei fattori critici del processo PEF e una loro standardizzazione; 2) lo sviluppo di metodi di convalida per garantire l'efficacia della disattivazione microbiologica; 3) la progettazione e realizzazione di un sistema PEF con relativa valutazione e riduzione dei costi.

8 Riferimenti bibliografici

- [1] C. Bell, A. Kyriakides, C. B. Salmonella e P. J. McClure, *Foodborne pathogens: Hazards, risk analysis and control*, CRC Press, 2002.
- [2] B. Ray e A. Bhunia, *Fundamental food microbiology*, CRC press, 2007.
- [3] World Health Organization (WHO), «WHO estimates of the global burden of foodborne diseases,» WHO, Geneva, Switzerland, 2015.
- [4] E. G. e C. D.N., «Australian consumers' antecedents of attitudes towards foods produced by novel technologies,» *British Food Journal*, vol. 108, n. 11, pp. 916-930, 2006.
- [5] A. Golberg, J. Fischer e R. Rubinsky, «The use of irreversible electroporation in food preservation,» in *Irreversible electroporation*, Berlin Heidelberg, Springer, 2010, pp. 273-312.
- [6] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, «Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization,» *Journal of Food Protection*, vol. 69, n. 5, p. 1190, 2006.
- [7] U.S. Food and Drug Administration, «Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies,» Institute of Food Technologists, Silver Spring, 2000.
- [8] Q. H. Zhang, B.-C. G. V. e B. G. Swanson, «Engineering aspects of pulsed electric field pasteurization,» *Journal of Food Engineering*, vol. 25, n. 2, pp. 261-281, 1995.
- [9] S. Jeyamkondan, D. S. Jayas e R. A. Holley, «Pulsed electric field processing of foods: a review,» *Journal of Food Protection*, vol. 62, n. 9, pp. 1088-1096, 1999.
- [10] A. H. Bushnell, R. W. Clark, J. E. Dunn e S. W. Lloyd, «Process for reducing levels of microorganisms in pumpable food products using a high pulsed voltage system». Washington, DC: Brevetto 5.514.391, 1996.
- [11] B. L. Qin, G. V. Barbosa-Canovas, B. G. Swanson, P. D. Pedrow, R. G. Olsen e Q. Zhang, «Continuous flow electrical treatment of flowable food products». Washington, DC Brevetto 5.776.529, 1998.
- [12] B.-L. Qin, F.-J. Chang, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Nonthermal inactivation of *S. cerevisiae* in apple juice using pulsed electric fields,» *LWT - Food Science and Technology*, vol. 28, n. 6, pp. 564-568, 1995.
- [13] S. Uchida, M. Houjo e F. Tochikubo, «Efficient sterilization of bacteria by pulse electric field in micro-gap,» *Journal of Electrostatics*, vol. 66, n. 7, pp. 427-431, 2008.
- [14] R. Narsetti, R. D. Curry, K. F. McDonald, T. E. Clevenger e L. M. Nichols, «Microbial inactivation in water using pulsed electric fields and magnetic pulse compressor technology,» *IEEE transactions on plasma science*, vol. 34, n. 4, pp. 1386-1393, 2006.
- [15] S. Ho, G. Mital, J. Cross e M. Griffiths, «Inactivation of *Pseudomonas fluorescens* by High Voltage,» *Journal of Food Science*, vol. 60, n. 6, pp. 1337-1343, 1995.
- [16] Masterpulse, «Pulsed electric field processing for the food industry,» [Online]. Available: <https://www.pulsemaster.us>.
- [17] I. O. f. S. (ISO), «ISO 22000 - Food safety management,» [Online]. Available: <http://www.iso.org/iso/home/standards/management-standards/iso22000.htm>.
- [18] A. J. Castro, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Microbial inactivation of foods by pulsed electric fields,» *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 17, n. 1, pp. 47-73, 1993.
- [19] J. C. Weaver e Y. Chizmadzhev, «Theory of electroporation: A review,» *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 41, n. 2, pp. 135-160, 1996.
- [20] K. J. Kinosita e T. Y. Tsong, «Voltage induced pore formation and haemolysis erythrocytes,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 471, n. 2, pp. 227-242, 1977.

- [21] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang e P. H. Hofschneider, « Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields,» *The EMBO journal*, vol. 1, n. 7, p. 841, 1982.
- [22] M. Somolinos, D. García, P. Mañas, S. Condón e R. Pagán, «Effect of environmental factors and cell physiological state on pulsed electric fields resistance and repair capacity of various strains of *Escherichia coli*,» *International journal of food microbiology*, vol. 124, n. 3, pp. 260-267, 2008.
- [23] H. Vega-Mercado, U. R. Pothakamury, F.-J. B.-C. G. V. Chang e B. G. Swanson, «Inactivation of *Escherichia coli* by combining pH, ionic strength and pulsed electric fields hurdles,» *Food Research International*, vol. 29, n. 2, pp. 117-121, 1996.
- [24] U. Zimmermann, «The effect of high intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: fundamentals and applications,» in *Electromanipulation of cells*, Boca Raton, FL, CRC Press, 1996, pp. 1-106.
- [25] R. V. Davalos, L. M. Mir e B. Rubinsky, «Tissue ablation with irreversible electroporation,» *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 2, n. 223-231, p. 33, 2005.
- [26] M. P. Rols e J. Teissié, «Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration,» *Biophysical Journal*, vol. 75, n. 3, pp. 1415-1423, 1998.
- [27] E. Neumann, S. Kakorin e K. Tøensing, «Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes,» *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 48, n. 1, pp. 3-16, 1999.
- [28] S. J. Beebe, P. M. R. Fox, L. J., K. Somers, R. H. Stark e K. H. Schoenbach, «Nanosecond pulsed electric field (nsPEF) effects on cells and tissues: apoptosis induction and tumor growth inhibition,» *IEEE Transactions on plasma science*, vol. 30, n. 1, pp. 286-292, 2002.
- [29] B. Rubinsky, «Irreversible electroporation in medicine,» *Technology in cancer research & treatment*, vol. 6, n. 4, pp. 255-259, 2007.
- [30] V. Heinz, I. Alvarez, A. Angersbach e D. Knorr, « Preservation of liquid foods by high intensity pulsed electric fields—basic concepts for process design,» *Trends in food science & technology*, vol. 12, n. 3, pp. 103-111, 2001.
- [31] G. V. Barbosa-Canovas, U. R. Pothakamury, M. M. Gongora-Nieto e B. G. Swanson, *Preservation of foods with pulsed electric fields*, San Diego, California: Academic Press, 1999.
- [32] L. Miller, J. Leor e B. Rubinsky, «Cancer cells ablation with irreversible electroporation,» *Technology in Cancer Research & Treatment*, vol. 4, n. 6, pp. 699-705, 2005.
- [33] S. W. H. De Haan e P. R. Willcock, «Comparison of the energy performance of pulse generation circuits for PEF,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 3, n. 4, pp. 349-356, 2002.
- [34] K. Daly e G. Chen, «Electroporation-How different length and shaped electrical pulses affect the permeability of cells,» in *IEEE Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena*, 2006.
- [35] S. Töpfl, *Pulsed Electric Fields (PEF) for Permeabilization of Cell Membranes in Food-and Bioprocessing—Applications, Process and Equipment Design and Cost Analysis*, Technische Universität Berlin, Fakultät III - Prozesswissenschaften, 2006.
- [36] G. Saulis, M. S. Venslauskas e J. Naktinis, «Kinetics of pore resealing in cell membranes after electroporation,» *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, vol. 321, n. 1, pp. 1-13, 1991.
- [37] S. Jun e J. M. Irudayaraj, *Food processing operations modeling: design and analysis (Vol. 107)*, Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.
- [38] S. Toepfl, V. Heinz e D. Knorr, «High intensity pulsed electric fields applied for food preservation,» *Chemical engineering and processing: Process intensification*, vol. 46, n. 6, pp. 537-546, 2007.
- [39] K. Aronsson, M. Lindgren, B. R. Johansson e U. Rönner, «Inactivation of microorganisms using pulsed electric fields: the influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 2, n. 1, pp. 41-54, 2001.

- [40] A. J. H. Sale e W. A. Hamilton, «Effects of high electric fields on microorganisms I. Killing of bacteria and yeast,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, vol. 148, n. 3, pp. 781-788, 1967.
- [41] H. Hülshager, J. Potel e E. G. Niemann, «Electric field effects on bacteria and yeast cells,» *Radiation and environmental biophysics*, vol. 22, n. 2, pp. 149-162, 1983.
- [42] U. R. Pothakamury, H. Vega, Q. Zhang, G. V. Barbosa-Canovas e B. G. Swanson, «Effect of growth stage and processing temperature on the inactivation of E. coli by pulsed electric fields,» *Journal of Food Protection*, vol. 59, n. 11, pp. 1167-1171, 1996.
- [43] P. Molinari, A. M. R. Pilosof e R. J. Jagus, «Effect of growth phase and inoculum size on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in fruit juices, by pulsed electric fields,» *Food Research International*, vol. 37, n. 8, pp. 793-798, 2004.
- [44] J. Holt e N. Krieg, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Baltimore: The Williams & Wilkins Co., 1994.
- [45] S. Jayaram e G. S. P. M. A. Castle, «Kinetics of sterilization of *Lactobacillus brevis* cells by the application of high voltage pulses,» *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 40, n. 11, pp. 1412-1420, 1992.
- [46] G. D. Hayes, *Food engineering data handbook*, Harlow: Longman Scientific & Technical, 1987.
- [47] H. P. J. Hülshager e E. G. Niemann, «Killing of bacteria with electric pulses of high field strength,» *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 20, n. 1, pp. 53-65, 1981.
- [48] J. Lu, G. S. Mittal e M. W. Griffiths, «Reduction in levels of *Escherichia coli* O157: H7 in apple cider by pulsed electric fields,» *Journal of Food Protection*, vol. 64, n. 7, pp. 964-969, 2001.
- [49] P. C. Wouters, N. Dutreux, J. P. Smelt e H. L. Lelieveld, «Effects of pulsed electric fields on inactivation kinetics of *Listeria innocua*,» *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, n. 12, pp. 5364-5371, 1999.
- [50] K. Aronsson e U. Röner, «Influence of pH, water activity and temperature on the inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 2, n. 2, pp. 105-112, 2001.
- [51] W. D. Keith, L. J. Harris, L. Hudson e M. W. Griffiths, «Pulsed electric fields as a processing alternative for microbial reduction in spice,» *Food Research International*, vol. 30, n. 3, pp. 185-191, 1997.
- [52] W. D. H. L. J. Keith e M. W. Griffiths, «Reduction of bacterial levels in flour by pulsed electric fields,» *Journal of Food Process Engineering*, vol. 21, n. 3, pp. 263-269, 1998.
- [53] F. C. I. J. L. & S. M. Neidhardt, «The effects of temperature, pressure, and pH,» in *Physiology of the bacterial cell: a molecular approach*, Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates Inc., 1990, pp. 226-246.
- [54] H. Hülshager e E. G. Niemann, «Lethal effects of high-voltage pulses on E. coli K12,» *Radiation and Environmental Biophysics*, vol. 18, n. 4, pp. 281-288, 1980.
- [55] B. W.D., «The logarithmic nature of thermal death time curves,» *The Journal of Infectious Disease*, vol. 29, n. 5, pp. 528-536, 1921.
- [56] M. Peleg, «A model of microbial survival after exposure to pulsed electric fields,» *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 67, n. 1, pp. 93-99, 1995.
- [57] I. Sensoy, Q. H. Zhang e S. K. Sastry, «Inactivation kinetics of *Salmonella dublin* by pulsed electric field,» *Journal of Food Process Engineering*, vol. 20, n. 5, pp. 367-381, 1997.
- [58] M. A. Van Boekel, «On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells,» *International journal of food microbiology*, vol. 74, n. 1, pp. 139-159, 2002.
- [59] N. Gómez, D. García, I. Álvarez, S. Condón e J. Raso, «Modelling inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric fields in media of different pH,» *International journal of food microbiology*, vol. 103, n. 2, pp. 199-206, 2005.
- [60] M. C. Vernhes, A. Benichou, P. Pernin, P. A. Cabanes e J. Teissie, «Elimination of free-living amoebae

- in fresh water with pulsed electric fields,» *Water Research*, vol. 36, n. 14, pp. 3429-3438, 2002.
- [61] Q. H. Zhang, F.-J. Chang e G. V. Barbosa-Cánovas, «Inactivation of microorganisms in a semisolid model food using high voltage pulsed electric fields,» *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, vol. 27, n. 6, pp. 538-543, 1994.
- [62] Y. Yonemoto, T. Yamashita, M. Muraji, W. Tatebe, Ooshima, H., J. Kato e K. Murata, «Resistance of yeast and bacterial spores to high voltage electric pulses,» *Journal of Fermentation and Bioengineering*, vol. 75, n. 2, pp. 99-102, 1993.
- [63] H. E. Jacob, W. Forster e H. Berg, «Microbial implications of electric field effects. II. Inactivation of yeast cells and repair of their cell envelope,» *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie*, vol. 21, n. 3, pp. 225-232, 1981.
- [64] R. P. Gupta e W. Murray, «Pulsed high electric field sterilization,» in *IEEE Pulsed Power Conference*, National Research Council, 1988.
- [65] A. V. Charles-Rodríguez, G. V. Nevárez-Moorillón, Q. H. Zhang e E. Ortega-Rivas, «Comparison of thermal processing and pulsed electric fields treatment in pasteurization of apple juice,» *Food and Bioproducts Processing*, vol. 85, n. 2, pp. 93-97, 2007.
- [66] J. Raso, M. L. Calderón, M. Góngora, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Inactivation of *Zygosaccharomyces bailii* in fruit juices by heat, high hydrostatic pressure and pulsed electric fields,» *Journal of Food Science*, vol. 63, n. 6, pp. 1042-1044, 1998.
- [67] J. Raso, M. L. Calderón, M. Góngora, G. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Inactivation of mold ascospores and conidiospores suspended in fruit juices by pulsed electric fields,» *LWT-Food Science and Technology*, vol. 31, n. 7, pp. 668-672, 1998.
- [68] Y. Wu, G. S. Mittal e M. W. Griffiths, «Effect of pulsed electric field on the inactivation of microorganisms in grape juices with and without antimicrobials,» *Biosystems Engineering*, vol. 90, n. 1, pp. 1-7, 2005.
- [69] Vega-Mercado, M.-B. O. H., B. L. Qin, F. J. Chang, M. M. Góngora-Nieto, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Non-thermal food preservation: pulsed electric fields,» *Trends in Food Science & Technology*, vol. 8, n. 5, pp. 151-157, 1997.
- [70] G. A. Evrendilek, Z. T. Jin, K. T. Ruhlman, X. Qiu, Q. H. Zhang e E. R. Richter, «Microbial safety and shelf-life of apple juice and cider processed by bench and pilot scale PEF systems,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 1, n. 1, pp. 77-86, 2000.
- [71] Q. H. Zhang, X. Qiu e S. K. Sharma, «Recent development in pulsed electric field processing,» in *New Technologies Yearbook*, Washington, DC, National Food Processors Association, 1997, pp. 31-42.
- [72] S. Min, Z. T. Jin, S. K. Min, H. Yeom e Q. H. Zhang, «Commercial-scale pulsed electric field processing of orange juice,» *Journal of Food Science*, vol. 68, n. 4, pp. 1265-1271, 2003.
- [73] Z. Liang, G. S. Mittal e M. W. Griffiths, «Inactivation of *Salmonella Typhimurium* in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field,» *Journal of Food Protection*, vol. 65, n. 7, pp. 1081-1087, 2002.
- [74] C. J. McDonald, S. W. Lloyd, M. A. Vitale, K. Petersson e F. Innings, «Effects of pulsed electric fields on microorganisms in orange juice using electric field strengths of 30 and 50 kV/cm,» *Journal of Food Science*, vol. 65, n. 6, pp. 984-989, 2000.
- [75] P. Elez-Martínez, R. C. Soliva-Fortuny e O. Martín-Belloso, «Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* suspended in orange juice using high-intensity pulsed electric fields,» *Journal of Food Protection*, vol. 67, n. 11, pp. 2596-2602, 2004.
- [76] P. Elez-Martínez, J. Escolà-Hernández, R. C. Soliva-Fortuny e O. Martín-Belloso, «Inactivation of *Lactobacillus brevis* in orange juice by high-intensity pulsed electric fields,» *Food Microbiology*, vol. 22, n. 4, pp. 311-319, 2005.
- [77] A. H. El-Hag, S. H. Jayaram e M. W. Griffiths, «Inactivation of naturally grown microorganisms in

- orange juice using pulsed electric fields,» *IEEE Transactions on Plasma Science*, vol. 34, n. 4, pp. 1412-1415, 2006.
- [78] T. Grahl, W. Sitzmann e H. 1. Markl, «Killing of microorganisms in fluid media by high-voltage pulses,» in *DECHEMA Biotechnology Conference*, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, 1992.
- [79] G. A. Evrendilek, Q. H. Zhang e E. R. Richter, «Inactivation of Escherichia coli O157: H7 and Escherichia coli 8739 in apple juice by pulsed electric fields,» *Journal of Food Protection*, vol. 62, n. 7, pp. 793-796, 1999.
- [80] B. L. Z. Qin, B.-C. Q., S. B. G. G. V. e P. D. Pedrow, «Inactivation of microorganisms by pulsed electric fields with different voltage waveforms,» *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 1, n. 6, pp. 1047-1057, 1994.
- [81] Q. H. Zhang, A. Monsalve-Gonzalez, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Inactivation of E. coli and S. cerevisiae by pulsed electric fields under controlled temperature conditions,» *Transactions of the ASAE.*, vol. 37, n. 2, pp. 581-587, 1994.
- [82] H. Vega-Mercado, O. Martin-Belloso, F.-J. Chang, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Inactivation of Escherichia coli and Bacillus subtilis suspended in pea soup using pulsed electric fields,» *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 20, n. 6, pp. 501-510, 1996.
- [83] J. E. Dunn e J. S. Pearlman, «Methods and apparatus for extending the shelf-life of fluid food products». Washington, DC: Brevetto 4.695.472, 1987.
- [84] J. Dunn, « Pulsed light and pulsed electric field for foods and eggs,» *Poultry Science*, vol. 75, n. 9, pp. 1133-1136, 1996.
- [85] J. J. Fernandez-Molina, E. Barkstrom, P. Torstensson, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Shelf-life extension of raw skim milk by combining heat and pulsed electric fields,» *Food Research International*, 1999.
- [86] B. Qin, U. R. Pothakamury, H. Vega, O. Martin, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Food pasteurization using high intensity pulsed electric fields,» *Food Technology*, vol. 49, n. 12, pp. 55-60, 1995.
- [87] M. L. Calderon-Miranda, «Inactivation of listeria innocua by pulsed electric fields and nisin,» Washington State University, Pullman, WA, 1998.
- [88] L. D. Reina, Z. T. Jin, A. E. Yousef e Q. H. Zhang, «Inactivation of Listeria monocytogenes in milk by pulsed electric field,» *Journal of Food Protection*, vol. 61, n. 9, pp. 1203-1206, 1998.
- [89] G. A. Evrendilek, Q. H. Zhang e E. R. Richter, «Application of Pulsed Electric Fields to Skim Milk inoculated with Staphylococcus aureus,» *Biosystems Engineering*, vol. 87, n. 2, pp. 137-144, 2004.
- [90] K. Shamsi, C. Versteeg, F. Sherkat e J. Wan, «Alkaline phosphatase and microbial inactivation by pulsed electric field in bovine milk,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 9, n. 2, pp. 217-223, 2008.
- [91] H. M. Craven, P. Swiergon, S. Ng, J. Midgely, C. Versteeg, M. J. Coventry e J. Wan, «Evaluation of pulsed electric field and minimal heat treatments for inactivation of pseudomonads and enhancement of milk shelf-life,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 9, n. 2, pp. 211-216, 2008.
- [92] A. Otunola, A. El-Hag, S. Jayaram e W. A. Anderson, «Effectiveness of pulsed electric fields in controlling microbial growth in milk,» *International Journal of Food Engineering*, vol. 4, n. 7, 2008.
- [93] L. Picart, E. Dumay e J. C. Cheftel, «Inactivation of Listeria innocua in dairy fluids by pulsed electric fields: influence of electric parameters and food composition,» *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 3, n. 4, pp. 357-369, 2002.
- [94] N. Dutreux, S. Notermans, T. Wijtzes, M. M. Gongora-Nieto, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Pulsed electric fields inactivation of attached and free-living Escherichia coli and Listeria innocua under several conditions,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 54, n. 1, pp. 91-98, 2000.

- [95] O. Martin-Belloso, B. L. Qin, F. J. Chang, G. V. Barbosa-Cánovas e B. Swanson, «Inactivation of *Escherichia coli* in skim milk by high intensity pulsed electric fields,» *Journal of Food Process Engineering*, vol. 20, n. 4, pp. 317-336, 1997.
- [96] B.-L. Qin, Q. H. Zhang, G. V. Barbosa-Cánovas, B. G. Swanson e P. D. Pedrow, «Pulsed electric field treatment chamber design for liquid food pasteurization using a finite element method,» *Transactions of the ASAE*, vol. 38, n. 2, pp. 557-565, 1995.
- [97] G. J. Fleischman, S. Ravishankar e V. M. Balasubramaniam, «The inactivation of *Listeria monocytogenes* by pulsed electric field (PEF) treatment in a static chamber,» *Food Microbiology*, vol. 21, n. 1, pp. 91-95, 2004.
- [98] A. Sobrino-López, R. Raybaudi-Massilia e O. Martín-Belloso, «High-intensity pulsed electric field variables affecting *Staphylococcus aureus* inoculated in milk,» *Journal of Dairy Science*, vol. 89, n. 10, pp. 3739-3748, 2006.
- [99] U. R. Pothakamury, «High voltage pulsed electric field inactivation of *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus delbrueckii*,» *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, vol. 35, n. 1, pp. 101-107, 1995.
- [100] U. R. Pothakamury, A. Monsalve-Gonzalez, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology,» *Food Research International*, vol. 28, n. 2, pp. 167-171, 1995.
- [101] M. I. Bazhal, M. O. Ngadi, G. S. V. Raghavan e J. P. Smith, «Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in liquid whole egg using combined pulsed electric field and thermal treatments,» *LWT-Food Science and Technology*, vol. 39, n. 4, pp. 420-426, 2006.
- [102] O. Martin-Belloso, H. Vega-Mercado, B.-L. Qin, F.-J. Chang, G. V. Barbosa-Cánovas e B. G. Swanson, «Inactivation of *Escherichia coli* suspended in liquid egg using pulsed electric fields,» *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 21, n. 3, pp. 193-208, 1997.
- [103] A. Malicki, M. Oziemblowski, J. Molenda, T. Trziszka e S. Bruzewicz, «Effect of pulsed electric field (PEF) on *Escherichia coli* within the liquid whole egg,» *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, vol. 48, n. 4, pp. 371-373, 2004.
- [104] J. Beveridge, K. Wall, J. Scott, S. Macgregor, J. Anderson e H. Rowan, «Pulsed electric field inactivation of spoilage microorganisms in alcoholic beverages,» *Proceedings of the IEEE*, vol. 92, n. 7, pp. 1138-1143, 2004.
- [105] E. Puértolas, N. López, Condón, S., J. Raso e I. Álvarez, «Pulsed electric fields inactivation of wine spoilage yeast and bacteria,» *International Journal of Food Microbiology*, vol. 130, n. 1, pp. 49-55, 2009.
- [106] C. Delsart, N. Grimi, N. Boussetta, C. M. Sertier, R. Ghidossi, M. M. Peuchot e E. Vorobiev, «Comparison of the effect of pulsed electric field or high voltage electrical discharge for the control of sweet white must fermentation process,» *Journal of Applied Microbiology*, vol. 120, n. 1, pp. 152-164., 2016.
- [107] H. Doevenspeck, «Method for treating beer». Washington, DC Brevetto 3.625.843, 1971.
- [108] H. M. Ulmer, V. Heinz, M. G. Gänzle, D. Knorr e R. F. Vogel, «Effects of pulsed electric fields on inactivation and metabolic activity of *Lactobacillus plantarum* in model beer,» *Journal of Applied Microbiology*, vol. 93, n. 2, pp. 326-335, 2002.
- [109] J. R. Beveridge, K. Wall, S. J. MacGregor, Anderson, J. G. e N. J. Rowan, «Pulsed electric field inactivation of spoilage microorganisms in alcoholic beverages and the influence of pulse profile,» in *IEEE International Pulsed Power Conference*, 2003.
- [110] G. A. Evrendilek, S. Li, W. R. Dantzer e Q. H. Zhang, «Pulsed electric field processing of beer: Microbial, sensory, and quality analyses,» *Journal of Food Science*, vol. 69, n. 8, pp. M228-M232, 2004.
- [111] M. Salmeri e A. Mencattini, *Misure e analisi dati*, Roma: TEXMAT, 2016.

- [112] R. V. Hogg e J. Ledolter, *Engineering Statistics*, New York: MacMillan, 1987.
- [113] C. Harvey, S. Rosen, J. Ramsey, C. Saunders e S. K. Guharay, «Computationally and statistically efficient model fitting techniques,» *Journal of Statistical Computation and Simulation*, pp. 1-15, 2016.
- [114] A. Mizuno e Y. Hori, «Destruction of living cells by pulsed high-voltage application,» *IEEE Transactions on Industry Applications*, vol. 24, n. 3, pp. 387-394, 1991.
- [115] D. Gášková, K. Sigler, B. Janderova e J. Plášek, «Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency,» *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, vol. 39, n. 2, pp. 195-202, 1996.

9 Abbreviazioni ed acronimi

ANOVA	Analysis of Variance
DC	Corrente continua
FDA	Food and Drug Administration
HHP	High Hydrostatic Pressure
NACMCF	Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods
OMS	Organizzazione Mondiale della Sanità
PEF	Pulsed Electric Fields
RMSE	Root Mean Square Error
UV	Radiazione Ultravioletta

CURRICULUM VITAE

di *Marcello Salmeri*, nato a Roma il 27 giugno 1963.

Marcello Salmeri consegue la **Laurea in Ingegneria Elettronica** nel 1989 presso l'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", e nel 1993 il **Dottorato di Ricerca in Ingegneria Elettronica, dell'Informazione e dell'Automazione**. Il 2 novembre 1994 prende servizio come **Ricercatore Universitario** presso il Dipartimento di Ingegneria Elettronica dell'Università di Roma "Tor Vergata". Il 1° ottobre 2005 prende servizio come **Professore Associato** presso l'Università di Roma "Tor Vergata". Attualmente è del SSD INF-ING/07 (Misure Elettriche ed Elettroniche).

*Gli argomenti di ricerca attualmente si articolano essenzialmente sulla **caratterizzazione metrologica di sistemi (di elaborazione e dispositivi)** e sullo **studio e implementazione di algoritmi e sistemi di elaborazione dati**.*

Queste tematiche sono state sviluppate in particolare negli ambiti delle apparecchiature e procedure diagnostiche nella medicina al fine di sviluppare metodi di supporto decisionali da parte del medico. Esse hanno coinvolto tra l'altro l'ideazione e la valutazione di metriche atte a valutare l'efficacia di sistemi di elaborazione in campo decisionale, in termini di specificità, sensibilità, accuratezza, precisione etc. e la modellizzazione, rappresentazione e propagazione dei contributi di incertezza di misura attraverso algoritmi e sistemi di acquisizione ed elaborazione di segnali e immagini e sistemi di previsione di serie di dati temporali.

Le ricerche hanno approfondito anche argomenti di analisi e processamento dati non convenzionali come reti neurali e sistemi in logica fuzzy.

Si è occupato nel settore della microelettronica di tematiche inerenti la valutazione della potenza dissipata e l'ottimizzazione di architetture per l'efficienza energetica.

*Tra le attività professionali ha svolto collaborazioni di consulenza per la valutazione di congruenza e la stesura di capitolati tecnici per diverse aziende (**Olivetti, Lottomatica, Ferrovie dello Stato**).*

*È stato consulente di **Texas Instruments, Alenia, Consultant, Q-Service, Dipartimento di Amministrazione Penitenziaria del Ministero di Giustizia, Geyser | 3, ENEA, Pragma, Lince, Xenta Systems**.*

*È stato collaboratore di CTU (**Consulente Tecnico di Ufficio**) di processi civili e penali per i tribunali di Velletri, Albano e Frascati e **Consulente di parte per l'Avv. Carlo Taormina** per procedimenti penali.*

*Attualmente è docente del corso di **Misure ed Analisi Dati**, in cui svolge il programma della teoria delle misure e dell'analisi statistica dei dati nonché tematiche relative al supporto alle decisioni.*

Il 29 luglio 2016 è stato nominato dal Rettore Coordinatore del Corso di Laurea in Ingegneria Elettronica.