



Ricerca di Sistema elettrico

Analisi primarie del vino e del latte crudo per l'inattivazione microbica mediante i campi elettrici pulsati - PEF

Francesca Bonfà, Ilaria Bertini, Anna Salama

TECNOLOGIA INNOVATIVA DEI PEF PER L'INATTIVAZIONE MICROBICA DEGLI ALIMENTI

Francesca Bonfà, Ilaria Bertini, Anna Salama (ENEA)

Settembre 2017

Report Ricerca di Sistema Elettrico

Accordo di Programma Ministero dello Sviluppo Economico - ENEA

Piano Annuale di Realizzazione 201

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

Progetto: Processi e macchinari industriali

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

Responsabile del Progetto: Ing. Ilaria Bertini, ENEA



Indice

SOMMARIO.....	4
FASE 1 – ANALISI MICROBIOLOGICA DI ALIMENTI LIQUIDI	5
1 IL VINO	5
1.1 FERMENTAZIONE SPONTANEA	5
1.2 LA COMPOSIZIONE DEL MOSTO D’UVA	6
1.2.1 <i>La popolazione microbica - condizioni di sviluppo</i>	6
1.3 LA FERMENTAZIONE ALCOLICA – CARATTERISTICHE	8
1.3.1 <i>L’influenza degli ioni e della temperatura sulla fermentazione</i>	10
1.4 I LIEVITI DEI MOSTI.....	11
1.4.1 <i>Lieviti Saccharomyces</i>	11
1.4.2 <i>Lieviti non –Saccharomyces</i>	12
1.5 I MICRORGANISMI DELLE UVE.....	14
1.5.1 <i>Batteri lattici</i>	15
1.5.2 <i>Batteri acetici</i>	16
1.5.3 <i>Acido acetico e acido lattico</i>	17
1.5.4 <i>Acidi organici</i>	17
1.6 LA FERMENTAZIONE MALOLATTICA – CARATTERISTICHE	18
1.6.1 <i>Interazioni microbiche e solfitazione</i>	19
2 IL LATTE	19
2.1 LE PROPRIETÀ CHIMICO- FISICHE DEL LATTE.....	19
2.2 MICRORGANISMI DEL LATTE	21
2.2.1 <i>Metabolismo dei microrganismi</i>	22
2.2.2 <i>Fattori che influenzano la resistenza termica dei microrganismi</i>	23
2.3 IL LATTE CRUDO	25
2.3.1 <i>La normativa per il latte crudo</i>	25
2.3.2 <i>Gli sporigeni del latte crudo</i>	27
2.3.3 <i>Sicurezza alimentare –criteri microbiologici per il latte crudo</i>	28
2.3.4 <i>Calcolo della media geometrica in condizioni di controllo di routine</i>	33
2.3.5 <i>Caratteristiche del latte trattato termicamente</i>	34
2.3.6 <i>Le conseguenze del riscaldamento</i>	34
FASE 2 – LA SPERIMENTAZIONE.....	35
3 RISULTATI	35
3.1 ANALISI MICROBIOLOGICA SPERIMENTALE DEI MOSTI E DEL LATTE CRUDO	35
3.2 IL PORTACAMPIONE PER ESPERIMENTI DEI PEF SUI LIQUIDI	38
3.2.1 <i>Applicazioni future- applicazione dopo l’imbottigliamento</i>	39
3.2.2 <i>Conclusioni</i>	39
BIBLIOGRAFIA	40

Sommario

L'obiettivo principale della presente attività riguarda, la caratterizzazione e l'analisi della composizione microbiologica del mosto di vino e del latte crudo, rispettivamente, nella fase di produzione e nella fase di mungitura. A tal fine, l'approvvigionamento del mosto è stato realizzato, presso le aziende produttrici locali, con una tempistica molto precisa e breve, ovvero, al momento della vendemmia. Allo stesso modo, è stata eseguita l'analisi microbiologica del latte crudo e dei mosti, ovvero, con una sequenza di sviluppo e ordine temporale, ben definita. Si evidenzia che i risultati, ottenuti dalle analisi microbiologiche, risultano conformi ai dati teorici della letteratura specialistica e ai dati sperimentali dei trattati scientifici, sia per quanto riguarda la tipologia di microrganismi rilevati e sia per il numero di microrganismi formanti la popolazione.

Nella previsione futura¹, di applicare i PEF mediante il prototipo di generazione degli impulsi ad alta tensione realizzato dall'università di Messina², il campione di mosto è stato immediatamente congelato dopo esser stato prodotto, al fine di bloccare la crescita della carica batterica. L'obiettivo che si intende perseguire, mira ad avere uno stato di contaminazione del prodotto, il più possibile rispondente alle condizioni reali della fase di produzione.

L'efficacia dei PEF, applicata al mosto scongelato e al latte crudo, sarà verificata effettuandone l'analisi microbiologica dei prodotti, subito dopo l'applicazione. Le condizioni al contorno per eseguire la sperimentazione, verranno determinate in base alle condizioni di sviluppo dei microrganismi e alle fasi di trasformazione dei componenti di origine, del mosto d'uva e del latte crudo.

Inoltre, per il latte crudo sono stati analizzati anche, i meccanismi attraverso i quali alcuni microrganismi patogeni, in particolare le spore, si riattivano a determinate temperature. Il rischio di riattivazione dei patogeni, assente nei PEF, unitamente alla conservazione delle qualità organolettiche degli alimenti rappresentano uno dei vantaggi dell'inattivazione microbica mediante i PEF, rispetto ai trattamenti termici. Affinchè la tecnologia dei PEF, non rimanga un traguardo di pura ingegnerizzazione, ma diventi un'innovazione ad elevato contenuto tecnologico, che interessi tutte le aree che ruotano intorno alla sfera della sicurezza alimentare, l'attività è stata condotta in sinergia con i soggetti competenti che vanno dall'enologia, alla scienza industriale del latte, all'ingegneria di potenza e al controllo merceologico di qualità.

A tal proposito, basandosi sulle specifiche richieste da ogni settore interessato, è emerso che l'applicazione con i PEF potrebbe essere veramente competitiva sia dal punto di vista della conservazione dei prodotti, ovvero, della sicurezza alimentare, e sia dal punto di vista della qualità. Pertanto, il consumatore finale potrebbe beneficiare di quei nutrienti che, altrimenti, verrebbero degradati dai trattamenti termici e chimici (ad es. sarà possibile consumare del latte crudo non pastorizzato³, vino senza solfiti).

¹ attività della prossima annualità

² nell'ambito del PAR 2016

³ nei limiti e con le precauzioni consentite dalla normativa vigente.

FASE 1 – Analisi microbiologica di alimenti liquidi

1 Il vino

Nell’ottica di garantire un prodotto (vino) caratterizzato da un livello di qualità superiore, rispetto a quello ottenuto mediante i metodi convenzionali⁴, nell’attività sono stati identificati e distinti, gli elementi “buoni” da preservare, da quelli patogeni da inattivare. A partire quindi, dai risultati descritti nel Report RdS/2015/071, sono stati studiati i meccanismi alla base della trasformazione del mosto d’uva in vino. A tal fine, sono stati valutati attentamente gli effetti che possono derivare dalla presenza di determinate condizioni fisiche e dalla composizione chimica del mosto.

Il mosto d’uva può considerarsi un “*substrato di sviluppo*”, con un contenuto di nutrienti⁵ avente caratteristiche chimico-fisiche ben definite, da cui dipendono l’avvio e la cinetica delle fermentazioni. Ad esempio lo sviluppo dei *Saccharomyces*, attori principali della fermentazione, non è ostacolato da un pH compreso tra [2,75÷2,42], mentre, lo stesso valore di pH influisce, negativamente, sullo sviluppo di altri microrganismi.

In tale contesto, l’attività ha un duplice obiettivo, che riguarda sia l’applicazione dei PEF in alternativa agli attuali trattamenti alimentari e sia, l’individuazione di eventuali punti deboli dei trattamenti convenzionali, che dovrebbero essere assenti nell’applicazione con i PEF⁶, come ad es. la riattivazione delle spore nel latte in determinate condizioni. Per tale ragione, nell’attività la caratterizzazione microbica del latte crudo e del mosto, unitamente, all’analisi microbiologica dei campioni rappresentano le basi per le applicazioni future dei PEF.

1.1 Fermentazione spontanea

Il processo biochimico di trasformazione del mosto d’uva in vino è un processo di conversione spontanea, in cui intervengono gli elementi principali “lieviti, muffe e batteri” che fermentano gli zuccheri del mosto e li trasformano in etanolo, CO₂ e altri metaboliti.

Le fermentazioni alcoliche spontanee derivano da molte specie di lieviti e di microrganismi, che si trovano nell’uva o nell’ambiente di vinificazione. Precisamente, l’avvio della fermentazione spontanea, anche identificata come la prima fase della trasformazione, è dovuta sia ai lieviti apiculati e sia a quelli *non Saccharomyces*, mentre, la seconda fase della fermentazione è principalmente condotta dai lieviti *Saccharomyces cerevisiae*.

In genere, si auspica che al termine della prima fase, la fermentazione sia completa. Questa, avviene ad opera dei *Saccharomyces*, che determinano la completa trasformazione degli zuccheri presenti. Tuttavia spesso, nelle fermentazioni incomplete, si verifica la presenza di zuccheri fermentescibili al termine del processo.

Infine, con riferimento alla “qualità dei vini nel caso in cui siano presenti dei lieviti quali *Schizosaccharomyces* e *Brettanomyces*, poiché, determinano la formazione di condizioni aromatiche sgradevoli, si verificano la diminuzione delle qualità organolettiche del vino.

Si evidenzia che le esigenze qualitative, sempre più stringenti, relative alla stabilizzazione chimica dei prodotti vinari, spingono a controllare il processo biochimico mediante l’inoculazione di ceppi di lieviti selezionati. Tuttavia, anche se rischiosa, la vinificazione spontanea continua ad essere sostenuta dalle caratteristiche di unicità e qualità autoctone, che sono quelle che definiscono e determinano la tipizzazione territoriale.

⁴ attualmente applicati

⁵ per la crescita dei lieviti

⁶ poiché applicando i PEF con determinate intensità di energia si otterrebbe la morte totale dei microrganismi

1.2 La composizione del mosto d'uva

Ne mosto d'uva sono contenuti in quantità equimolari, il glucosio e il fruttosio, che rappresentano le specie più comuni di esosi⁷ presenti [1]. Generalmente, il tenore totale in zuccheri è compreso tra [170÷220 g/l] e per essi si distinguono i pentosi arabinosio (0,2÷2 g/l) e lo xilosio (0,02÷0,1 g/l) che vengono metabolizzati dai batteri lattici, ma non sono fermentati da *S. cerevisiae*.

Per quanto riguarda gli acidi organici sono presenti, principalmente, l'acido tartarico e l'acido malico; mentre, in concentrazione minore ci sono anche gli acidi citrico e ascorbico. Si precisa che, l'acido malico può essere prodotto dai lieviti criotolleranti.

Con riferimento all'azoto e ai suoi composti, nel mosto sono presenti: ammoniaca, aminoacidi, peptidi, vitamine e proteine, che hanno una notevole influenza sullo sviluppo del lievito e sulla velocità di fermentazione⁸. Le percentuali dei composti azotati sono intorno a:

- [3÷10] per l'ammoniaca;
- [25÷30] per gli aminoacidi;
- [25÷40] per i peptidi;
- [5÷10] per le proteine.

Tra gli aminoacidi rientrano la prolina e l'arginina, mentre, per le vitamine rientrano la biotina, l'acido pantotecnico, l'acido nicotinico e la tiamina; tranne la biotina, le altre vitamine sono tutte sintetizzate dai lieviti. Si precisa inoltre, che la tiamina è utilizzata nella fermentazione dai lieviti, mentre, invece, è degradata dai solfiti qualora siano presenti⁹.

Infine, relativamente ai sali minerali presenti rientrano il potassio, il sodio, il calcio, il magnesio, il cloro e relativi fosfati e solfati.

Si evidenzia che, per le condizioni di anaerobiosi sono molto importanti gli steroli (ergosterolo) che assicurano la permeabilità della membrana della cellula di lievito; divengono quindi, indispensabili per la sopravvivenza.

1.2.1 La popolazione microbica - condizioni di sviluppo

La concentrazione della popolazione microbica sugli acini d'uva dipende dal loro grado di maturazione [1], [2]. Si stima che, la quantità microbica sugli acini immaturi sia bassa, di fatto, raggiunge al massimo tre ordini di grandezza (10^3) di ufc/g mentre, man mano che la maturazione si completa, possono raggiungersi anche valori compresi tra (10^4 ÷ 10^6) ufc/g.

I microrganismi presenti nel vigneto, e riscontrati sui grappoli d'uva, sono: i *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* e *Candida*.

Alcuni di essi, non hanno un'azione attiva nella fermentazione come ad es. l'*Aureobasidium* che non ha la capacità di fermentare gli zuccheri e di sopravvivere nel vino. Altri invece, come la specie *Aureobasidium pullulans* è in grado di competere e resistere ad altri funghi, oltre ad avere un'azione detossificante del solfato di rame. Si precisa, che l'attività antagonista di *Aureobasidium pullulans*, nei confronti di altri lieviti e funghi, è largamente documentata.

⁷ Glucide monosaccaride composto da sei atomi di carbonio

⁸ per tale ragione vengono aggiunti i sali d'ammonio

⁹ l'aggiunta delle vitamine è considerata una buona pratica

Nell'uva matura circa il 50-70% della popolazione microbica totale è rappresentata dai lieviti *Hanseniaspora spp (Kloechera)* e *Metschnikowia*, mentre, risultano meno predominanti i lieviti delle specie *Dekkera*, *Candida*, *Pichia*, ecc..

La crescita microbica sulla superficie degli acini dipende da numerose variabili, in parte, dovute alle condizioni climatiche, come la temperatura, l'esposizione ai raggi UV, la pioggia, la luce solare e il vento.

Nella fase di fermentazione spontanea, si sottolinea che il lievito *S.cerevisiae*, principale attore della fermentazione, è quasi sempre assente o presente in basse concentrazioni.

Si evidenzia che, non sono ancora ben definiti, i fattori che determinano la predominanza sugli acini di lieviti *non saccharomyces*, rispetto, altre specie di lieviti come *S. cerevisiae* presenti in quantità inferiori. Da alcuni dati sperimentali la loro concentrazione, sembrerebbe legata a fattori di diversa natura come stress ambientali dovuti a: temperatura, irradiazione, siccità o a fenomeni di interazione con altri lieviti, funghi e batteri.

Tra i lieviti *non saccharomyces* del mosto, dei quali verrà effettuata una precisa tipizzazione, possono essere distinti le seguenti categorie:

- lieviti dotati di metabolismo ossidativo (ad es. *Pichia*);
- lieviti caratterizzati da una debole attività fermentativa (lieviti apiculati);
- lieviti con attività metabolica di tipo fermentativa.

Alcuni di essi (ad es. *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, ecc.) sono anaerobi obbligati e quindi non si sviluppano durante la fermentazione, invece, altri ¹⁰sono caratterizzati da attività metaboliche di tipo fermentative e, se le condizioni di crescita non vengono opportunamente arrestate, provocano alterazioni della qualità del vino. Si sottolinea, che i lieviti *Saccharomyces* sono presenti con una bassa concentrazione, sia nell'uva e sia nel mosto.

Dall'analisi effettuata emerge che il processo di fermentazione spontanea, possa ritenersi un processo polimicrobico, in cui le diverse specie di lievito si sviluppano contemporaneamente e si susseguono nelle varie fasi del processo. In pratica l'evoluzione dei lieviti, continua durante la fermentazione alcolica, e le condizioni che via via si vengono a instaurare, si susseguono fino a diventare discriminanti, nel senso che, solo alcune specie di lieviti riescono a svilupparsi come ad esempio *S. Cerevisiae*.

All'inizio della fermentazione alcolica, si ha una presenza massiccia di lieviti aventi una scarsa capacità fermentativa come *Candida*, *Pichia*, *Rhodotorula*, ecc. Nei casi di fermentazioni di mosti ad elevata concentrazione zuccherina (uve molto mature), i lieviti apiculati come *Hanseniaspora* sono prevalenti sui lieviti *H. uvarum* e *C. stellata*.

Da alcuni studi emerge, che la loro evoluzione sarà caratterizzata dalla predominanza del *S. cerevisiae* con il procedere della fermentazione e dalla conseguente diminuzione dei lieviti *non saccharomyces*. Questi ultimi, grazie agli zuccheri e agli aminoacidi, formano altri composti secondari che determinano invece, la qualità finale del vino.

La concentrazione dei lieviti *non Saccharomyces*, negli acini sani generalmente è minore di 10^3 - 10^4 cellule/ml, mentre, negli acini con danni superficiali la concentrazione è molto alta e si attesta intorno a 10^6 - 10^7 cellule/ml. In questo caso, i lieviti *non Saccharomyces*, vista l'alta concentrazione, influenzeranno:

- l'avvio e l'andamento della fermentazione;
- la composizione del vino per la presenza di lieviti apiculati e batteri acetici¹¹;
- lo sviluppo e l'attività metabolica dei *Saccharomyces*, nonché, la loro cinetica di crescita.

La composizione chimica e la concentrazione alcolica, del mosto in fermentazione, determinano condizioni di sviluppo sfavorevoli ai lieviti *non Saccharomyces* e favorevoli ai *Saccharomyces*; i quali, grazie alla maggiore capacità alcoligena, riescono a completare la fermentazione.

¹⁰ ad es. la *Candida*

¹¹ con conseguente produzione di quantità elevate di acido acetico

I lieviti con elevato potere alcoligeno sono quelli sporigeni e appartenenti alla specie *S. cerevisiae*.

La loro capacità fermentativa dipende dal tenore di etanolo e si distinguono in quelli :

- caratterizzati da una buona capacità fermentativa anche per valori di etanolo > del 14% ;
- con una discreta capacità fermentativa come la *C. stellata*, che resiste sino al 12 % di etanolo.

Si evidenzia che al termine della fermentazione, in presenza di aria, si sviluppano i lieviti della fioretta *P. membranifaciens* e *Candida vini*. Questi lieviti non sono elementi attivi nella fermentazione, ma formano un velo bianco superficiale e ne riducono il grado alcolico.

Durante la fermentazione, all'interno di una specie, l'aumento della concentrazione di etanolo determina: lo sviluppo, la cinetica di crescita e l'entità dei ceppi. Questi sono tutti elementi che influenzano le caratteristiche organolettiche del prodotto finale.

La presenza, lo sviluppo e la concentrazione dei lieviti durante la fermentazione alcolica dipendono dalla composizione iniziale della popolazione presente e a sua volta, la composizione chimica del mosto dipende anche dall'impiego di tecniche di vinificazione (come l'impiego degli starter o la presenza di residui di pesticidi).

Per quanto riguarda i corrispondenti fattori di sviluppo dei lieviti, possono distinguersi in:

- fattori di natura chimica rappresentati dalla presenza di etanolo, ossigeno, anidride solforosa, composti dell'azoto, nutrienti, minerali, anidride carbonica;
- fattori di natura fisica rappresentati dalla temperatura e pressione osmotica;
- fattori di natura biologica come la composizione della popolazione iniziale e l'interazione con altri microrganismi.

Come illustrato, nell'annualità precedente, i microrganismi hanno le loro temperature di sviluppo che si distinguono in: minima, massima e ottimale.

Poiché l'attività mira a definire le condizioni e i parametri di sopravvivenza dei microrganismi nella fermentazione, ed avendo il ceppo *S. cerevisiae* un ruolo fondamentale, si evidenzia che la sua temperatura massima risulta compresa tra [35÷43 °C], al contrario, di altri ceppi come ad esempio *S. bayanus* che non sviluppano a T>35 °C.

1.3 La fermentazione alcolica – caratteristiche

La trasformazione del mosto in vino segue un modello di sviluppo microbico caratterizzato dalle fasi di incubazione, di fermentazione esponenziale, di sviluppo stazionario e di morte. La crescita microbica rappresentata nella Figura 1.1, esprime la legge matematica di Gompertz riportata nell'espressione (1).

$$N = K e^{\left(-e^{-\frac{\alpha s}{k}(y-t)}\right)} \quad (1)$$

Come si evince dalla Figura 1.1, all'inizio la crescita è quasi esponenziale, successivamente, rallenta diventando quasi lineare, per raggiungere una posizione asintotica dove non c'è più crescita.

Nella fase di incubazione le cellule di lievito (N) presenti, naturalmente o inoculate, si trasformano facendo sì che le neofornate risultino equivalenti al numero di cellule morte; pertanto, la velocità di sviluppo (dN/dt) sarà nulla [1].

Nella fase esponenziale di sviluppo o di fermentazione, la relativa velocità sarà proporzionale (attraverso una costante m) alle cellule presenti all'istante t (dN/dt= mN).

Nella fase stazionaria, le cellule non si trasformano più, per cui la velocità sarà nulla (asintoto orizzontale della curva) e in questa fase lo sviluppo delle cellule prodotte (etanolo e anidride carbonica) corrisponde al

valore massimo K dell'equazione. Nella realtà sperimentale è stato osservato, uno sfasamento temporale tra la fermentazione e lo sviluppo cellulare. Infine, nella fase di morte risulta $-dN/dt > dN/dt$.

In base alle caratteristiche della cinetica espresse dalla legge di Gompertz e rappresentati in Figura 1.1, si sottolinea che:

- la durata della fase di incubazione (γ);
- la velocità massima di crescita (α_{max});
- il massimo livello di sviluppo di alcool o anidride carbonica;

dipendono dalla natura del ceppo, dal tipo di maturazione dell'uva, dalla quantità di zuccherina presente nell'uva, dalla temperatura di fermentazione e, dai trattamenti di filtrazione e di purificazione.

La velocità e l'efficienza della fermentazione dipendono dall'equilibrio nutrizionale dei mosti, che a sua volta dipende sia dalle tecniche di chiarificazione degli stessi e sia dalla maturazione tecnologica dell'uva.

A riguardo si distinguono l'equilibrio **fisiologico** e quello **tecnologico**.

La maturazione fisiologica si ha quando gli zuccheri nelle uve raggiungono una fase stazionaria, mentre, la maturazione tecnologica si ha quando si raggiunge un equilibrio ottimale dei nutrienti per i lieviti, in termini di azoto amminoacidico, fosfati, ammonio e una giusta acidità. Si evidenzia che, non sempre, la velocità di crescita aumenta con l'aumentare della quantità di nutrienti, bensì, il valore massimo si ha quando si raggiunge l'equilibrio tecnologico.

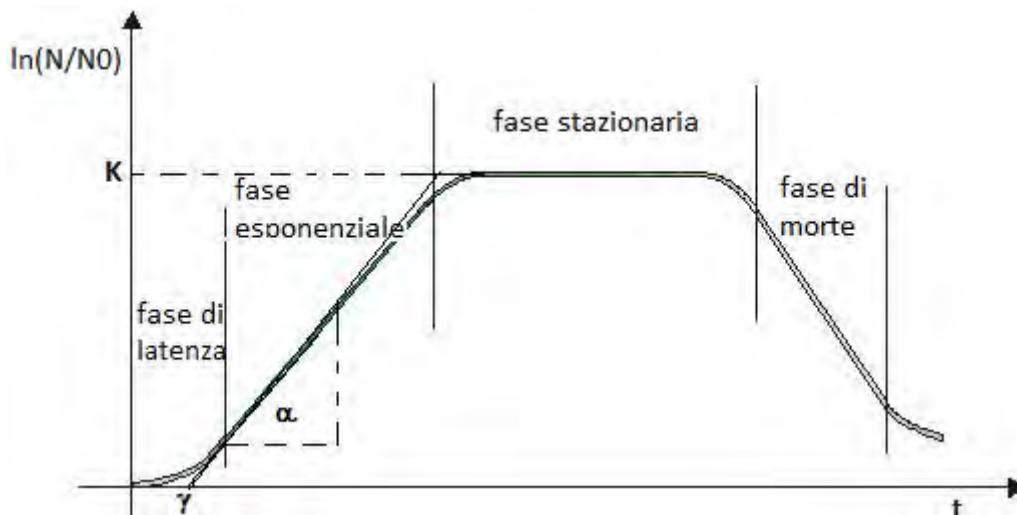


Figura 1.1. Rappresentazione della crescita microbica a S dell'equazione di Gompertz

Per ogni tipo di mosto risulta un determinato andamento dei fattori nutrizionali (azoto totale, azoto amminoacidico, ammonio, fosfati) e dei valori di pH, che dipendono dal livello di maturazione. Pertanto, è importante conoscere la dipendenza tra la velocità e tali fattori, che potrebbero indicare il procedere della fermentazione. Ad esempio in alcuni studi, per il ceppo di *S. cerevisiae*, si ha una dipendenza positiva della velocità dalla quantità di ammonio, dai gradi Brix e dall'azoto totale. Si precisa, ancora una volta, che il consumo di zuccheri corrisponde al procedere della fermentazione e viene misurato come diminuzione dei gradi °Brix.

Tra gli aspetti più delicati da controllare, rientrano il monitoraggio degli arresti della fermentazione e la causa dell'arresto, ovvero, capire la causa per cui la fermentazione si sia bloccata prima che tutti gli zuccheri siano stati convertiti in etanolo e anidride carbonica.

Nella pratica enologica, solitamente, si verificano due tipi di fermentazioni: le fermentazioni lente e le fermentazioni interrotte o arresti. Le prime si verificano quando la fermentazione è difficoltosa/prolungata da giorni o da settimane, mentre, nel caso degli arresti la fermentazione si arresta prima che i lieviti abbiano consumato tutti gli zuccheri.

Dalla letteratura si riscontrano le situazioni di seguito elencate.

- a) Nelle fermentazioni regolari si riscontrano:
- un tempo di fermentazione medio è di (170 ± 12) ore;
 - una produzione di secco di $(5,8 \pm 12)$ [g/l];
 - una produzione di etanolo finale è di 12.7 (%v/v);

mentre

- b) nelle fermentazioni rallentate si hanno:
- un tempo di fermentazione medio è di (700 ± 10) ore;
 - una produzione di secco di $(1,5 \pm 2)$ [g/l];
 - una produzione di etanolo finale è di 9.5 (%v/v).

Si osserva che, l'alto tenore degli zuccheri nelle uve e le temperature troppo elevate rappresentano delle potenziali cause di arresto e/o rallentamento delle fermentazioni.

Le fermentazioni rallentate sono fortemente dipendenti dalla concentrazione di azoto poiché, lo stesso influisce in modo rilevante sul metabolismo e lo sviluppo dei lieviti.

Le concentrazioni di azoto dovrebbero essere dell'ordine dei 350 mg/l, mentre, i valori ottimali del contenuto di azoto si attestano nell'intervallo tra $[150 \pm 400]$ (mg/l). Si ribadisce che, la concentrazione dipende dallo stato delle uve e dalle condizioni di fermentazione; ad es. in presenza di "frutti" deteriorati, si riscontrano bassi tenori di azoto che possono aumentare nel caso di procedimenti di chiarificazione.

1.3.1 L'influenza degli ioni e della temperatura sulla fermentazione

Un altro aspetto molto importante analizzato è la composizione ionica del mosto, in quanto, influenza sia l'applicazione dei PEF e sia il processo di fermentazione.

Gli effetti causati dagli ioni, nonostante riguardino aspetti tra loro indipendenti, influiscono sulla qualità del vino.

In pratica, per quanto riguarda i PEF, la composizione ionica determina la conducibilità elettrica del mezzo e, quindi definisce i risultati che si otterranno applicando i PEF, mentre, per quanto riguarda l'attività metabolica, che varia in funzione del tipo di ione, possono verificarsi effetti inibitori oppure stimolanti. Di fatto, i cationi possono influenzare la crescita e/o la fermentazione dei lieviti.

Tra quelli più diffusi rientrano: il boro, il calcio, il ferro, lo zinco, il magnesio, il rame e il potassio.

Nelle Tabella 1-1 e Tabella 1-2, riferendosi all'azione stimolante, sono riportate le concentrazioni relative, mentre, nelle Tabella 1-3 e Tabella 1-4 si riportano i valori relativi all'azione inibente.

Precisamente, sono riportati i valori ottimali di concentrazione per la crescita dei lieviti e per la fermentazione del mosto d'uva nelle Tabella 1-1 e Tabella 1-2.

Tabella 1-1. Optimum delle concentrazioni molarie [mM] dei cationi, per crescita e fermentazione

BORO	CALCIO	FERRO	ZINCO	MAGNESIO	RAME	POTASSIO
0,4	4,5	0.001÷0.003	0.004÷0.008	2÷4	1,5	0.002÷0.004

Nella Tabella 1-2, invece, sono riportati i fabbisogni minimi.

Tabella 1-2. Valori minimi delle concentrazioni molarie [mM] dei cationi, per crescita e fermentazione

BORO	CALCIO	FERRO	ZINCO	MAGNESIO	RAME	POTASSIO
0.002÷0.005	0.25÷0.50		0.001÷0.003	1,7		

Per quanto riguarda la parziale inibizione della crescita dei lieviti, si riportano i valori in Tabella 1-3.

Tabella 1-3. Valori di inibizione parziale delle concentrazioni molarie [mM] dei cationi

BORO	CALCIO	FERRO	ZINCO	MAGNESIO	RAME	POTASSIO
1÷5	>1	10/15			>0.001	>10

Per quanto riguarda l'effetto inibente totale, si riportano in Tabella 1-4 i valori delle concentrazioni dei cationi.

Tabella 1-4. Valori di inibizione totale delle concentrazioni molarie [mM]

BORO	CALCIO	FERRO	ZINCO	MAGNESIO	RAME	POTASSIO
40	>1		40	1	0.15	2

La composizione ionica dei mosti dipende, principalmente, dalle caratteristiche del suolo e dal tipo di vitigno. Tra i cationi, sopra elencati, il Magnesio ha un ruolo fondamentale sulla crescita e la completezza della fermentazione, per la sua azione protettiva dei lieviti dagli stress, in quanto favorisce l'omeostasi e la duplicazione del DNA delle cellule.

Si evidenzia, che la completezza della fermentazione dipende dal legame tra la composizione ionica e la temperatura, alla quale viene condotto il processo di fermentazione.

Da alcuni studi sperimentali sui mosti, è emerso che la concentrazione di Mg^{2+} influisce positivamente sia sulla velocità di fermentazione che sulla completezza della stessa, in particolare, quando le temperature di fermentazione sono sovra ottimali. Tuttavia, tale effetto positivo si riscontra anche a temperature basse come ad es. a 10 ° C. Di fatto, è stato rilevato che anche se la fermentazione è rallentata si registra una fermentazione completa anche rispetto al valore ottimale di 25 ° C per i lieviti. Infine, come più volte detto, non si può prescindere dall'interazione tra le variabili in gioco, ad es. una temperatura di 36 ° C comporta una velocità alta, che però arresta la fermentazione anticipatamente. Concludendo, si può affermare che l'aggiunta di ioni come Mg^{2+} migliora l'azione del lievito.

1.4 I lieviti dei mosti

1.4.1 Lieviti *Saccharomyces*

Il ruolo principale della fermentazione è svolto dai lieviti che trasformano gli zuccheri in etanolo e anidride carbonica. La loro attività metabolica, unitamente, a quella dei batteri acetici e lattici determina l'aroma del vino, attraverso la formazione di composti secondari [1].

In pratica, le condizioni all'inizio della fermentazione come il basso pH e l'alta concentrazione di zuccheri, non rendono il mosto facilmente aggredibile dai microrganismi. In effetti, risulta sempre più difficile lo sviluppo microbico, man mano che gli zuccheri si trasformano in etanolo e si riducono progressivamente i nutrienti come l'azoto, le vitamine e i lipidi. A queste situazioni, si aggiungono la competizione e la relativa capacità di sopravvivenza tra i gruppi microbici, ad es. al termine della fermentazione i batteri lattici e quelli acetici sono favoriti nello sviluppo dall'autolisi dei lieviti, che aumenta la quantità di aminoacidi e di vitamine nel vino.

I lieviti *Saccharomices*¹² appartengono al regno dei funghi; quelli più importanti, per la fermentazione del vino, sono *S. cerevisiae* e *S. bayanus var uvarum*¹³.

Per quanto riguarda le caratteristiche topologiche di fermentazione, *S. bayanus* è un lievito criofilo o criotollerante, cioè resistente al freddo, mentre *S. cerevisiae* è termotollerante.

¹² famiglia Saccharomycetaceae

¹³ per la birra si rileva anche il lievito *Sacharomyces pastorianus*

I ceppi criotolleranti riescono a fermentare bene tra 6 °C e 30°C , mentre, i ceppi termotolleranti fermentano tra 12-36 °C. Il ceppo *bayanus* ha una maggiore capacità di produrre alcoli superiori, glicerolo e, rispetto a *S. cerevisiae*, produce una minore quantità di acido acetico.

Il *S. cerevisiae*, come più volte ripetuto, è il lievito più importante della vinificazione, grazie alle sue capacità fermentative domina nelle fermentazioni spontanee ed è sempre più utilizzato come starter nella fermentazione. Tra le sue caratteristiche, si evidenzia la capacità di raddoppiare la propria massa ogni 90 minuti, lo sviluppo avviene per gemmazione multilaterale.

Il *S. cerevisiae* appartiene al mondo dei microrganismi anaerobi facoltativi. In pratica, in presenza di ossigeno¹⁴ le cellule del fungo¹⁵ trasformano 1 mole di zucchero (C₆H₁₂O₆) in 6 moli di anidride carbonica (CO₂) e 6 moli di acqua. Mentre in assenza di ossigeno il lievito avvia la fermentazione alcolica¹⁶ durante la quale 1 mole di glucosio viene trasformata in 2 moli anidride carbonica (CO₂) e 2 moli di etanolo (CH₃CH₂OH), attraverso una reazione esoenergetica.

Si precisa, che l'elevata concentrazione zuccherina dei mosti d'uva comporta che il lievito possa effettuare prioritariamente la fermentazione alcolica anche in presenza di ossigeno¹⁷.

I dettagli del processo di fermentazione mediante il quale avviene la trasformazione, del mosto in vino ad opera del lievito *Saccharomyces*, in termini: di concentrazioni, di processo e di resa, verranno illustrati solo per la parte di produzione di prodotti secondari. In particolare, si focalizzerà l'attenzione sui prodotti secondari che potrebbero provocare delle alterazioni al vino riducendone le proprietà organolettiche dello stesso.

1.4.2 Lieviti non –*Saccharomyces*

Le qualità dei vini potrebbero dipendere, sia positivamente e sia negativamente, dalla presenza di lieviti non *Saccharomyces* che possono svilupparsi all'inizio della fermentazione alcolica o anche dopo che sia stata avviata. Essi derivano, prevalentemente, dall'uva ma possono anche svilupparsi in cantina (come il *Dekkera bruxellins* appartenente al *Brettanomyces bruxellensis*). Questi ultimi si insediano negli interstizi delle botti in legno, mentre, quelli derivanti dalle uve dipendono principalmente da fattori come la piovosità, eventi atmosferici come la grandine, trattamenti fitosanitari, tipologia del terreno, infestazioni parassitarie come la botrite peronospora. Se il loro sviluppo avviene all'inizio, non resisteranno alle condizioni innescate dalla stessa, di fatto è sufficiente un tenore di 4% in volume per inattivarli, essendo sensibili all'etanolo.

Alcuni dei lieviti non *saccharomyces* sono resistenti all'azione di *S. cerevisiae* e si sviluppano quando si è conclusa la fermentazione, soprattutto, quando *S. cerevisiae* subisce la fase di autolisi. Essi non sono resistenti all'etanolo, ad es. il lievito *Hanseniaspora uvarum* appartenente al ceppo *Kloechea apiculata*, contrariamente al *Pichia membranifaciens*, responsabile della "fioretta", che è molto resistente all'alcol e si sviluppa alla fine della fermentazione.

Al fine di individuare lo stato in cui si presentano i lieviti non *Saccharomyces*, si illustrano di seguito i principali.

- *Haseniaspora-Kloechea* (*Has.-Kloe.*). Questo genere appartiene alle *Saccharomycetales*, famiglia delle *Saccharomycodaceae*, si riproduce per gemmazione bipolare che porta ad un allungamento della cellula, determinandone una forma allungata ovoide-apiculata, da cui il nome di lieviti apiculati. Essi sono lisci e assumono una colorazione crema o verde (nel caso venga utilizzato il terreno di crescita WLN). Nella categoria *Has.-Kloe.* rientrano 11 specie: *H. clermontiae*, *H. valbyensis*, *H. lachancei*, *H. mryeri*, *H. occidentalis*, *H. opuntiaiae*, *H. pseudoguilliermondii*, *H.*

¹⁴ metabolismo di tipo respiratorio

¹⁵ attuano un metabolismo di tipo respiratorio

¹⁶ la fermentazione è inibita in presenza di ossigeno (effetto Pasteur)

¹⁷ Effetto Crabtree, con cui si manifesta per concentrazioni di glucosio >9 g/l la repressione dello stesso

guilliermondii, *H. uvarum*, *H. osmophila* e *H. vineae*. Si evidenzia che, gli ultimi quattro rivestono una particolare importanza in enologia. Questi lieviti hanno buone caratteristiche fermentative e sono i primi ad innescare la fermentazione alcolica, inoltre, sono in grado di utilizzare gli zuccheri e incrementare il grado alcolico. Tuttavia, non essendo capaci di resistere all'alcol vengono fagocitati da *S. cerevisiae*; è sufficiente un grado alcolico di 3-4% vol per essere disattivati. Si noti che, oltre al grado alcolico, anche altri fattori influiscono sulla resistenza ad es. se la temperatura di fermentazione è < 20 °C (fermentazioni di vino bianco) la resistenza all'alcol di *K. Apiculata* sale fino a 10-12% vol. Il controllo degli apiculati in genere viene effettuato tramite l'aggiunta di solfiti .

- *Metschnikowia* (*Metsch.*). Questo genere appartiene alle *Saccharomycetales*, famiglia delle *Metschnikowiaceae*, si riproduce per gemmazione multilaterale e le cellule sono sferiche ed ellittiche. Le specie del ceppo sono circa 40, ma in enologia quelle che hanno un elevato interesse sono *M. pulcherrima* e *M. fructicola*. Essi sono sensibili e poco competitivi, di fatto vengono disattivati all'avvio della fermentazione alcolica.
- *Candida-Starmerella* (*Cand.- Starm.*). Il genere *Cand.* comprende circa 314 specie mentre, il genere *Starm* comprende solo la *St. bombicola* (di interesse in enologia) e *St meliponirum*. Per il genere *Cand.* le specie *C. stellata* , *St. bombicola* e *C. zemplinina* presentano una forma globosa ed ellittica. Questi ultimi manifestano una ridotta capacità di crescita, una bassa velocità di fermentazione e una capacità media di produrre etanolo. Inoltre presentano la tendenza a produrre alte concentrazioni di glicerolo e consumano più rapidamente il fruttosio rispetto al glucosio. Questi lieviti si trovano nell'uva appassita o sovramatura.
- *Pichia* (*Pic.*). Questo genere appartiene alle *Saccharomyceta*, famiglia *Pichiaceae*. Il genere *Pic.* comprende 20 specie di interesse enologico quali: *P. fermentans*, *P. kluyveri*, *P. membranifaciens* e *P. occidentalis*. La riproduzione è di tipo multilaterale e presentano delle cellule allungate ellissoidali, degli zuccheri presenti solo il glucosio è fermentato. Sono poco competitivi nei confronti dei *Saccharomyces* ma sono resistenti all'etanolo e pertanto hanno la capacità di svilupparsi nel vino.
L'ossigeno esercita un'azione di controllo su questi lieviti, nel senso che a causa della loro ossidazione vengono prodotti dei metaboliti secondari responsabili delle modifiche sensoriali del vino, così come sono i responsabili della fioretta.
- *Wickerhamomyces* (*Wich*). Questo genere appartiene alle *Saccharomycetales* e alla famiglia delle *Wickerhamomycetaceae*. Le specie sono circa 17, ma solo *W. Anomalus* è di interesse enologico. La riproduzione avviene per gemmazione multilaterale e le cellule sono sferiche ovoidali o allungate.
- *Saccharomycodes* (*Sacch.*). Questo genere appartiene alle *Saccharomycetales* e alla famiglia delle *Saccharomycodeae*. Si riproduce per gemmazione bipolare, la specie *Sacch. ludwigii* è importante in enologia ed è resistente all'anidride solforosa. In particolare, esercita una buona attività fermentativa producendo gas; inoltre, provoca alterazioni sensoriali anche nei così detti mosti "muti".
- *Torulaspora* (*Tor.*). Questo genere appartiene alle *Saccharomycetales* e alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*. In enologia, sono importanti 6 specie e tra essi il più importante è *T. delbrueckii*. Si riproduce mediante gemmazione multilaterale, hanno forma globose o ellittiche, le più grandi, mentre quelle piccole assumono una forma sferica. Alcune volte presentano delle protuberanze che le rendono riconoscibili al microscopio. La specie *T. delbrueckii* presenta una buona capacità fermentativa e resistenza all'alcol (fino a 12-13%), si trova nelle uve mature e nei mosti in fermentazione e insieme a *S. cerevisiae*, rappresentano le specie più attive nella fase intermedia (4-8% vol) delle fermentazioni spontanee. Si evidenzia, che negli ultimi anni è prassi inoculare *T. delbrueckii* e *S.cerevisiae* per conferire un grado aromatico superiore a quello ottenuto con il solo *S.cerevisiae*.

- *Zygosaccharomyces (Zyg.)*. Questo genere appartiene alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*; anche per esso ci sono 6 specie, ma sono di interesse enologico le specie *Zyg. Rouxii* e *Z. bailii*. Si riproduce per gemmazione multilaterale e le cellule hanno una forma sferica, ovale allungata. Questi lieviti presentano una buona capacità fermentativa fino a valori di etanolo dell'8-12% vol, consumano il fruttosio e crescono in presenza di alte concentrazioni zuccherine. Essi sono considerati molto importanti, poiché degradano facilmente la qualità del vino (soprattutto bianchi e dolci) , di fatto sono alcol-tolleranti e sono molto resistenti ai principali antisettici. La loro caratteristica è la presenza di fruttosio, che risulta maggiore del glucosio. Essi fanno parte della categoria dei lieviti fruttosofili, per i quali il fruttosio rappresenta lo zucchero e sono generalmente impiegati per far ripartire le fermentazioni che hanno subito degli arresti.
- *Lachancea-Kluyveromices (Lach.-Kluy.)*. Questo genere appartiene alla famiglia delle *Saccharomycetaceae*; il genere *Kluyveromices* presenta sei specie delle quali *Kluy. Lactis* e *kluy marxianus* presentano buone capacità di fermentare il lattosio. Dal punto di vista enologico, la specie *Lach. Thermotolerans* è molto importante, classificata in passato come *Sacc. Veronae*, è stata sempre ricordata per la bassa produzione di acidità volatile e per tale ragione è stata proposta in fermentazione sequenziale con *S. cerevisiae* . Si riproduce mediante gemmazione multiporale, la forma della cellula è ovoidale e cilindrica allungata. Recentemente, si è visto che *L. thermotolerans* è in grado di produrre acido D-lattico, quindi può essere impiegato per controllare e mantenere fissa l'acidità volatile nelle fermentazioni spontanee con *S. Cerevisiae*.
- *Schizasaccharomyces (Sch.)*. Questo genere appartiene alla famiglia delle *Saccharomycetales*, si distinguono tre specie *Sch. japonicus*, *Sch. Octosporus* e *Sch. Pombe*. La caratteristica principale, di questo genere, riguarda la capacità di convertire l'acido-malico in etanolo.
- *Dekkera –Brettanomyces (dek.-Bret.)* . Questo genere appartiene alla famiglia delle *Saccharomycetales* e include per il *Dekkera* due specie: *Dek. Anomalus* e *D.bruxellensis*, mentre, per il *Brettanomyces* include tre specie *B. custersianus*, *B. naardenensis* e *B. nanus*. Le cellule possono essere sferiche e sub-globose con forma ogivale. Essi mostrano capacità di crescita in condizioni limitanti per i nutrienti. I Dek.-Bret. sono pericolosi alterativi dei vini e la loro crescita aumenta con lo sviluppo fermentativo. Inoltre, anche uno sviluppo limitato $> 10^3$ cell/ml porta a produrre etil-fenoli, che causano un gusto di "medicinale" o di "stalla". Tra i metodi adottati per la loro eliminazione rientrano: la filtrazione, l'uso di antisettici (acido benzoico, ascorbico), l'uso di composti biologici e l'uso di anidride solforosa.

1.5 I microrganismi delle uve

Lo stato di "salute" delle uve, come visto, è uno dei principali fattori che determinano la qualità del vino.

Gli acini possono essere un bacino attivo per lo sviluppo di lieviti, batteri e funghi; in particolare, una piccola lacerazione della buccia d'uva diviene un veicolo di nutrimento per i microrganismi [2].

In questo caso, la zuccherina contenuta diventa il nutrimento dei microrganismi presenti sull'acino e ne favorisce la loro moltiplicazione. Tutto ciò non si verifica se gli acini sono integri, di fatto, in presenza di uve sane e integre la carica batterica è inferiore a $10^3 - 10^4$ [ufc/g o ufc/l](unità formanti colonie al grammo o al litro di mosto), al contrario, la carica batterica risulterà molto più grande e pari all'incirca 10^7-10^8 [ufc/g].

Nelle uve possono essere presenti i seguenti i microrganismi :

- lieviti quali *Criptococcus*, *Aurobasidium* , *Rhodotorula*, *kloechera/Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Hansenula*, *Candida* e *Saccharomyces*;
- batteri quali bacilli, batteri lattici, batteri acetici ;
- funghi quali *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor* e *Botrytis*.

Nella pratica enologica, tale inconveniente può essere eliminato con la semplice rimozione degli acini marci o ammuffiti. Inoltre, durante la vendemmia è buona pratica effettuare la raccolta dell'uva in cassette di plastica disinfettate e effettuare in tempi rapidi la pigiatura.

1.5.1 Batteri lattici

I batteri lattici (LAB) sono batteri gram +, presentano richieste nutrizionali complesse come le fonti azotate e vitaminiche, inoltre, alcuni microrganismi producono acido lattico dalla fermentazione degli zuccheri. Tuttavia, sono molto diffusi e hanno un ruolo importante nei processi fermentativi naturali e contribuiscono a determinare la qualità organolettica dei prodotti finali. Essi sono micro-aerofili e presentano un'elevata tolleranza all'alcol, tali caratteristiche consentono ai microrganismi di svilupparsi nel vino in assenza di ossigeno. I LAB sono i responsabili della fermentazione malolattica (FML) che può essere voluta, in base al tipo di vino che si intende produrre, e permettono di abbassare l'acidità dei vini. I LAB di interesse enologico sono rappresentati dai:

- *Lactobacillus* formati dai bacilli o cocco-bacilli, caratterizzati da diversi livelli di acidofilia. La temperatura di crescita è compresa tra [2÷53] °C, crescono in un intervallo di pH [3÷8]. Particolarmente importanti sono *L. oeni*, *L. uvarum*, *L. vini*. Il metabolismo dei *L.* dipende dal tipo di zucchero che convertono, si distinguono i *L.* omofermentanti obbligati che convertono gli zuccheri esosi in acido lattico mediante glicolisi, mentre i *L.* eterofermentanti facoltativi convertono sia gli zuccheri esosi e sia i pentosi.
- *Pediococcus* sono bacilli cocco omofermentanti. La temperatura di crescita è compresa tra [25÷35]°C, crescono a pH 5. Si distinguono i *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*.
- *Leuconostoc* presentano una forma ovale, coccoide o sferica, sono tolleranti all'etanolo e crescono anche a 4 °C. Il *L. mesenteroides* e *L. Oeni* sono tipicamente presenti nei mosti.
- *Oenococcus* è un genere che comprende solo: *O. oeni* e *kitaharae*, il primo ha caratteristiche adatte alla fermentazione malo lattica FML mentre, *O. kitaharae* non è in grado di effettuarla. Il *L. Oeni* è generalmente presente sia sugli acini d'uva e sia nel mosto nel quale conduce la FML. Sono batteri anaerobi facoltativi, acidofili, crescono a pH 4.8 e a una temperatura ottimale compresa tra [27÷30] °C. I tempi di crescita sono piuttosto lunghi (almeno 5 gg per assumere dimensioni visibili di circa 1 mm) e il metabolismo è del tipo etero fermentante obbligato e produce acido D - lattico, etanolo o acido acetico e anidride carbonica.

All'inizio della fermentazione alcolica i LAB, insieme ai lieviti, crescono e si moltiplicano. Tuttavia, l'aumento del contenuto in etanolo provoca l'abbattimento dei LAB fino a valori di 10^2 - 10^3 ufc/ml e la loro diminuzione è tanto maggiore quanto più basso è il valore del PH.

Dopo la fermentazione alcolica i lieviti *O. oeni* iniziano a moltiplicarsi, fino a raggiungere la concentrazione di circa 10^6 ufc/ml, alla quale segue l'inizio della fermentazione malo lattica detta fermentazione secondaria. Al termine della fermentazione malo lattica, saranno le condizioni del vino e le pratiche enologiche a determinare la sopravvivenza degli stessi batteri.

A tal fine, si osserva che per valori di pH<3.5 i batteri non riescono a sopravvivere, mentre, per valori di pH >3.5 i LAB possono continuare ad aumentare, fino a raggiungere valori pari a 10^6 - 10^8 (ufc/ml), influenzando quindi, negativamente sulla qualità del vino. Per la loro crescita, i LAB metabolizzano alcuni componenti del vino, quali zuccheri, aminoacidi e acidi organici. Tra le attività metaboliche dei LAB, la più importante, per la stretta correlazione alla qualità del vino riguarda, la degradazione dell'acido malico.

Gli zuccheri semplici, ovvero, i carboidrati a basso peso molecolare e quelli complessi, cioè i carboidrati a elevato peso molecolare, presenti nel mosto d'uva sono glucosio, fruttosio, xilosio e arabinosio.

Si evidenzia che, gli zuccheri residui, non utilizzati dai lieviti, sono sufficienti a produrre la crescita di sostanze a matrice organica, tali da attivare e condurre la FML.

I composti azotati sono presenti negli aminoacidi, del mosto o del vino, vengono utilizzati dai LAB; in particolare, l'arginina, la prolina e gli aminoacidi a catena ramificata come la valina.

Tra i più importanti acidi organici si ricorda l'acido L-malico, che viene decarbossilizzato dai batteri malolattici, con formazione dell'acido L-lattico e anidride carbonica.

La reazione della FML, più importante, è la reazione di catalisi effettuata dall'enzima malolattico che influisce a livello qualitativo e quantitativo. Precisamente, la qualità del vino migliora, poiché, si verifica la riduzione dell'acidità del vino, grazie all'aumento del pH di circa 0.3/0,4 unità che, ovviamente, dipende dalla quantità di partenza dell'acido malico. L'effetto, si traduce sia nella trasformazione del gusto acidofilo dell'a. malolattico con quello più dolce, dell'a. lattico e sia nell'aumento della stabilità microbiologica del vino. Si constata inoltre, che l'enzima malolattico viene inibito dagli acidi carbossilici e dai polifenoli. Tra gli acidi carbossilici (a. tartarico, a. citrico e a. lattico), l'a. citrico influisce sulla qualità del vino a causa della produzione di metaboliti come l'a. acetico e i composti acetoneici. Anche se le concentrazioni, nel mosto, di a. citrico sono basse e si attestano intorno a 200-300 (mg/l), non si escludono effetti sensoriali negative sul vino. Ad es. l'acetaldeide, se è prodotta a livelli alti, può causare una caratteristica sensoriale negativa di burro, mentre, a livelli bassi conferisce un sapore gradevole di nocciola; la formazione di acetaldeide dipende da diversi fattori come il pH, la tipologia di batteri, ecc..

1.5.2 Batteri acetici

I batteri acetici (BA) sono gram – negativi e sono aerobi stretti, crescono agevolmente per valori di pH compresi tra [5÷6.5] e la loro temperatura ottimale di crescita oscilla negli intervalli [28÷30] °C e [35÷38] °C, per la specie termotollerante. La loro attività in termini di "effetto alterante", ovvero di "deterioramento" del vino, è nota con la classica espressione di "spunto o acescenza". Precisamente, i BA causano delle alterazioni, trasformando l'etanolo in acido acetico, mediante ossidazione. La tollerabilità dipende dalla concentrazione di acido acetico, anche se sono sufficienti concentrazioni intorno a 1 [g/l] per danneggiare la qualità del vino.

Si evidenzia inoltre che, dette quantità, possono essere prodotte anche dai lieviti e non solamente dai BA. I prodotti, della reazione di ossidazione dell'etanolo in acido acetico, sono costituiti anche da una serie di composti intermedi quali l'acetaldeide. Quest'ultima viene prodotta in quantità variabili fino ad un massimo di 250 mg/l, tuttavia, sono sufficienti quantità intorno a 120-125 mg/l per rendere un vino con caratteristiche sensoriali inaccettabili. Infine, l'acetaldeide in presenza di anidride solforosa alla quale si lega, ne riduce il potere antibatterico.

I BA sono presenti nei grappoli d'uva e possono derivare anche da piccole lesioni sugli acini, dovute a cause biologiche o fisiche; ecco che un'attenta selezione dei grappoli di uva, destinate alla produzione di vino, può limitare la contaminazione in cantina degli acini buoni, anche perché i BA sono dotati di una elevata velocità di crescita. Le specie maggiormente presenti sulle uve sono i ceppi *Gluconobacter* e del *Gluconacetobacter*. La crescita dei BA può essere limitata attraverso il controllo dell'ossigeno, la cui diffusione è molto legata alle modalità di conservazione del mosto che, facilita il diffondersi dell'ossigeno. Infatti, poiché l'ossigeno è un gas sono sufficienti blande movimentazioni, per portare la sua concentrazione a livelli molto elevati. Pertanto, nel caso di conservazione nei tanks o in autoclave, lo sviluppo e la diffusione dell'O₂ è controllabile, mentre, la sua diffusione è favorita in cantina. È facile intuire, come una semplice movimentazione di travaso effettuato in cantina, mediante una pompa, porti allo sviluppo di O₂ mentre, risulta più complesso nei vini imbottigliati, il cui lo sviluppo è da annoverarsi alla permeabilità dei tappi ai gas. Nel caso di conservazione del mosto in botti di legno, la quantità di ossigeno rilevata in un anno risulta dell'ordine di 30 mg/l.

Tra i fattori da cui dipende la crescita dei batteri acetici, oltre all'etanolo, è molto influente la temperatura. Il controllo della temperatura è tra i metodi più efficaci per il controllo della quantità di ossigeno, anche se necessita di una strumentazione costosa. La temperatura ottimale di crescita dei BA, come visto, è compresa tra [28÷30] °C anche se, in presenza di etanolo, lo sviluppo può essere inibito fino a 35 °C. Si osserva che, per alcuni ceppi si può avere la crescita anche a temperature dell'ordine di 10°C.

I batteri acetici, come detto, effettuano le ossidazioni parziali dei carboidrati, producendo acidi organici, aldeidi e chetoni.

I BA appartengono alla famiglia Acetobacteraceae e si suddividono nei seguenti generi: *Acetobacter*, *Acidomonas*, *Ameyamaea*, *Asaia*, *Gluconacetobacter*.

1.5.3 Acido acetico e acido lattico

L'acido acetico è un acido volatile prodotto in misura differente da tutti i lieviti coinvolti nella vinificazione. Come già illustrato in altre situazioni, ha effetti negativi sulle caratteristiche organolettiche del vino, al di sopra di determinate concentrazioni. In particolare, gli zuccheri residui del vino, se sono presenti in quantità elevate, possono mascherare elevate concentrazioni di acido acetico.

Sono numerosi i fattori che incidono sulla quantità finale di acido prodotto. Tra questi, sono molto importanti la qualità dell'uva e il tipo di lievito, che guida la fermentazione. Ad es. in un mosto derivante da uve sane con contenuto medio di zuccherina, il lievito *S. cerevisiae* produce quantità basse di acido acetico. La produzione di acido acetico viene, sostanzialmente, prodotta attraverso due modalità: l'una riguarda la decarbossilazione ossidativa dell'acido piruvico, con formazione di acetil-CoA, e l'altra modalità riguarda l'ossidazione dell'acetaldeide ad opera dell'aldeide deidrogenasi.

Come già detto, un'elevata quantità iniziale di zuccheri induce in *S. cerevisiae* un aumento delle quantità di glicerolo e di acido acetico.

Nel caso di $\text{PH}>4$ e $\text{pH}<3.1$, in condizioni di anaerobiosi e di scarsa crescita, di vitamine e di aminoacidi, si ha un aumento dell'acido acetico e dell'acidità volatile del vino anche in assenza di sviluppo dei batteri lattici e batteri acetici. Ad esempio, al termine della "chiarificazione" il mosto viene impoverito dei nutrienti, degli acidi grassi insaturi come l'oleico e lineolico che hanno un effetto diretto sulla produzione di acido acetico.

La modalità di produzione dell'acido acetico non è di tipo continuativa, si stima che all'inizio della fermentazione i lieviti assimilano l'acido acetico attraverso la riduzione dell'acetaldeide e la conversione di quest'ultima in etanolo.

La produzione di acido acetico è dovuta all'attività metabolica dei batteri e allo sviluppo di lieviti *non Saccharomyces*, in particolare, *l'hanesenaspora uvarum* (*Kloeckera apiculata*); di fatto queste rappresentano le cause dell'eccessiva volatilità dei vini.

Infine, l'acido lattico è un altro prodotto della fermentazione alcolica che deriva dall'acido piruvico ad opera degli enzimi L (+) e D (-).

In condizioni anaerobiche, i lieviti vinari producono maggiori quantità di acido (D-)-lattico¹⁸ e basse quantità di acido L (+) lattico¹⁹.

Si precisa che, i batteri lattici producono acido L (+) - lattico che, rappresenta il prodotto principale della fermentazione malolattica, e producono anche acido D (-) - lattico dalla fermentazione degli zuccheri.

1.5.4 Acidi organici

Le caratteristiche organolettiche del vino dipendono anche dalle concentrazioni degli acidi organici e degli acidi inorganici. Tra questi i più importanti sono l'acido L-tartarico e l'acido L -malico, la loro concentrazione si quantifica intorno al 70-90% dell'acidità totale.

¹⁸ 300 mg/l

¹⁹ 12 mg/l

In questa trattazione, vengono analizzati tutti i componenti e le loro interazione che alterano la qualità del vino. Ad es. l'acido malico può fungere da substrato per i batteri lattici e alcuni lieviti (ad es. *Schizosaccharomyces pombe*) che possono convertire l'acido malico in acido piruvico.

Si riscontra che, l'enzima malico di *Saccharomyces* ha una bassa affinità per l'acido malico da cui consegue una bassa efficienza di degradazione dello stesso. Al contrario, l'enzima malico di *Schizosaccharomyces pombe* degrada l'acido malico con una buona efficienza; anche se, tale enzima produce dei composti volatili indesiderati.

Tuttavia, durante la fermentazione alcolica ci sono numerosi ceppi di *Saccharomyces* che possono degradare o utilizzare l'acido malico. In particolare, i ceppi crio - tolleranti (*S. bayanus* e *S. pastorianus*). Tra i ceppi non criotolleranti appartenenti a *S. cerevisiae* e *S. paradoxus* possono degradare fino al 50% dell'acido malico.

1.6 La fermentazione malolattica – caratteristiche

La fermentazione malolattica, non è una vera e propria trasformazione ma, dopo la fermentazione alcolica, è una caratteristica che porta il vino a maturazione. In primavera, i batteri lattici a causa dell'aumento di temperatura (18-20 °C) innescano la fermentazione malolattica nel vino; precisamente, l'acido malico presente nell'uva, viene trasformato in acido lattico e anidride carbonica.

Le condizioni necessarie per innescare la malolattica sono: un pH del vino non eccessivamente basso²⁰, una limitata concentrazione di anidride solforosa, un tenore di alcol etilico < 15% e una temperatura compresa tra [18°÷20°]. In pratica, durante la malolattica, l'acido malico del vino²¹, si trasforma in un acido più debole del malico e quindi, meno acre. La fermentazione malolattica permette, generalmente, di ottenere un vino più equilibrato, maggiormente persistente, ovvero, più corposo grazie alla concentrazione in polisaccaridi. La fermentazione malolattica può avvenire naturalmente grazie ai batteri presenti nel mosto e riattivati dalla variazione delle condizioni di conservazione, oppure, ricorrendo ad inoculi di ceppi batterici selezionati (appartenenti ai generi *Oenococcus* o *Lactobacillus*). Riassumendo, la FML dipende principalmente dal pH, dal ceppo batterico, dalla temperatura e dalla concentrazione di etanolo del vino.

La **temperatura** è uno dei fattori determinanti per lo sviluppo e la crescita dei LAB; le condizioni termiche favorevoli, per la loro crescita, rientrano nell'intervallo [15÷45] °C, con l'optimum compreso nel range [20÷37] °C, caratteristico, dei batteri mesofili.

Il **pH** del vino è uno dei fattori più importanti per l'instaurarsi della FML . Infatti, per valori di pH di circa 3.5, i Lab si sviluppano e conducono agevolmente la FML, mentre, per valori di pH<3.5 la loro crescita è rallentata fino all'arresto intorno al valore limite del pH. Precisamente, la crescita dei batteri in funzione del pH dipende dal ceppo di origine, ad es. lo sviluppo di *O.oeni* è favorito dai valori di pH<3.5, invece, per valori >3.5 si sviluppano i lattobacilli e i pediococchi. Per valori di pH bassi, i LAB degradano prioritariamente l'acido malico, invece di fermentare gli zuccheri, poiché per la FML il pH è più basso di quello richiesto per la trasformazione degli zuccheri. Si evidenzia, che la FML è favorita da bassi valori di acidità, per cui avviene più facilmente quando le uve sono mature.

La **concentrazione di etanolo** del vino incide sulla crescita dei LAB, di fatto, dipende contestualmente e simultaneamente, sia dalla temperatura e sia dalla quantità di etanolo presente. Precisamente, all'aumentare della concentrazione diminuisce la temperatura di crescita dei LAB.

Ad es. l'optimum della temperatura per la crescita di *O. oeni* è compresa tra [27÷30] °C; tuttavia, in presenza di etanolo, essa raggiunge valori compresi tra [20÷23] °C, mentre, la velocità di crescita diminuisce, fino ad arrestarsi quando la temperatura raggiunge circa 14°C.

²⁰ quindi vini non eccessivamente acidi

²¹ più aspro

La FML dipende sia dalla temperatura di innesco e sia dalla temperatura del mosto, a sua volta legata ai fattori ambientali esterni. Si evidenzia che la FML, in assenza di additivi chimici, avviene favorevolmente in primavera, mentre è sfavorita dalle basse temperature in inverno.

1.6.1 Interazioni microbiche e solfitazione

Nel corso dell'attività, tra gli aspetti più importanti analizzati, rientrano le interazioni tra i lieviti del tipo *Saccharomyces* e i batteri malolattici della specie *O. oeni*, poiché, proprio dalla loro interazione²² dipenderà il corretto sviluppo della FA e della FML.

Le tipologie di interazioni tra lieviti e batteri possono essere differenti, in particolare, per quanto riguarda l'azione dei lieviti LAB sono sintetizzabili, nel consumo di nutrienti e conseguente produzione di metaboliti.

Le azioni dei metaboliti per i lieviti, portano a effetti diversi, come di seguito elencati:

- ✚ tossici a causa della formazione di etanolo, di anidride solforosa e di acidi grassi a media catena;
- ✚ stimolanti grazie alla formazione di mannoproteine²³.

Parametro	Condizioni		
	facili	medie	difficili
pH	>3.4	3.1	<3.1
Alcol (% vol)	<13		>15
SO ₂ totale (mg/l)	<30		>50
Temperatura (°C)			

Si evidenzia che, gli acidi grassi a media catena possono inibire la crescita dei LAB e ridurre l'attività dell'acido malico.

2 Il latte

2.1 Le proprietà chimico- fisiche del latte

La giurisprudenza definisce il latte come, il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare delle bovine, nel caso di differente provenienza deve essere evidenziata la specie da cui proviene es. latte di capra [3].

Il latte è una miscela di acqua che ha in *soluzione* zuccheri, sostanze azotate, vitamine, sali, e ha in *sospensione* grassi, alcune vitamine, proteine e alcuni sali. La composizione percentuale dei diversi componenti dipende dalle specie e, per gli animali appartenenti alla stessa specie, dipende da altri fattori come l'età, lo stato di salute, l'alimentazione e le tecniche di allevamento. Ad es. per un latte di vacca si ha la seguente composizione: acqua (87,5%), zuccheri (4,9%), grassi (3,6%), sostanze azotate²⁴ (3,4%), ceneri (0,8%), oltre a gas, vitamine e enzimi [4].

Gli zuccheri sono costituiti principalmente da lattosio e da basse quantità di zuccheri semplici, generalmente legati alle proteine.

Il lattosio è un disaccaride, formato da una molecola di glucosio e una di galattosio; esso conferisce al latte un sapore leggermente dolce. Il lattosio subisce l'azione di molti microrganismi, che causano le principali fermentazioni del latte e del formaggio. Tra queste, si ricorda la fermentazione lattica, che avviene spontaneamente, nel latte lasciato a riposo.

²² inibizione, neutralità o stimolazione

²³ sono estratti dalla membrana della parete cellulare dei lieviti selezionati e hanno effetti stabilizzanti

²⁴ caseina e proteine del siero

Nella fermentazione lattica, i batteri lattici idrolizzano il lattosio in una molecola di glucosio e una di galattosio, trasformano quindi il galattosio in glucosio, infine, fermentano le due molecole di glucosio producendo 4 molecole di acido lattico.

La fermentazione porta all'acidificazione del latte ed è dannosa in quello destinato all'alimentazione diretta, perché porta alla coagulazione della caseina²⁵. I Lipidi si trovano²⁶ sotto forma di globuli rivestiti da una membrana lipo-proteica. La sostanza grassa del latte è formata per il 97-98% da trigliceridi, i globuli del grasso avendo un peso specifico minore del latte magro (0,931 a 15°C), tendono ad aggregarsi e ad affiorare spontaneamente nel latte lasciato a riposo, formando uno strato superficiale di crema.

Il latte destinato al consumo diretto viene, quindi, sottoposto ad un trattamento di stabilizzazione (*omogenizzazione*). Le sostanze azotate sono costituite da diverse proteine ed in minima parte (5%) da sostanze non proteiche (urea, aminoacidi). Le proteine del latte sono la caseina (85% del totale) e le sieroproteine. La caseina²⁷ è una fosfoproteina formata da diverse frazioni presenti in sospensione colloidale. Le sieroproteine hanno un minor peso molecolare della caseina e non coagulano per via enzimatica ma solo per riscaldamento. Le principali sono le lattoglobuline e le lattoalbumine che, conferiscono al latte un alto valore biologico, essendo ricche di aminoacidi essenziali. Infine, per quanto riguarda i sali minerali del latte sono presenti numerosi cationi ed anioni, parzialmente e totalmente, complessati con la caseina (quantitativo medio 0,8%).

Tra i cationi, i più rappresentati sono il potassio, il calcio²⁸, il sodio e il magnesio; mentre, tra gli anioni i più rappresentati sono il fosfato, i cloruri e i solfati.

Si distinguono sei diverse tipologie di latte, in base alla composizione e al trattamento, al quale è stato sottoposto:

1. latte intero, contenente almeno il 3,5% di grasso;
2. latte parzialmente scremato, contenente tra l'1 e l'1,8% di grasso;
3. latte scremato, contenente meno dello 0,5% di grasso;
4. latte concentrato, ottenuto per evaporazione dell'acqua, quindi arricchito di tutti i costituenti;
5. latte in polvere, è il prodotto ottenuto dalla disidratazione quasi completa del latte;
6. latte industriale, è quello utilizzato per la fabbricazione di burro e formaggio.

Si sottolinea che il primo liquido secreto dalla mammella si chiama *colostro* e inizialmente, ha delle caratteristiche fisico-chimiche (colore giallo e denso) diverse dal latte; trascorse 72 ore dalla mungitura assume le caratteristiche del latte. In Tabella 2-1 sono riportate le differenze costitutive principali tra il latte e il colostro.

Tabella 2-1. Valori caratteristici del colostro e del latte

	Colostro prima mungitura	Latte
Peso specifico	1.056	1.032
pH	6.32	6.5
Residuo secco %	23.9	12.9
Grasso	4.7	4
Proteine totali %	14	3.1
Lattosio %	2.7	4.9
Ceneri%	1.1	0.74

²⁵ è necessaria nella preparazione del formaggio e dello yogurt

²⁶ non disciolti

²⁷ sintetizzata dalla mammella

²⁸ Il calcio determina la coagulazione della caseina

Per quanto riguarda, le caratteristiche chimico-fisiche del latte a 15° C, la densità²⁹ varia tra [1,029 ÷ 1,034], essa risulta dalla somma della densità del grasso < 1 e quella del plasma >1, mentre, per il pH si attesta attorno a 6,5-6,7.

In Italia, l'acidità è espressa dai gradi [°SH] (Soxhlet-Henkel), nel latte fresco l'acidità corrisponde a circa 7°SH. Infine, il punto di congelamento è compreso tra [-0,55÷0,56] °C, mentre il punto di ebollizione tra [100,15 ÷ 100,17]°C.

2.2 Microrganismi del latte

La carica microbica è costituita dai: lieviti, muffe, batteri lattici, b. enterici, b. propionici, b. butirrici e b. proteolici e occasionalmente virus. La composizione microbica, è strettamente legata sia alle condizioni igieniche dell'ambiente in cui avviene la mungitura e sia allo stato di salute degli animali.

In particolare l'attività battericida, che si sviluppa al momento della mungitura e che dopo qualche ora si arresta, dipende dalla presenza di 3 lattenine. Successivamente, se il latte non viene conservato a bassa temperatura, circa 4°C, la flora lattica si moltiplica con legge logaritmica. Nella Figura 2.1, si riporta al trascorrere del tempo (ore), a partire dallo stato di latte fresco, l'incremento dei germi nel latte munto in buone condizioni igieniche, in funzione delle temperature di conservazione 4 °C, 10 °C, 16 °C, rispettivamente corrispondenti alle serie 1, serie 2, serie 3.

Al fine di evitare l'aumento eccessivo della flora, solitamente, viene fatta prima la filtrazione³⁰ e successivamente la refrigerazione a 4 °C. Con la refrigerazione si riesce a mantenere il livello batteriologico buono, senza aumentare l'acidità del latte.

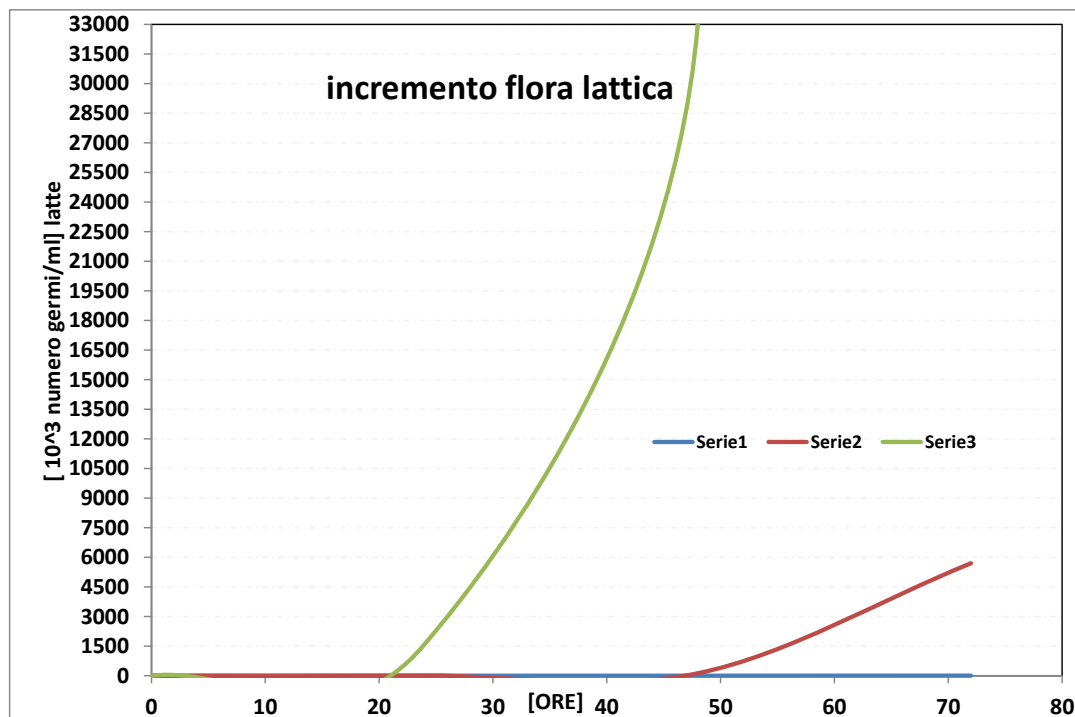


Figura 2.1. Rappresentazione dell'incremento della flora batterica per le serie1[4 °C], serie2[10 °C], serie3 [16 °C].

²⁹ La densità aumenta nel caso di latte scremato e diminuisce per quello annacquato

³⁰ di elementi grossolani, quali peli, frammenti di escrementi, residui alimentari

2.2.1 Metabolismo dei microrganismi

Per la conservazione degli alimenti, come visto nel Report RdS/2015/071, sono vari i metodi distruttivi da applicare per inattivare i microrganismi. Ai fini della conservazione degli alimenti, le temperature di uso comune sono quelle di pastorizzazione e di sterilizzazione. La *pastorizzazione* mediante calore, potrebbe implicare la distruzione di tutti i microrganismi patogeni, come accade nella pastorizzazione del latte, oppure, la riduzione del numero dei microrganismi alteranti, come accade nella pastorizzazione dell'aceto. Si precisa, che per i trattamenti termici, le alte temperature sono rappresentate da tutte le temperature superiori a quella ambiente.

La pastorizzazione del latte si effettua impiegando un'esatta combinazione della temperatura e del tempo. Si distinguono in funzione di questi, le seguenti combinazioni:

- LTLT (low temperature, long time) in cui T= 63 °C per t=30 minuti (bassa temperatura, lungo tempo di esposizione);
- HTST (*high temperature, short time*) in cui T=72 °C per t=15 secondi (alta temperatura, breve tempo di esposizione);
- T=89 °C per t=1,0 secondi;
- T=90 °C per t= 0,5 secondi;
- T= 94 °C per t= 0,1 secondi;
- T= 100 °C per t= 0,01 secondi.

Tutte le combinazioni, sopra elencate, hanno effetto equivalente e sono sufficienti per distruggere la maggior parte dei microrganismi patogeni termoresistenti non sporigeni, inclusi *Mycobacterium tuberculosis* e *Coxiella burnetii*. Da alcune sperimentazioni, in cui le cellule di *M. avium* subsp. *Paratuberculosis* sono state aggiunte a latte crudo³¹, dopo 4 mesi d'incubazione, è risultato che sottoponendo il prodotto a trattamento termico LTLT o HTST, non era sopravvissuto alcun microrganismo.

Le temperature impiegate, nella pastorizzazione del latte, consentono di inattivare anche tutti i lieviti, le muffe, i batteri Gram-negativi e molti Gram-positivi; Di fatto, solo i microrganismi del gruppo gruppo termodurici o a quello dei termofili riescono a sopravvivere alle temperature di pastorizzazione.

Si evidenzia che, i microrganismi termodurici sono in grado solo di sopravvivere ma, non di crescere a temperature relativamente elevate, mentre, a tali temperature i microrganismi non sporigeni come i generi *Streptococcus* e *Lactobacillus* riescono a sopravvivere alla pastorizzazione del latte. I microrganismi termofili non solo sopravvivono a temperature relativamente elevate, ma alcuni, come i generi *Bacillus*, *Clostridium*, *Alicyclobacillus*, *Geobacillus* e *Thermoanaerobacter* riescono anche a crescere alle alte temperature.

Per *sterilizzazione* si intende la distruzione di tutti i microrganismi vitali, verificabile mediante conta in piastra o altra tecnica di conteggio. Il trattamento termico, del latte e dei prodotti a base di latte, può essere effettuato anche con l'impiego di temperature ultra elevate (UHT, ultra-high temperature). Si evidenzia che, il latte così trattato, deve essere distinto da quello pastorizzato. Per il trattamento UHT vi sono necessarie per il confezionamento e per la lavorazione, lo sviluppo in condizioni asettiche a valle dello sterilizzatore (poiché viene effettuato sul prodotto allo stato sfuso, prima del confezionamento). Le temperature impiegate sono molto elevate (140-150 °C) e vengono combinate con tempi di esposizione molto brevi (pochi secondi).

Il latte UHT è maggiormente accettato dai consumatori, rispetto a quello ottenuto mediante pastorizzazione convenzionale e, grazie alla sterilità commerciale (24 ore), può essere conservato a temperatura ambiente fino a 8 settimane, senza subire alterazioni nel sapore.

³¹ in concentrazione variabile da 40 a 100.000 ufc/ml

2.2.2 Fattori che influenzano la resistenza termica dei microrganismi

In questa trattazione, sono stati considerati quali fattori influenzano l'inattivazione batterica del latte mediante i trattamenti termici. Alcuni di essi sono già stati analizzati nel Report RdS/2015/071, pertanto, verranno unicamente analizzate le condizioni che influenzano la resistenza termica.

L'obiettivo mira a individuare quali sono i fattori, che possono essere inibiti con i PEF, e quindi potrebbero risultare alternativi o meglio di supporto ai trattamenti termici, nei limiti consentiti dall'attuale normativa che regola la distribuzione del latte.

Tra i fenomeni che spesso si verificano con i trattamenti termici, si evidenziano quelli relativi alla riattivazione degli sporigeni e/o al lungo tempo di riduzione decimale [D], anche detto tempo di morte termica. Nella Figura 2.2 sono rappresentati per le spore **Bacillus cereus** i risultati di D in funzione della (T) e del contenuto di acqua (a_w) per valori di pH pari a 6.5, 5.5, 4.5.

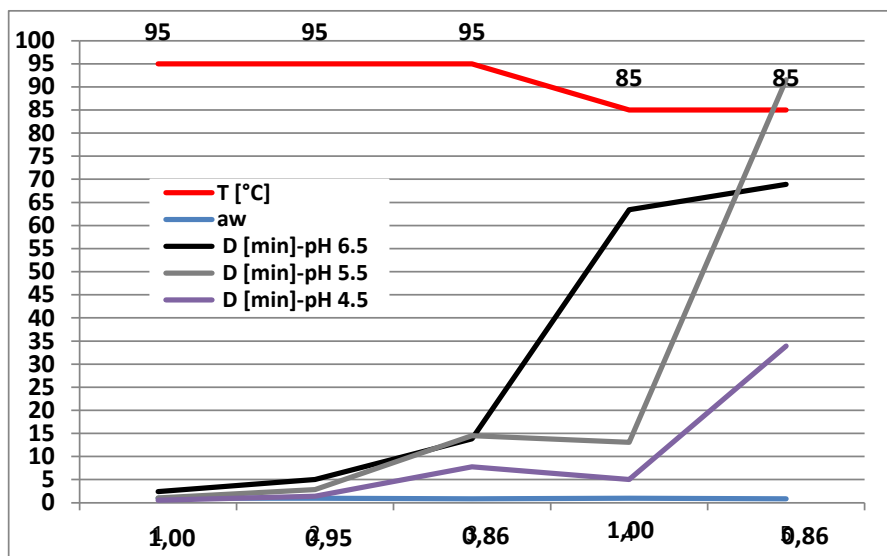


Figura 2.2. Rappresentazione del tempo di riduzione decimale D.

Come si evince dalla stessa figura, la resistenza termica dei microrganismi, per un dato valore di PH e di temperatura, aumenta al diminuire di a_w [5].

Per esempio, con a_w pari a 1 e pH pari a 6,5, il valore di D a 95 °C, ovvero, il tempo di esposizione a 95 °C ($D_{95^\circ C}$) necessario per conseguire una riduzione decimale del numero iniziale di cellule vitali risulta pari a 2,5 minuti e diventa 14 minuti per a_w pari a 0,86.

Al variare del pH, come si evince dalle Figura 2.3 e Figura 2.4 figura, D conserva lo stesso andamento anche se con variazioni più marcate; di fatto si riscontra al variare della temperatura una variazione della pendenza della spezzata. Per T pari a 85 °C, con a_w pari a 1 e pH pari a 6.5, il valore di ($D_{85^\circ C}$) risulta di 64 minuti mentre con a_w di 0.86 varia poco (69 minuti), invece, con pH pari a 4.5 per a_w pari a 1 e 0.86, per $D_{85^\circ C}$ risultano pari, rispettivamente, a 5 minuti e 34 minuti.

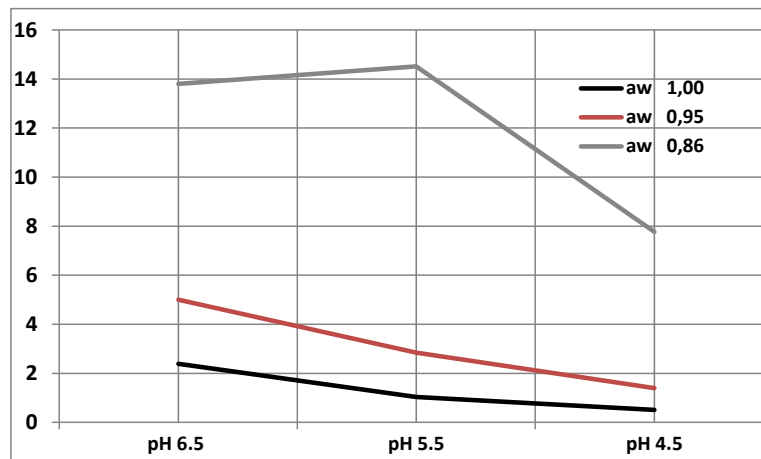


Figura 2.3. Rappresentazione del tempo di riduzione decimale D nel latte

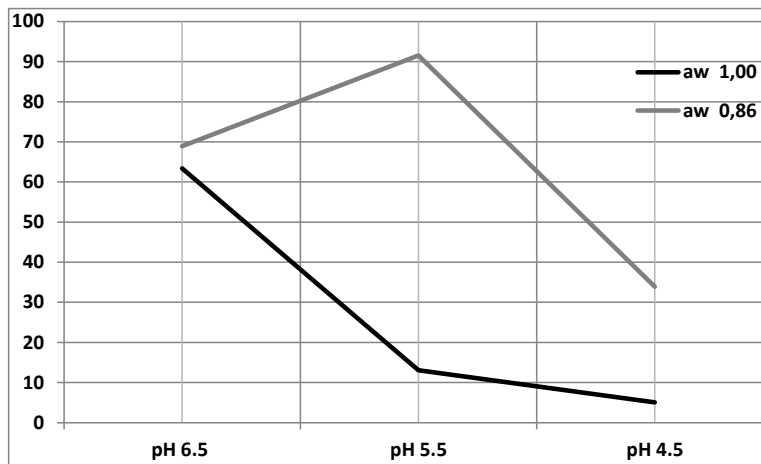


Figura 2.4. Rappresentazione del tempo di riduzione decimale D nel latte

Inoltre, in presenza di grassi, si osserva un generale incremento della resistenza termica di alcuni microrganismi, tale effetto protettivo da parte dei grassi influenza direttamente il contenuto d'acqua della cellula. Sembrerebbe che gli acidi grassi a lunga catena, abbiano un effetto protettivo maggiore, rispetto, agli acidi grassi a corta catena. Tra i componenti che incidono sulla resistenza termica ricordiamo i sali, alcuni dei quali svolgono un'azione protettiva nei confronti dei microrganismi, altri invece, tendono a rendere le cellule più sensibili al calore.

Ad es. alcuni sali possono diminuire l'attività dell'acqua e aumentare, quindi, la resistenza termica, mentre altri (come Ca^{2+} e Mg^{2+}) possono aumentare l'attività dell'acqua e, conseguentemente, aumentare la sensibilità al calore. Per quanto riguarda, invece i carboidrati, la presenza di zuccheri nel mezzo causa un aumento della resistenza termica dei microrganismi in esso sospesi. Infine, le proteine presenti nel mezzo, sottoposto a trattamento termico, hanno un effetto protettivo sui microrganismi. Di conseguenza, per ottenere lo stesso risultato finale, gli alimenti a elevato contenuto proteico devono essere trattati più drasticamente di quelli con basso tenore di proteine.

Quanto maggiore è il numero di microrganismi, tanto più elevato sarà il grado di resistenza al calore. Ad es. per le spore di *Clostridium botulinum*, con un trattamento termico a 100 °C, la morte termica dipende fortemente dal numero di spore come rappresentato in Figura 2.5

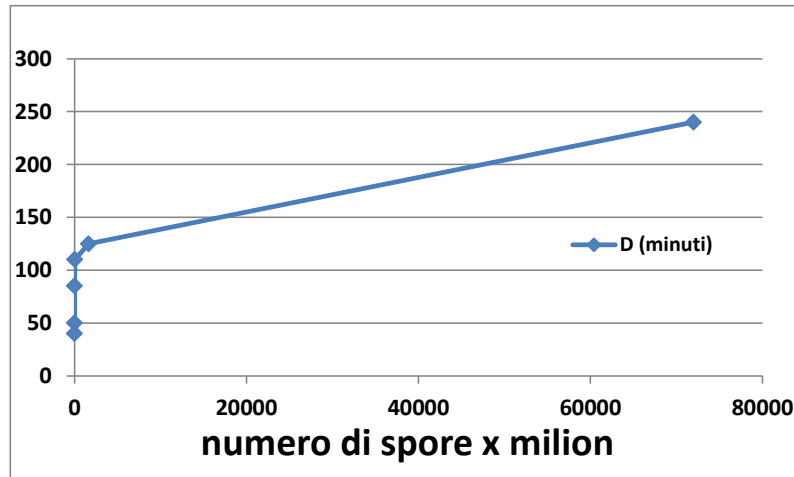


Figura 2.5. Rappresentazione del tempo di riduzione D per T pari a 100 °C nel latte

In conclusione, considerando la temperatura di crescita e l'età dei microrganismi, rapportata alle due fasi di crescita stazionaria e logaritmica, si verifica per la temperatura di crescita che, la resistenza termica dei microrganismi tende ad aumentare con la temperatura di incubazione, soprattutto, nel caso dei batteri sporigeni. Pur non essendo ancora ben chiaro il meccanismo di tale effetto, si ipotizza che, con l'esposizione a temperature progressivamente più elevate, la selezione genetica favorisca la crescita dei ceppi più resistenti al calore.

2.3 Il latte crudo

2.3.1 La normativa per il latte crudo

Con l'obiettivo, di rendere possibile l'eventuale applicazione dei PEF sul latte crudo, si ritiene indispensabile prendere in considerazione i limiti e le prescrizioni della normativa nazionale e comunitaria, in materia di sicurezza alimentare.

La valutazione puntuale della normativa, che disciplina le caratteristiche del latte crudo destinato al consumo diretto, rappresenta uno degli aspetti più importanti, in quanto vincolante e quindi discriminante da analizzare in modo capillare e oggettivo [6]. Si richiama, brevemente, la giurisprudenza che nell'ultimo ventennio ha disciplinato questo alimento:

- **Legge n. 169 del 1989** → disciplina il trattamento e la commercializzazione di "latte alimentare vaccino".
- **DM 185/91** → regola "latte fresco pastorizzato alta qualità"
- **DPR 54/97**³² → regola la produzione di "latte e prodotti lattiero-caseari".
- **Regolamenti CE 853 -854 del 2004**³³ → definisce i requisiti specifici per la produzione di "latte crudo e prodotti lattiero caseari".
- **Regolamento 2073 – 2074 del 2005** → definisce i criteri di sicurezza alimentare e di processo nella produzione di latte e prodotti lattiero caseari.
- **Decreto legge n. 158 del 13 settembre 2012** → impone che il consumo di latte crudo avvenga previa bollitura.

Dall'analisi emerge, in particolare, che l'*allegato III, sez. IX, sezione IX, Capitolo del Regolamento (CE) 853 del 2004* riguarda la produzione e l'allevamento, dal punto di vista della salute dell'animale, dell'igiene e delle caratteristiche del latte crudo.

³² vengono recepite le Direttive 92/46 e 92/47/CEE

³³ "Norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale"

Il regolamento **definisce** latte crudo: *il latte che non sia stato riscaldato a più di 40 °C e non sia stato sottoposto ad alcun trattamento che produca un effetto equivalente.*

Partendo dai **requisiti generali**, per la produzione di **latte alimentare, pur essendo superfluo, si ribadisce** che affinché il latte crudo possa essere destinato all'alimentazione umana, deve provenire da:

1. allevamenti ufficialmente indenni da tubercolosi e brucellosi;
2. locali delle aziende di produzione primaria igienicamente e adeguatamente refrigerati in modo da evitare rischi di contaminazione;
3. le attrezzature e le superfici nelle aziende primarie devono essere pulite ed eventualmente disinfettate. Infine, i contenitori usati nel trasporto devono essere puliti prima del reimpiego;
4. animali che non presentino sintomi di malattie infettive trasmissibili all'uomo attraverso il latte;
5. animali che denotino uno stato sanitario generale buono;
6. animali che non evidenzino sintomi di malattie, che possano comportare una contaminazione del latte;
7. animali ai quali non siano stati somministrati sostanze o prodotti non autorizzati. Nel caso di somministrazione di prodotti o sostanze autorizzati, è necessario che siano stati rispettati i tempi di sospensione prescritti per tali prodotti o sostanze.”

Infine, il regolamento fissa :

1. la temperatura di conservazione e/o mantenimento alla stalla nel caso di raccolta giornaliera deve essere $\leq 8\text{ °C}$ e nel caso di raccolta non giornaliera deve essere $\leq 6\text{ °C}$;
2. il tenore di germi per il latte di crudo di vacca a 30 °C (al ml) ≤ 100.000 . Il valore deve essere calcolato con la media geometrica mobile, calcolata su un periodo di 2 mesi, con almeno 2 prelievi al mese;
3. il tenore di cellule somatiche per il latte di crudo di vacca a 30 °C (al ml) ≤ 400.000 . Il valore deve essere calcolato con la media su un periodo di 3 mesi con almeno un prelievo al mese;
4. il tenore di germi per il latte di crudo di altre specie a 30 °C (al ml) ≤ 150.000 . Il valore deve essere calcolato con la media geometrica mobile, calcolata su un periodo di 2 mesi, con almeno 2 prelievi al mese;
5. il tenore di germi per il latte di crudo di altre specie a 30 °C (al ml) ≤ 500.000 ; nel caso in cui il latte crudo sia destinato alla produzione di prodotti per la cui produzione non sia prevista alcun trattamento termico. Il valore deve essere calcolato con la media mobile, calcolata su un periodo di 2 mesi, con almeno 2 prelievi al mese;

Per quanto riguarda i metodi di prova³⁴, relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente, sono definiti nell'**allegato VI BIS**, al **capitolo I**, del **regolamento (CE) 2074/2005**.

Si precisa che, come prescritto nell'**allegato III, sezione IX, capitolo I, parte III**, del **regolamento (CE) n. 853 /2004** devono sempre essere applicati come riferimento le seguenti norme:

- EN/ISO 4833 per la conta delle colonie batteriche a 30 °C;
- ISO 13366-1 per la conta delle cellule somatiche.

Possono essere impiegati dei metodi analitici alternativi, purchè, convalidati con le norme sopra descritte e conformi ai protocolli stabiliti dalle norme **EN/ISO 16140, ISO 21187, ISO 8196, ISO13366-2**.

Prima di analizzare nel dettaglio, le prescrizioni e i limiti di legge per la commercializzazione, si precisa che:

1. i **soggetti aziendali** che intendono produrre latte crudo, destinato ad essere commercializzato per il consumo umano, devono essere registrate, ai sensi dell'art.6 del Reg.(CE) n.852/2004, presso i *Dipartimenti di Prevenzione Veterinari*.
2. le **tipologie di produzione** definite dalla normativa sono la produzione di latte crudo per la trasformazione, la produzione di latte alta qualità, la produzione di latte crudo destinato alla vendita diretta;

³⁴ Utilizzati dalle autorità competenti e dagli operatori del settore alimentare

3. il **soggetto acquirente**³⁵ che commercializza il latte crudo ha la qualifica di “operatore del settore alimentare” è soggetto ad obbligo di notifica, ai sensi del Reg.(CE) n.852/2004, della registrazione all’Asl competente territorialmente.

Infine, nel caso di trasformazione del latte crudo, nell’allegato VII³⁶ del regolamento n. 2074/2005/CE, sono definiti i requisiti di temperatura e durata, per le trasformazioni di pastorizzazione e per il metodo UHT.

Per quanto riguarda, la vendita diretta di latte crudo prodotto in stalla, si ribadisce che devono essere rispettati i criteri dell’allegato III sez. IX del regolamento(CE) 853/2004 come previsto dalle Deroghe – Intesa Stato – Regioni della normativa nazionale³⁷. Come già detto, precedentemente, si sottolinea che il tenore di germi a 30 °C deve essere < 100.000 e il tenore in cellule somatiche deve essere < 400.000.

2.3.2 Gli sporigeni del latte crudo

Tra gli aspetti più importanti da considerare, per la sicurezza del consumatore di latte crudo, sono le condizioni di sopravvivenza dei microrganismi patogeni e i limiti normativi riguardo le caratteristiche dei suoi costituenti.

Il latte può contenere o venire a contatto con agenti patogeni nelle fasi, che vanno dalla produzione, trasformazione e commercializzazione fino al consumo. Il LATTE CRUDO, di norma, è il latte appena munto che vien venduto tal quale; esso deve essere filtrato e refrigerato tra 0 ÷ 4 °C. La contaminazione può aversi al momento della mungitura e in questo caso, si corre il rischio che le fonti di contagio si moltiplichino, a causa di contatti diretti o indiretti, con la pelle e le mucose dell’uomo o di animali (ammalati o portatori sani), con superfici di attrezzi o impianti contaminati l’acqua usata, per i risciacqui ed i lavaggi.

Dal latte crudo contaminato, la trasmissione dei microrganismi può derivare dall’ errata applicazione di idonee misure di prevenzione e di risanamento della stalla, dello stabilimento di trasformazione fino al circuito di commercializzazione.

Pertanto, i patogeni che potrebbero essere presenti nel latte crudo sono distinguibili: in quelli derivanti da un’infezione della mammella e quelli derivanti, prevalentemente, da una contaminazione del latte.

Tra i primi, rientrano i batteri contagiosi *Streptococcus agalactiae* e *Staphilococcus aureus*.

Il *Staphilococcus aureus* è in grado di produrre nell’uomo, una serie di enterotossine che determinano, se presenti in quantità sufficiente, un’intossicazione caratterizzata da nausea, vomito e diarrea, che viene superata in genere senza intervento medico in 2-3 giorni.

Si sottolinea che, le tossine prodotte da *Staphilococcus aureus* sono resistenti al calore e quindi potrebbero essere presenti anche nel latte pastorizzato. Tuttavia, la quantità di tossine capace di determinare la sintomatologia nell’uomo, di circa 1 milione di batteri/ml. Per quanto riguarda, i patogeni derivanti da una contaminazione da materiale fecale, soprattutto in fase di mungitura, sono compresi i batteri fecali e alcuni patogeni quali *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. ed *E.coli* O157:H7; che possono determinare patologie gravi nell’uomo [6][7].

Il ***Listeria monocytogenes***, è un batterio largamente presente nell’ambiente e provoca la listeriosi nell’uomo, in particolare nei bambini può essere una malattia molto grave e mortale. La ***Salmonella*** è un batterio intestinale che può causare gastroenterite e febbre nell’uomo. Il ***Campylobacter*** è anch’esso un batterio del tratto intestinale e può causare la malattia nel bovino. L’***Escherichia coli* O157:H7**, è il patogeno probabilmente più pericoloso, ma è anche quello che ha basse possibilità di essere presente nel latte. Di

³⁵ impresa o associazione che acquista latte presso il produttore

³⁶ punto 2 d ii

³⁷ del 25/01/2007

fatto, una sua eventuale presenza oltre ad essere rara ed è legata alla possibilità che un bovino portatore riesca a contaminare il latte .

2.3.3 Sicurezza alimentare – criteri microbiologici per il latte crudo

Per la sicurezza alimentare, come visto, la giurisprudenza prescrive sia i limiti, in termini di carica batterica e in termini di cellule somatiche, e sia i metodi di rilevazione previsti dalla normativa ISO. In Tabella 2-2, si riportano gli indicatori di sicurezza alimentare (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., Enterotossine stafilococciche, *Cronobacter* spp./*Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli* nei molluschi bivalvi, *Campylobacter* spp. termofili, *Yersinia enterocolitica* presunta patogena, Clostridi produttori di tossine botuliniche, Tossine botuliniche, *Vibrio* spp. potenzialmente enteropatogeni, Virus epatite A, *Escherichia coli* O157 e altri STEC, Istamina) [8][9].

Si ribadisce che, le modalità di controllo analitico debbano rispettare i criteri di campionamento, analisi e interpretazione dei limiti previsti al *Capitolo I, dell'Allegato I*, del **Reg.CE 2073/2005 e s.m.i.** o quelli previsti dalla normativa nazionale. Inoltre, si precisa che le norme nazionali derivanti da direttive europee, e non in contrasto con i nuovi regolamenti comunitari, possono essere ancora applicate, così come modificate nell'**accordo Stato-Regioni del 10 maggio 2007**, ma solo agli alimenti di produzione nazionale.

Tabella 2-2. Valori caratteristici del colostro e del latte

LATTE CRUDO DESTINATO AL CONSUMO UMANO DIRETTO (PREVIA BOLLITURA)			
		criteri microbiologici diversi da Reg CE/2073/05 es.m.i	
Parametro	Metodo	Intesa stato regione REP. N. 5/CSR del 25/01/2007	note
Strafilococchi coag. Positivi	ISO 6888		al momento dell'erogazione. In caso di cariche $\geq 10^5$ ufc/ml effettuare ricerca enterotossine stafilococche vedi (allegato 2)
Strafilococchi <i>aereus</i>	ISO 6888	m=500 ufc/ml, M=2000 ufc/ml (n=5; c=0)*	al momento dell'erogazione. In caso di cariche $\geq 10^5$ ufc/ml effettuare ricerca enterotossine stafilococche vedi (allegato 2)
<i>Salmonella</i> spp.	ISO6579	assenza in 25 ml (n=5; c=0)*	al momento dell'erogazione
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1/2	assenza in 25 ml (n=5; c=0)*	al momento dell'erogazione
<i>E.coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC)	AFNOR BIO 12/25 - 05/09, ISO /TS 13136	assenza in 25 ml (n=5; c=0)*	al momento dell'erogazione
<i>Campilobacter</i> spp. termofili	ISO 10272-1	assenza in 25 ml (n=5; c=0)*	al momento dell'erogazione
<i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290-1		al momento dell'erogazione
<i>Campilobacter</i> spp. termofili	ISO 10272-2		al momento dell'erogazione

Per quanto riguarda, le prescrizioni igienico - sanitarie del latte crudo, si riportano in Tabella 2-2 i parametri e i criteri delle modalità di calcolo, nonché, la frequenza dei controlli.

Per il latte crudo, presso gli allevamenti di produzione, non sono ammessi trattamenti in grado di modificare il tenore in germi e cellule somatiche del latte, come ad es. filtrazione³⁸.

Le uniche operazioni ammesse sono la filtrazione dalle impurità grossolane e la refrigerazione.

Tabella 2-3. Valori e limiti di accettabilità, in base alla modalità di calcolo

Tipologia prodotto	Criterio	Limite	Modalità di calcolo	Frequenza controllo
latte crudo di vacca	Tenore di germi a 30 °C (per ml)	≤ 100.000	media geometrica mobile, calcolata su un periodo di due mesi	almeno due prelievi al mese
	Tenore di cellule somatiche (per ml)	≤ 400.000	media geometrica mobile, calcolata su un periodo di tre mesi	almeno un prelievo al mese
latte crudo proveniente da altre specie	Tenore di germi a 30 °C (per ml)	≤ 1.500.000	media geometrica mobile, calcolata su un periodo di due mesi	almeno due prelievi al mese
latte crudo proveniente da altre specie destinato alla fabbricazione di prodotti ottenuti mediante un processo che non comporta alcun trattamento termico	Tenore di germi a 30 °C (per ml)	≤ 500.000	media geometrica mobile, calcolata su un periodo di due mesi	almeno due prelievi al mese
latte crudo di qualsiasi specie	Residui di antibiotici	< LMR riguardo ad una qualunque delle sostanze di cui all'allegato I Reg.(UE) n.37/2010	campione singolo	

Per il latte crudo³⁹ destinato ad essere utilizzato per la produzione di «latte fresco pastorizzato di alta qualità» deve essere, appena munto, immediatamente filtrato e refrigerato, entro due ore nell'apposito locale, alla temperatura massima di +6 °C ed essere ivi conservato a tale temperatura o a temperatura inferiore, in attesa del trasferimento direttamente allo stabilimento di trattamento termico.

Inoltre, deve essere presente in azienda un registro⁴⁰ di carico e scarico, nel quale risulti il quantitativo giornaliero di latte prodotto e l'impresa destinataria. Si riportano in tab-BBB i requisiti del latte crudo per la produzione di latte fresco pastorizzato di alta qualità⁴¹.

³⁸ Nota prot. 0017187 del 10/06/2008 del Ministero del Lavoro della salute e delle Politiche Sociali

³⁹ in aggiunta a quanto previsto dalla sez.IX allegato III Reg (Ce) 853/04.

⁴⁰ Vidimato dall'autorità locale competente.

⁴¹ per il tenore in materia grassa, proteica e i residui antibiotici , poiché il D.M n. 185/91 non ha previsto una frequenza, devono essere effettuati alla frequenza prevista per il tenore in germi.

Tabella 2-4. Valori e limiti di accettabilità, in base alla modalità di calcolo

Tipologia prodotto	Criterio	Limite	Modalità di calcolo	Frequenza controllo
latte crudo di vacca produzione latte fresco pastorizzato di alta qualità	Tenore di germi a 30 °C (per ml)	≤ 100.000	media geometrica mobile, calcolata su un periodo di due mesi	almeno due prelievi al mese
	Tenore di cellule somatiche (per ml)	≤ 300.000	media geometrica mobile, calcolata su un periodo di tre mesi	almeno un prelievo al mese
	Tenore in materia grassa	>3,5%		
	Tenore in materia proteica	>32,0 g/l		
	Contenuto in acido lattico	<30ppm		
	Residui di antibiotici	< LMR riguardo ad una qualunque delle sostanze di cui all'allegato I Reg 37/10	campione singolo	

Per le aziende di produzione di latte, che effettuano la vendita diretta di latte crudo al consumatore finale :

- presso l'azienda di produzione ;
- tramite macchine erogatrici collocate nella stessa azienda o al fuori di questa, ma funzionalmente correlate;
- presso uno stabilimento riconosciuto ai sensi del reg. (Ce) n.853/04 e/o nelle stessa azienda di produzione, previo confezionamento del latte;

devono essere verificati , i requisiti igienico sanitari per i diversi tipi di latte elencati nelle Tabella 2-3⁴² e a seconda del tipo di latte crudo vaccino, caprino, bufalino ed equino, rispettivamente, nelle Tabella 2-6, Tabella 2-7 e Tabella 2-8⁴³.

⁴² (*) vedi legenda interpretazione E. coli VTEC (Vero Toxin Escherechia Coli) in PCR

(§) il laboratorio effettua in caso di superamento del limite, anche la ricerca dell'enterotossina stafilococcica

⁴³ (*) vedi legenda interpretazione E. coli VTEC (Vero Toxin Escherechia Coli) in PCR

(§) il laboratorio effettua in caso di superamento del limite, anche la ricerca dell'enterotossina stafilococcica

* equini esclusi

Tabella 2-5. Valori e limiti di accettabilità, in base alla normativa e tipologia di microrganismo

IGIENE DI PROCESSO	LIMITE ACCETTABILITA'	METODICA UTILIZZATA DAL LABORATORIO ACCREDITATO	NOTE
Cellule somatiche	300.000/ml	Metodo optofluorometrico	Media geometrica mobile calcolata su di un periodo di tre mesi con almeno un prelievo al mese
Tenore in germi a 30°	25.000 /ml		Media geometrica mobile calcolata per un periodo di due mesi con almeno due prelievi al mese
Enterobacteriacee	3.000 ufc/ml	MP ISO 21528 – 2:2004 o metodica accreditata	
<i>Escherichia coli</i>	500 ufc/ ml	MP ISO 16849 – 2:2011 o metodica accreditata	
<i>Staphylococcus aureus coagulasi +</i>	200 ufc in 1 ml (§)	MP ISO 6888-2:1999/Amd1:2003 o metodica accreditata	

Tabella 2-6. Valori e limiti di accettabilità, in base alla normativa e tipologia di microrganismo

SICUREZZA ALIMENTARE	LIMITE ACCETTABILITA'	METODICA UTILIZZATA DAL LABORATORIO ACCREDITATO	NOTE
<i>Listeria monocytogenes</i>	Assente in 25 ml	PCR Metodo accreditato	
<i>Salmonella spp</i>	Assente in 25 ml		
<i>Campylobacter</i> termotolleranti	Assente in 25 ml		
<i>E.coli</i> VTEC (*)	Assente in 25 ml		
Enterotossina stafilococcica	Assente	Reg CE 2073/2005 15/11/2005 GU CE L338 22/12/2005 + Reg CE 1441/2007 05/12/2007 GU CE L322 07/12/2007	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Assente	Metodo accreditato	
Residui di sostanze inibenti	Allegato I Reg (Ce) 37/2010	Metodo accreditato	
Aflatossina M1	<30 ppt (limite di attenzione)	Metodo accreditato	

Tabella 2-7. Valori e limiti di accettabilità, in base alla normativa e tipologia di microrganismo

IGIENE DI PROCESSO	LIMITE ACCETTABILITA'	METODICA UTILIZZATA DAL LABORATORIO ACCREDITATO	NOTE
Tenore in germi a 30*	50.000 /ml	Metodo optofluorom etrico	Media geometrica mobile calcolata per un periodo di due mesi con almeno un prelievo al mese
Enterobacteriacee	3000 ufc/ml	MP ISO 21528 – 2:2004 o metodica accreditata	
<i>Escherichia coli</i>	500 ufc/ ml	MP ISO 16649 - 2:2011 o metodica accreditata	
<i>Staphylococcus aureus coagulasi +</i>	200ufc in 1 ml (§)	MP ISO 6888-2:1999/Amd1:2003 o metodica accreditata	

Tabella 2-8. Valori e limiti di accettabilità, in base alla normativa e tipologia di microrganismo

SICUREZZA ALIMENTARE	LIMITE ACCETTABILITA'	METODICA UTILIZZATA DAL LABORATORIO ACCREDITATO	NOTE
<i>Listeria monocytogenes</i>	Assente in 25 ml	PCR metodo accreditato	
<i>Salmonella spp.</i>	Assente in 25 ml		
<i>Campylobacter</i> termotolleranti	Assente in 25 ml		
<i>E.coli</i> VTEC (*)	Assente in 25 ml		
Enterotossina stafilococcica	Assente	Reg CE 2073/2005 15/11/2005 GU CE L338 22/12/2005 + Reg CE 1441/2007 05/12/2007 GU CE L322 07/12/2007	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Assente	Metodo accreditato	
Residui di sostanze inibenti	Allegato I Reg (Ce) 37/2010	Metodo accreditato	
Aflatossina M1	<30 ppt (limite di attenzione)	Metodo accreditato	

Nel caso in cui i parametri di sicurezza alimentare siano superati, o meglio, in caso di positività⁴⁴ per:

1. residui di sostanze inibenti
2. enterotossina stafilococcica
3. aflatossina M1 (*)
4. *Listeria monocytogenes* (**)
5. *Salmonella spp* (**)
6. *Campylobacter* termotolleranti(**)
7. *E.coli* VTEC (**)
8. *Streptococcus agalactiae*

l'acquirente dovrà effettuare le seguenti azioni:

⁴⁴ (*)Per quanto riguarda l'aflatossina M1 se il valore è tra i 30ppt e il limite di legge 50ppt il produttore ha 7 giorni di tempo per individuare e rimuovere la causa della contaminazione e quindi rispettare il limite più restrittivo definito per la vendita diretta di latte crudo.

(**) La positività si intende alla PCR, indipendentemente dall'esito del successivo esame culturale di conferma.

- immediata sospensione della vendita diretta di latte crudo destinato al consumatore finale;
- adozione di azioni correttive in azienda;
- ulteriori campionamenti, anche in autocontrollo e ufficiali se ritenuto necessario, per confermare la risoluzione della non conformità, in caso di esiti favorevoli potrà essere ripresa la vendita.

2.3.4 Calcolo della media geometrica in condizioni di controllo di routine

Nell'ultimo ventennio, per la valutazione di conformità del latte alla stalla, la normativa prescrive che il calcolo dei parametri relativi, alle cellule somatiche e alla carica batterica totale, sia effettuato tramite il calcolo della media geometrica di una serie predefinita di campioni [9].

Detta prescrizione, nasce dalle seguenti situazioni:

1. entrambi i parametri presentano un range di misura estremamente ampio ed un'elevata variabilità nel tempo;
2. entrambi i parametri sono considerati indicatori indiretti di sicurezza alimentare⁴⁵. Pertanto più che il loro valore puntuale interessa valutare la dinamica della situazione in azienda.

Le formule di calcolo per la determinazione della media geometrica di una serie di dati sono espresse dalle relazioni (2) e (3), tali relazioni sono equivalenti.

La media geometrica M_G calcolata con la relazione (2) è semplicemente la radice ennesima del prodotto degli n prelievi effettuati, per le cellule somatiche e per la carica batterica, in intervalli mensili ben definiti.

La media geometrica M_G calcolata con la relazione (3) è invece l'antilogaritmo della media aritmetica dei logaritmi degli n prelievi.

$$M_G = \sqrt[n]{p_1 \times p_2 \times p_n} \quad (2)$$

$$M_G = 10^{\frac{\sum_{j=1}^n \text{Log}_{10} p_j}{n}} \quad (3)$$

L'arco temporale, nel quale devono essere effettuati i prelievi e il numero di prelievi sono diversi a secondo che si tratti di cellule somatiche o di carica batterica totale. Pertanto, si distinguono le modalità elencate nei punti sottostanti:

• CELLULE SOMATICHE

La Normativa prevede il calcolo su un periodo di 3 mesi con almeno 1 campione al mese, precisamente, si considera il periodo di 3 mesi come "3 mesi consecutivi" di controlli ininterrotti.

In particolare, nel caso di interruzione dei controlli non deve essere effettuato il calcolo. Inoltre, devono essere considerati soltanto i campioni "validi", ovvero, devono essere esclusi quei campioni che possono avere delle anomalie dovuti a errori di prelievo o di conservazione. In definitiva, i prelievi devono essere effettuati nell'arco temporale di 90 giorni.

• CARICA BATTERICA TOTALE

La Normativa prevede il calcolo su un periodo di 2 mesi con almeno 2 campioni al mese, analogamente, al punto precedente, i mesi del periodo devono essere consecutivi. Il periodo è quindi di 60 giorni, anche in questo caso i prelievi anomali devono essere esclusi dal calcolo.

⁴⁵ rappresentano un indicatore di possibile presenza di microrganismi patogeni o di loro tossine oltre che della corretta applicazione delle pratiche igieniche e gestionali in allevamento

2.3.5 Caratteristiche del latte trattato termicamente

Nell'ambito del confronto tra il sistema di inattivazione dei microrganismi con i PEF e i trattamenti termici, si analizzano quali sono le caratteristiche del latte al termine dei trattamenti termici. In generale, con il trattamento termico, il latte subisce la degasatura, la standardizzazione del grasso mediante la quale si regola la concentrazione di lipidi e l'omogeneizzazione che, permette di rompere i globuli di grasso in particelle di diametro da 40 μ a 2÷4 μ , si generano così una uniforme dispersione del grasso nel latte. Si illustrano, brevemente, alcuni aspetti caratteristici del latte sottoposto al trattamento termico di pastorizzazione. Innanzitutto, come già visto, la pastorizzazione HTST (High Temperature Short Time) è il trattamento più diffuso, mediante il quale il latte viene trattato a 70÷80 °C per 15 sec. e immediatamente raffreddato a 4 °C per evitare lo sviluppo di germi termofili. Il *latte pastorizzato* ha una fosfatasi negativa e contenuto di sieroproteine \geq all'11% delle proteine totali. Negli ultimi anni si è molto diffuso il trattamento **ESL (Extended Shelf-Life)**; si tratta di un trattamento termico effettuato ad una T compresa tra [80 ÷ 135] °C per un tempo molto breve. Ad es. operando a 135 °C per circa 1 secondo si ottiene l'inattivazione dell'enzima "perossidasi" e in condizioni refrigerate (+6 °C) il latte si conserva per circa 25÷30 giorni. Diversamente, si parla di *latte fresco pastorizzato* se viene effettuato un unico trattamento termico a 48 ore dalla mungitura. In questo caso il latte presenterà: una fosfatasi negativa, le sieroproteine \geq all'14% delle proteine totali, la perossidasi positiva e un periodo di conservazione di 6 giorni.

Il latte fresco pastorizzato di alta qualità dovrebbe avere: una fosfatasi alcalina negativa, le sieroproteine \geq all'15,5% delle proteine totali, la perossidasi positiva, un periodo di conservazione di 6 giorni e proviene da ambienti (stalla) con alte caratteristiche igieniche .

Il *latte pastorizzato microfiltrato* è il latte sottoposto sia ai trattamenti di pastorizzazione e di microfiltrazione, per separare fisicamente i microbi dal latte. Quest'ultima si effettua attraverso membrane ceramiche con maglie di 1÷2,5 μ , ottenendo così una conservazione del latte, della durata di 10 giorni. Infine, il *latte sterilizzato* si ottiene sottoponendo il latte omogeneizzato a 120 °C per almeno 12 minuti. Il latte ha un periodo di conservazione molto lungo , circa 6 mesi a temperatura ambiente, ha il vantaggio di distruggere anche le spore, tuttavia ha una qualità più bassa rispetto agli altri.

Il *latte sterilizzato* ha un valore nutritivo minore del latte pastorizzato e del latte UHT, tuttavia, presenta il vantaggio di una lunga conservazione (vengono distrutte anche le spore) e si conserva per circa 6 mesi a temperatura ambiente.

2.3.6 Le conseguenze del riscaldamento

Il riscaldamento rappresenta il trattamento, nelle sue varie modalità, che garantisce il miglioramento della qualità igienica e della durata di conservazione del latte. Il riscaldamento comporta l'eliminazione dei batteri, dell'acqua ma anche degli enzimi. Affinché, la tecnologia dei PEF possa risultare effettivamente competitiva per applicazioni, su scala industriale, deve garantire l'eliminazione dei patogeni e alterare in misura ridotta, la complessità chimico-fisica del latte. In base agli studi effettuati, il riscaldamento può comportare, la modifica di alcune sostanze (*denaturazione*), la decomposizione, oltre allo spostamento dell'equilibrio chimico-fisico. Si sottolinea che, alcuni di questi fenomeni sono interdipendenti tra loro, poiché spesso, sono il risultato di processi biochimici complessi. Ad es. la morte dei batteri può essere ricondotta alla sovrapposizione degli effetti di alcune reazioni chimiche, come la denaturazione e la degradazione di proteine, che rappresentano i componenti degli enzimi essenziali. Dal confronto tra le reazioni chimiche a temperatura ambiente e a temperatura superiore, si constata che la temperatura influisce sulla velocità della reazione secondo la relazione di Vant' Hoff:

$$V_2 = V_1 \times c^{0.1(T_2-T_1)} \quad (1)$$

La relazione (1) rappresenta la forma empirica della velocità di reazione V1 che moltiplica un “fattore di temperatura c” costante quando la temperatura cresce di 10 °C.

Per rendersi conto della notevole influenza dell’aumento di temperatura sulla velocità di reazione, assunto un valore di c=2 alla T=0 °C, si consideri ad es. che la T2 diventi pari a 80 °C, la velocità di reazione diviene 256 volte superiore, invece, se T2 aumenta fino a 160 °C la velocità di reazione diviene di 65.500 volte superiore. In particolare, l’influenza è significativa in un certo intervallo di temperature, ad es. intorno allo zero e anche fino a temperatura ambiente le reazioni sono molto lente, mentre a temperature superiori alla temperatura di sterilizzazione, la rapidità con cui avviene la reazione è decisamente notevole. Si osserva che il coefficiente c dipende dal tipo di reazione. In si riportano, per alcune tipologie di reazioni, i valori caratteristici.

Tabella 2-9. Valori del coefficiente c a seconda delle reazioni

Coefficiente di temperatura (c) per alcune reazioni e trasformazioni				
enzimatiche	radioattive	ossidazione	distruzione spore batteriche	distruzione batteri
2÷3	1	3÷6	5÷10	10÷25

L’aumento della velocità di reazione è dovuto all’aumento del numero di molecole che hanno una energia pari all’energia di attivazione Ea (J/mol) [10]. La velocità di reazione e la temperatura sono messe in relazione dall’equazione differenziale lineare di Arrhenius :

$$\frac{dK}{dT} + \frac{\Delta E_a}{RT^2} K = 0 \quad (2)$$

dove

K =costante di velocità

ΔE_a = variazione dell’energia di attivazione

R=costante universale dei gas

T=temperatura assoluta

L’equazione (2) è molto utile, in fase sperimentale, perché dal confronto della retta ottenuta con i dati sperimentali e la retta di Arrhenius [10] si può stabilire, nel caso di reazioni competitive, quale sia quella favorita.

Ad es. la trasformazione di *caramellizzazione* del latte zuccherato, a 100°C avviene in 30 min, mentre, a 20 °C sono necessari 2 anni per ottenere lo stesso risultato. Pertanto, variando la temperatura dell’ambiente di reazione⁴⁶ si può favorire una reazione chimica rispetto alla sua reazione competitiva.

FASE 2 – La sperimentazione

3 Risultati

3.1 Analisi microbiologica sperimentale dei mosti e del latte crudo

La fase preliminare all’attività di analisi, ha riguardato l’approvvigionamento dei campioni di mosto forniti, gentilmente e gratuitamente, dai produttori locali. I campioni di mosto sono di diverse varietà di uva (montepulciano, sangiovese, merlot, cesanese e nero d’avola) e sono coltivate nell’area romana, viterbese

⁴⁶ si intendono tutte le specie chimiche che non reagiscono

e in sicilia . I campioni sono stati conservati in recipienti sterili e mantenuti alla temperatura di 0° C, in modo da bloccare la fermentazione. Sono state effettuate due tipologie di analisi: l'una di tipo microbiologica e l'altra di tipo chimico-fisica.

La caratterizzazione microbiologica dei mosti ha permesso di individuare la quantità, la forma, il ceppo e le dimensioni dei microrganismi. Inoltre, le analisi microbiologiche sono state eseguite secondo le metodologie illustrate ai punti successivi.

- *Analisi microbiologica di tipo 1*

Il mosto d'uva fresco (nero d'avola del trapanese) analizzato presentava un aspetto torbido, per la caratteristica presenza di frammenti solidi in sospensione. Il prodotto è stato sottoposto ad analisi per la determinazione della carica microbica.

In tale fase, infatti, tutte le forme microbiche sono da considerarsi contaminanti in quanto possibili competitori con il ceppo o i ceppi che verranno inoculati per la successiva vinificazione.

Anche se il controllo della contaminazione del mosto potrebbe essere effettuato mediante l'osservazione diretta al microscopio, in quanto le cellule del lievito sono visibili, se presenti in numero maggiore di 10⁵/ml, le cellule batteriche sono invece molto difficili da distinguere nel mosto torbido.

Si è proceduto, quindi, al conteggio su piastra che ha permesso una determinazione quantitativa e qualitativa delle principali classi microbiche che possono essere riscontrate in tale matrice:

- lieviti di cui *Brettanomyces/Dekkera* spp.
- muffe
- batteri acetici
- batteri lattici

Per la determinazione della carica in germi acidofili (muffe e lieviti), è stato utilizzato il MEA (Malt Extract Agar) OXOID acidificato a pH 3,5 con acido lattico sterile al 10%, con semina per inclusione ed incubazione per 5 gg a 30°C.

Per la determinazione e riconoscimento dei lieviti è stato utilizzato il YM agar OXOID (Yeast and Mould), con semina per spatolamento ed incubazione a 30°C per 48 h, condizione che consente lo sviluppo della gran parte dei lieviti; e 25°C per 5 gg, condizione invece che permette lo sviluppo di specie che hanno una crescita più lenta come ad esempio *Brettanomyces/Dekkera* spp, il nome *Dekkera* viene usato intercambiabilmente con *Brettanomyces*, infatti, descrive la forma delle spore del lievito.

Le colonie dei lieviti, presenti su tali terreni, sono state colorate usando il cristallviolettto per osservare le caratteristiche morfologiche, grazie alle quali è stato possibile discriminare i generi principali. Nello specifico, ai fini dell'identificazione delle colonie sospette del *Brettanomyces* spp., ci si è basati inizialmente sull'osservazione macroscopica. Le colonie del microrganismo in studio presentavano una morfologia tipica di *Brettanomyces* spp., con una colorazione crema, profilo a cupola e diametro ridotto. La fase successiva di identificazione è stata l'osservazione microscopica. Sono stati allestiti dei preparati a fresco, a partire da singole colonie sospette; dall'osservazione al microscopio ottico, le cellule presentavano morfologia ovoidale, a losanga, spesso con setti e gemmazione multipolari, morfologia tipica di tale lievito. Le cellule di *Saccaromyces cerevisiae* invece hanno una forma sferica, oppure ellittica o, talvolta, leggermente allungata.

Per la determinazione dei batteri acetici, batteri gram negativi e catalasi positivi, è stato utilizzato il terreno al CaCO₃ (estratto di lievito 50,0 g/l, CaCO₃ 20,0 g/l, Agar 20,0 g/l, H₂O 1000ml) ed il terreno al Verde Bromocresolo (estratto di lievito 30,0 g/l, Agar 20,0 g/l, Verde di bromocresolo 10 ml al 2,2%, H₂O 1000ml), con semina per spatolamento ed incubazione a 28-30°C per 5 giorni. Le colonie sono state sottoposte a colorazione di gram e test della catalasi.

Per la determinazione dei batteri lattici, gram positivi e catalasi negativi, invece è stato utilizzato l'MRS OXOID (MAN, ROGOSA E SHARPE) al 20% di succo di pomodoro, con semina per spatolamento ed incubazione a 30°C per 15 gg. I test di conferma hanno previsto anche in questo caso la colorazione di gram e il test della catalasi.

Per ogni analisi sono state preparate 5 piastre per ogni diluizione, effettuata con soluzione fisiologica sterile (SF) (NaCl 0,8% + peptone 0,1%) e sono state effettuate le letture e calcolato il numero medio di CFU per 1 ml di prodotto tal quale.

I risultati dell'analisi microbiologica sono riportati nella Tabella 3-1.

Tabella 3-1. Valori caratteristici dei microrganismi presenti nei campioni

Microrganismi	Carica (CFU/ml)
Lieviti	$1,15 \cdot 10^7$
<i>Brettanomyces spp.</i>	$1,05 \cdot 10^5$
Muffe	$2 \cdot 10^4$
Batteri acetici	$6,5 \cdot 10^5$
Batteri lattici	$1,5 \cdot 10^3$

Per quanto riguarda, la determinazione dei parametri chimico fisici, il grado brix è stato determinato mediante il rifrattometro di Abbe; la percentuale di alcool, i livelli di glucosi e fruttosio, acido malico ed i valori di pH ed acidità totale sono stati determinati mediante l'analizzatore per i vini OENOFOS; il contenuto totale in polifenoli, tannini ed antociani è stato valutato utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis.

I risultati, dell'analisi chimico fisica sono riportati nella Tabella 3-3.

Tabella 3-2. Parametri chimico fisici dei campioni

PARAMETRI CHIMICO-FISICI	VALORE
Grado Brix	20
Alcool	2,5 7%
Polifenoli totali	120 mg /kg
Tannini	2,01 g/l
Antociani	0 mg/l
Glucosio e fruttosio	167,8 g/l
Acido malico	1,78 g/l
pH	3,66
Acidità totale	4 g/l

- *Analisi microbiologica di tipo 2*

I campioni di mosto (sangiovese, merlot, cesanese provenienti rispettivamente da Frascati, Monte Porzio, Olevano Romano) sono stati ottenuti dalla pigiatura e sgrondatura della uve senza applicare nessun trattamento. I campioni sono stati letti al microscopio e le cellule presenti sono state tipizzate in base all'evidenza microscopica fornita dalle misure rilevate. Nella Tabella 3-3 sono riportati i risultati della conta cellulare (UFC/ml con fattore di conversione di 250) effettuata nella camera di Burkner, per i mosti 1,2,3 corrispondenti, rispettivamente, al sangiovese, merlot e cesanese .

Tabella 3-3. Valori caratteristici dei microrganismi nei campioni di mosto

MICROORGANISMO	FORMA	DIMENSIONI μm	MOSTO 1	MOSTO 2	MOSTO 3
SACCAROMICETI	Ovale	5,5 X 10,5	500	750	750
KLOECKERA APICULATA	Limoniforme	2 X 3,5	300	625	1000
PICHA VINI	cilindrica lunga	3 x 8,5	125	250	200
CANDIDA VINI	ovale allungata	2 x 7	60	120	180
BATTERI AMBIENTALI	carica totale	< 1	1000	1600	800
MUFFE			==	==	==

Infine è stata effettuata la conta batterica per un campione di latte prelevato da un impianto di mungitura nella zona di Valmontone di Roma. Nella Tabella 3-4 sono riportati i risultati della conta cellulare (UFC/ml con fattore di conversione di 250) effettuata nella camera di Burkler.

Tabella 3-4. Valori caratteristici dei microrganismi nel campione del latte

MICROORGANISMO	FORMA	DIMENSIONI μm	LATTE (UFC/ml)
ENTEROCOCCHI	Tonde	< 1	250
STAPHILICOCCHI	Tondi a grappoli	0,7 ÷ 1,2	150
STREPTOCOCCHI	Tondi a catenelle	0,5 ÷ 1,2	600
LISTERIA MONOCITOGENENS	Bastoncino cigliato	1 ÷ 2	150
BRUCELLA	Allungata	0,5 x 0,5 ÷ 2,0	==

3.2 Il portacampione per esperimenti dei PEF sui liquidi

Il portacampione destinato ad accogliere piccoli campioni di liquidi, da sottoporre a trattamenti PEF sperimentali, è stato dimensionato tenendo conto che le applicazioni saranno effettuate con impulsi elettrici di tensioni elevate, dell'ordine di parecchie decine di KV. Il contenitore è stato realizzato in *perspex*, perché possiede le seguenti caratteristiche:

- sufficiente rigidità meccanica e lavorabilità al tornio, inoltre, è reperibile in commercio in lingotti cilindrici di varie sezioni;
- ottima rigidità dielettrica rendendo possibile l'inserimento degli elettrodi di campo e la loro connessione con gli strumenti di alimentazione e di misura elettrici.
- è trasparente e consente il controllo visivo del contenuto durante la preparazione e lo svolgimento dei trattamenti PEF.

A partire queste caratteristiche, il porta-campione è stato ricavato da un lingotto di diametro $d = 10$ cm, altezza $L = 8$ (cm) cm e scavato al tornio fino a profondità $P = 6.5$ cm. Il recipiente ottenuto ha pareti laterali spesse 10 mm e fondo di spessore $S = 1.5$ cm. Sul fondo, al centro, è stato realizzato un foro $\varphi = 5$ mm attraversabile da una vite filettata e saldata ad un elettrodo di acciaio inossidabile spesso $d_1 = 5$ mm e diametro pari a quello interno del contenitore. Sul lato esterno, il foro è stato allargato a $\varphi_2 = 12$ mm con inserimento di una sede *o-ring*. Un tappo filettato (B), come rappresentato in fig.1, in basso fissa insieme elettrodo, tappo e un capocorda elettrico (ground elettrico) del dispositivo.

Anche il coperchio è stato adeguatamente realizzato con una fetta dello stesso lingotto da 10 cm di diametro e spessore di circa 3 cm con un foro centrale filettato di 8 mm di diametro, inoltre, poiché è necessario poter guidare e sostenere l'elettrodo di campo con il desiderato spacing dall'elettrodo di ground. L'estremità esterna dello stesso (A) in fig.1 è collegabile ai dispositivi elettronici di iniezione ed analisi degli impulsi elettrici. Sulla faccia interna del coperchio è stata tornita una sede *o-ring* affacciata alla sezione superiore del contenitore. Una serie di 6 fori filettati stringe l'*o-ring* al coperchio e al recipiente rendendo tutto il dispositivo ermetico.



Fig.1. Portacampione

3.2.1 Applicazioni future- applicazione dopo l'imbottigliamento

3.2.2 Conclusioni

I risultati ottenuti in questa annualità, rappresentano le condizioni necessarie per l'avvio delle seguenti attività future :

1. applicare i PEF prima della fermentazione in modo da inibire i microrganismi e contestualmente intervenire mediante l'inoculazione dei lieviti ai quali si vuole affidare la fermentazione in modo da ottenere le qualità aromatiche e organolettiche desiderate;
2. applicare i PEF a fermentazione avvenuta in modo da stabilizzare il vino e impedire così che eventuali microrganismi possano svilupparsi a causa di determinate condizioni chimico-fisiche del vino. Ad es la presenza di azoto nel vino può portare alla formazione di composti come il carbammato di etile (potenzialmente tossico) ad opera dei *S. cerevisiae*;
3. applicare i PEF al latte crudo per aumentare la conservabilità e eliminare la microfiltrazione finale.

Bibliografia

- [1] Microbiologia enologica (ottobre 2014). Giovanna Suzzi e Rosanna Tofalo.
- [2] Microrganismi della vite e del vino (dicembre 2015). Raffaele Guzzon e Ilaria Pertot.
- [3] Appunti del modulo di tecnologia lattiero-casearia. Facoltà di Agraria-Università degli studi di Torino.
- [4] Scienza del latte(maggio 2000). Charles Alais.
- [5] Igiene del Latte (Luglio 2005). Roberta Lodi – CNR- ISPA Milano
- [6] Criteri microbiologici per prodotti alimentare. Regione Piemonte.
- [5] http://old.iss.it/binary/latte/cont/mf_marcone.pdf (giugno 2013). Igiene degli AOA. Ministero della Salute - Direzione Generale dell'igiene, della Sicurezza Alimentare e Nutrizione.
- [6] Bazhal, M. I., Ngadi, M. O., Raghavan, G. S. V. and Smith, J. P., 2006. "Inactivation of Escherichia coli O157: H7 in liquid whole egg using combined pulsed electric field and thermal treatments". LWT-Food Science and Technology, 39(4).
- [7] Martin-Belloso, O., Vega-Mercado, H., Qin, B.-L., Chang, F.-J., Barbosa-Cánovas, G. V. and Swanson, B. G. 1997a. "Inactivation of Escherichia coli suspended in liquid egg using pulsed electric fields". J Food Process Preserv.
- [8] Provvedimento del 20 marzo 2008. Linee Guida per l'esecuzione dei controlli tesi a garantire la sicurezza alimentare nell'ambito della produzione e immissione sul mercato del latte destinato al trattamento termico e alla trasformazione . <http://www.gazzettaufficiale.it>.
- [9] Pacchetto Latte 2013. <http://www.vetinweb.it/>
- [10] Massa ed energia nella combustione tecnica (2009). Giovanni Molinari, Francesca Bonfà e Giovanni Narducci.