

 UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO

 MEDICINA
VETERINARIA
TERAMO

Corso di Laurea Magistrale in Scienze delle Produzioni Animali Sostenibili LM-86

UD-1

Insegnamento in: **SANITA' E SICUREZZA DEI PRODOTTI DI ORIGINE ANIMALE OTTENUTI DA
TECNOLOGIE INNOVATIVE E SOSTENIBILI**

SSD: VET/04; 6 CFU (60 ore)

Parte 2

A.A. 2023-2024

Docente del Corso:
Dr. Gianluigi Ferri
DVM; PhD in Food Inspection
gferri@unite.it

1

Matrici alimentari: sistemi **dinamici** e/o **microenvironments**

Carica microbica iniziale (**TMC, TPC**, ect.)

Valutazioni e ragionamenti di **micro-sistemi**

Parametri fisico-chimici di base:

- Activity water (aw);
- Potenziale redox;
- pH;
- Temperatura.

2

aw
Activity water

- microrganismi → bisogno di acqua per scambi metabolici;
- sottrazione di acqua → ritardo sviluppo negli alimenti:
 acqua "libera" biologicamente disponibile;
 acqua legata → associazione a macromolecole organiche (proteine quaternarie);
- aumento della concentrazione di sostanze in grado di trattenere l'acqua → diminuzione della tensione di vapore d'acqua sopra l'alimento;
- tensione di vapore direttamente proporzionale alla quantità di acqua *effettivamente* a disposizione dei microrganismi;
- misura "acqua disponibile" → concetto di *activity water*.

3

aw
Activity water

Fisica & Applicazione microbiologica

$a_w = p/p_0$ attività dell'acqua



p = pressione di vapore della soluzione
 p₀ = pressione di vapore del sovente puro

Legge di Roul sulle soluzioni ideali:

$a_w = N_w / (N_w + N_s)$



N_w = numero moli solvente
 N_s = numero moli soluto

In acqua distillata → $a_w = N_w / (N_w + 0) → a_w = 1$

In ambiente privo di acqua → $a_w = 0 / (0 + N_s) → a_w = 0$

4

Considerazioni pratiche sull'**aw**

- La **modulazione** della **concentrazione** del **soluto**, ovvero sia un suo aumento, determina un abbassamento dell'acqua biodisponibile: $a_w < 1$;
- I principali soluti che vengono introdotti nelle diverse produzioni alimentari sono: lo zucchero e il cloruro di sodio;
- Il ragionamento che ne viene fuori è che: *sottraendo acqua biodisponibile per la proliferazione microbica determina un rallentamento del metabolismo batterico* → esso determina:
 1. Prolungamento della durata della lag fase;
 2. Maggiore dilazionamento temporale delle fasi di duplicazione microbica;
 3. Ridotta numerosità microbica nella log fase;
 4. Aumento dei batteri morti sui duplicati.
- La **completa assenza di acqua biodisponibile** determina un **arresto del metabolismo microbico**.

5

aw
Activity water

Classificazione dei microorganismi in funzione dell'**aw**

- **microorganismi particolarmente sensibili = effetto battericida;**
- **microorganismi in grado di sopportare valori molto bassi di a_w :**
 1. **xerotolleranti** (*xeros* = secco)
 2. **osmotolleranti**
 3. **alotolleranti** (*hal* = sale);
- **microorganismi talmente adattati a bassi valori di a_w da necessitare di elevate concentrazioni saline o zuccherine:**
 1. **xerofili** (muffe)
 2. **osmofili** (zuccheri nel substrato)
 3. **alofili** (NaCl nel substrato).

6

a_w
Activity water

Fisiologia cellulare dell' a_w

- **Meccanismo del bioaccumulo:** consiste nella capacità di accumulare all'interno della cellula **sostanze osmoticamente attive** (polialcoli, aminoacidi, ioni, etc.) in grado di legarsi all'acqua nella cellula **proteggendo gli enzimi**;
- **Maggiore assorbimento soluti** → strutture trans-parietali;
- **Maggiore sintesi intra-cellulare di aminoacidi.**

Esempi

- *Staphylococcus* spp. → accumulo glicina e collina;
- alcuni lieviti → glicerolo, arabitolo oppure ioni sodio e potassio

7

a_w
Activity water

valore ottimale di $a_w = 0,98$

assenza sviluppo microbico ambienti $a_w < 0,61$
Solamente **lieviti e muffe** possono svilupparsi in alimenti con $a_w = 0,61-0,62$ mentre **nessun batterio** è in grado di riprodursi con $a_w < 0,75$

8

aw
Activity water

L'abbassamento dell'aw può determinare:

- pur consentendo lo **sviluppo microbico**;
- impedisce la produzione di **metaboliti tossici**.

Esempi pratici:

S. aureus → sviluppa con aw fino a 0,83 non produce enterotossina con aw < 0,92;

A. flavus → sviluppa con aw fino a 0,78 non produce aflatossina con aw < 0,86.

9

aw
Activity water

Determinanti...

- Fattore molto importante nel settore delle tecnologie alimentari;
- influenza il **metabolismo/sopravvivenza** dei microrganismi;
- opera una selezione microbica utilizzabile ai fini produttivi.

Teoria delle barriere multiple o **hurdle technologies** (applied to the food industries)

Sopravvivenza microrganismi in ambienti con valori di aw subottimali

1. **acidità** del mezzo;
2. **temperatura** (aumento della termoresistenza mano a mano che ci si trova in ambienti sempre più secchi).

10

aw
Activity water

Alimenti altamente deperibili aw > 0.95

Oltre questo valore vengono inclusi tutti i prodotti freschi;

Substrato ideale **Gram-negativi** (optimum aw 0.95 – 0,99):

- alteranti in **alimenti proteici** come per esempio nelle carni sia di mammiferi che nei prodotti della pesca freschi → *Pseudomonas* spp.
- Microorganismi patogeni: includono tutte le specie patogene dei Gram-negativi come per es. *Escherichia coli*.

11

aw
Activity water

Alimenti deperibili aw < 0.95 > 0.90

Substrato ideale per microorganismi Gram-positivi (che riescono a crescere bene anche con valori di aw superiori, se non prendono il sopravvento i Gram-negativi)

- **alteranti** (lattici, micrococchi, bacilli e clostridi)
- **patogeni** (stafilococchi, bacilli e clostridi)
- tutti i patogeni Gram-negativi pur sopravvivendo, **non** riescono a duplicare con valori di aw < 0.95
(solo il *Vibrio parahaemolyticus* aw < 0.92 → germe indicatore per alimenti ad umidità intermedia molto elevata soprattutto se vengono utilizzate materie prime di origine ittica o sale marino).

12

aw
Activity water

Negli Alimenti altamente deperibili e alimenti deperibili, pur verificandosi una selezione della flora alterante, l'aw da solo **non** rappresenta un fattore utile per la loro conservabilità

13

aw
Activity water

Alimenti ad umidità intermedia $aw < 0,90 > 0,65-0,60$

Se conservati in ambienti non eccessivamente umidi

- **Non** consentono lo sviluppo di batteri (eccetto **alofili**)

→ batteri alofili: Famiglia *Halobacteriaceae*, Genere *Halobacterium* e gen. *Halococcus* ($aw < 0,86 > 0,81$)

- importanti alteranti alimenti salati;
- principale fonte di contaminazione → sale marino;
- cromogeni, aerobi, gram positivi.

→ muffe. Alterazioni superficiali per esigenze di O₂

→ *Xeromyces bisporus* crescita a più bassi valori di aw (**0,61**)

14

aw
Activity water

Alimenti allo stato solido → **aw non uniforme**

- Variabilità porzioni esterne tipo di tessuto (aponeurosi connettivali, tessuto adiposo)
- Umidità relativa ambientale:
 1. **bassa** umidità ambientale
 - favorevole conservazione del prodotto
 - se eccessivamente bassa → elevato calo peso.
 2. **elevata** umidità ambientale
 - condensazione dell'acqua sul prodotto
 - innalzamento valore di aw

15

Domande ???

16

E_h
Potenziale redox

Definizione di POTENZIALE REDOX (E_h)

Misura della capacità di un substrato di perdere elettroni (tendenza a cedere elettroni in confronto ad un elettrodo di riferimento – elettrodo di platino – in atmosfera di idrogeno in condizioni standard)

Da tenere a mente:

- Perdere elettroni → il substrato si ossida (buon agente riducente)
- Acquistare elettroni → il substrato si riduce (buon agente ossidante)
- Passaggio di elettroni da un composto all'altro → differenza di potenziale (mV)

Substrati ossidati → potenziale **redox positivo**
Substrati ridotti → potenziale **redox negativo**

Potenziale redox espresso con il simbolo E_h

17

E_h
Potenziale redox

In **presenza di O₂** → potenziale redox sempre positivo (**E_h+**)

In **assenza di O₂** → potenziale redox sempre negativo (**E_h-**)

Negli alimenti
 → valori più elevati (**E_h+**) → strati superficiali a contatto con l'aria → E_h via via più basso fino a diventare negativo (**E_h-**) mano a mano che si procede verso la profondità

capacità di penetrazione dell'O₂ all'interno dell'alimento

- tensione nell'ambiente che circonda l'alimento;
- struttura dell'alimento (maggiore/minore compattezza);
- concentrazione e tipo composti ridotti presenti.

18

E_h
Potenziale redox

Eh & Microorganismi

- Microorganismi che necessitano di valori di **Eh positivi** (substrati ossidati) → **aerobi**
e.g. *Pseudomonas fluorescens* Eh tra +100 e +500 mV
- Microorganismi che necessitano di valori di **Eh negativi** (substrati ridotti) → **anaerobi**
e.g. Clostridi Eh circa -300 mV
- Possibilità di sviluppare indifferentemente su substrati con valori di **Eh positivi** e **negativi** →
aerobi/anaerobi facoltativi.
e.g. *Staphylococcus aureus* da -200 a + 200 mV

19

E_h
Potenziale redox

Microrganismi aerobi

necessitano di O₂ come ultimo accettore di H⁺ che si producono nel processo respiratorio da cui traggono energia → porzioni superficiali alimenti

$$2O_2 + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \text{ (enzima superossidodismutasi)}$$

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \text{ (enzima catalasi)}$$

Microrganismi anaerobi

l'ultimo accettore di H⁺ è un composto diverso dall'O₂ che viene conseguentemente ridotto → porzioni profonde alimenti sprovvisti di tali enzimi

- Microorganismi Aerobi-anaerobi facoltativi;
- no respirazione aerobica (produzione energia per via fermentativa);
- capacità di sviluppare anche in presenza di O₂;
- privi di superossidodismutasi e catalasi;
- meccanismi alternativi in grado di metabolizzazione H₂O₂.

20

E_h
Potenziale redox

Osservazioni...

- Valori di Eh negli alimenti
- Vegetali (succhi di frutta, verdure) +300/+400 mV
- Carne da +250 dopo la macellazione scende a - 200 mV durante la conservazione
- Formaggio da -20 a -200 mV
- Conserve in scatola da -20 a -150 mV)

21

E_h
Potenziale redox

Applicazioni nelle industrie alimentari...

Interventi tecnologici in grado di modulare ovvero sia di abbassare il potenziale redox:

- aggiunta sostanze riducenti (acido ascorbico, zuccheri, ...);
- confezionamento sottovuoto o in atmosfere gassose inerti;
- attività microorganismi aerobi.

22

Domande ???

23

pH

Definizione: è il logaritmo negativo della concentrazione di idrogenioni in una soluzione

- Il valore di pH indica l'acidità di un substrato;
- I batteri riescono a duplicare in un microambiente con pH compreso tra in 4.5 – 9.0, con un range ottimale (*optimum*) collocato nella **neutralità: 6.5 – 7.5**;
- in funzione del pH ottimale i microrganismi si distinguono in
 1. Acidofili
 2. Neutrofilii
 3. Basofili

Vibrio spp. e *Clostridium* ssp. sono più sensibili alle variazioni di pH. *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* sono i più resistenti.

La maggior parte dei patogeni non sviluppa a pH < 4.6.

24

pH

Meccanismo di azione:

Acidificazione del substrato

Riduzione del pH nel citoplasma cellula batterica

- **Azione diretta**: elevata concentrazione protoni ambiente esterno → diminuzione impermeabilità di membrana.

- **Azione indiretta**: penetrazione intracellulare molecole non dissociate di acido → dissociazione in ambiente neutro

- **Azione chelante** su ioni minerali indispensabili alla formazione di enzimi (Mg a pH acido; Zn, Ca e Fe a pH basico)

- **Azione** sulla **permeabilità** selettiva di membrana.

25

pH

Acidità prodotto alimentare → notevole azione sulla ecologia microbica → intensità e tipo fenomeni alterativi

e.g. *Shewanella* spp. nei prodotti della pesca (acido sensibile).

26

Domande ???

27

T (°C)

- Variabile ambientale ampiamente utilizzata (effetto battericida) per il controllo dei microrganismi nelle matrici alimentari;

Azione batteriostatica: ritardare la crescita
inibire la crescita

Azione battericida: eliminazione parziale
eliminazione totale

Azione freddo

- Riduzione dell'energia cinetica delle molecole;
- Rallentamento delle principali reazioni biochimiche metaboliche;
- Raggiungimento di *condizioni ambientali non favorevoli* per la vita microbica;
- Ritardo dell'insorgenza di fenomeni alterativi propri della materia vivente;
- Ciascuna delle reazioni degradative risponde in maniera diversa alle variazioni di temperatura.



28

$T (^{\circ}\text{C})$

Alcune precisazioni in ambito microbiologico applicato alle matrici alimentari

- **temperature minima e massima** → al disotto e al disopra dei quali il microrganismo non è più in grado di duplicare.
- **temperatura "ottimale"** → va riferita ad un parametro particolare per convenzione: massimo numero di atti replicativi.

29

$T (^{\circ}\text{C})$

Batteri psicrofili

- Temperatura ottimale → $T = 15^{\circ}\text{C}$
- Temperatura massima → $T = 25^{\circ}\text{C}$
- Possibilità di duplicare attivamente anche a $T = 0^{\circ}\text{C}$
- **Gram negativi**: *Pseudoalteromonas* spp., *Moraxella* spp., *Psychrobacter* spp., *Polaromonas* spp., *Psychroflexus* spp., *Polaribacter* spp., *Maritella* spp., ***Vibrio* spp.** e ***Pseudomonas* spp.**
- **Gram positivi**: *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., ***Micrococcus* spp.**
- Dal punto di vista pratico: al massimo responsabili di qualche processo alterativo.

30

T (°C)

Batteri psicrotrofi

- Temperatura ottimale → **T = 25 - 30°C**
- Temperatura massima → **T = 37°C**
- Temperatura minima → **T = 2 - 3°C**
- Generi tipicamente responsabili di fenomeni alterativi: *Pseudomonas* spp., *Alteromonas* spp., *Alcaligenes* spp., *Flavobacterium* spp., *Serratia* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Carnobacterium* spp., *Brochothrix* spp.
- Tra i **mesofili**, isolabili anche ceppi con **caratteristiche più o meno** spiccate di **psicrotrofia**: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* ssp.

31

T (°C)

... rigida e precisa schematizzazione microrganismi in grado di duplicare alle basse temperature comunque difficile ...

... lunghi dibattiti sulla migliore terminologia da utilizzare

Psicrofili temperatura ottimale < 15°C
 temperatura massima 20°C
 temperatura minima 0°C o minore

Psicrotrofi temperatura ottimale > 15°C
 temperatura massima > 25°C

32

T (°C)

Psicrofili → specificatamente adattati a crescere a basse temperature;
→ habitat permanentemente freddi.

Psicrotrofi → semplicemente freddo-tolleranti;
→ habitat con regimi termici fluttuanti.

- Entrambi notevolmente diffusi soprattutto Gram negativi, aerobi, asporigeni, bastoncellari

33

T (°C)

Batteri mesofili

- Temperatura ottimale → **T = 35 - 37°C**
- Temperatura massima → **T = 41°C**
- Temperatura minima → **T = 7°C**
- Molti agenti di malattia alimentare e molti alteranti (coliformi).
- Tra i mesofili, isolabili anche ceppi con caratteristiche più o meno spiccate di psicrotrofia: *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* ssp.

WARM !!!

34

$T (^{\circ}\text{C})$

Batteri termotrofi

- Mesofili particolarmente bene adattati a **T fino ai 45°C** (limite minimo: $T = 7 - 10^{\circ}\text{C}$);
- coliformi fecali (*Escherichia coli* e ceppi patogeni di *Campylobacter* spp.), alcune specie di *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. (*C. perfringens*).

Batteri termofili

- Temperatura ottimale $\rightarrow T > 50 - 55^{\circ}\text{C}$
- Alcuni nella categoria degli "estremofili" crescono bene solo se in presenza di $\rightarrow T = 85 - 95^{\circ}\text{C}$
- Scarsa rilevanza in igiene alimentare

35

$T (^{\circ}\text{C})$

...necessità di rendere disponibili nel tempo e nello spazio prodotti alimentari con caratteristiche organolettiche accettabili per il consumatore ...

impedire (o ritardare il più possibile) la comparsa dei fenomeni alterativi

tecnica conserviera

Ecco alcuni esempi: disidratazione, salagione, trattamenti termici, uso del freddo, fermentazione ...

36

Piccola preview**Definizione di TRATTAMENTO**

qualsiasi azione che provoca una modificazione sostanziale del prodotto iniziale, compresi trattamento termico, affumicatura, salagione, stagionatura, essiccazione, marinatura, estrazione, estrusione o una combinazione di tali procedimenti.

Regolamento (UE) N. 852/2004

37

Piccola preview**Definizione di PRODOTTI TRASFORMATI**

Prodotti alimentari ottenuti dalla trasformazione di prodotti non trasformati. Tali prodotti possono contenere ingredienti necessari alla loro lavorazione o per conferire loro caratteristiche specifiche.

Regolamento (CE) n. 852/2004

38