

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI
BOLOGNA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E TECNOLOGIE AGRO-ALIMENTARI
CAMPUS DI CESENA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN
SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

TITOLO DELLA TESI

**STABILIZZAZIONE DI SUCCO DI CAROTA TRAMITE
TRATTAMENTI NON TERMICI E UTILIZZO DI
ANTIMICROBICI NATURALI**

Tesi in

LM-70 SCIENZE E TECNOLOGIE ALIMENTARI

Relatrice:
Prof.ssa **Rosalba Lanciotti**

Candidata: **Anna Ruzzi**

Matricola N° 829650

Correlatore:
Dott. **Lorenzo Siroli**

Anno Accademico 2018-2019

*A Nonno Pietro,
pensiero costante
e nel mio cuore, sempre.*

INDICE

Pagina

1. BEVANDE VEGETALI.....	1
1.1 SUCCHI DI FRUTTA E BEVANDE A BASE DI FRUTTA E VERDURA.....	1
1.2 SUCCO DI CAROTA.....	6
1.2.1 PROPRIETÀ E CARATTERISTICHE DEL SUCCO DI CAROTA.....	10
1.2.2 PROBLEMATICHE MICROBIOLOGICHE.....	12
1.2.3 TENDENZE DI MERCATO E CONSUMI IN ITALIA.....	14
2. STABILIZZAZIONE NON TERMICA DELLE BEVANDE VEGETALI.....	18
2.1 PROBLEMATICHE DEI TRATTAMENTI TERMICI.....	18
2.2 TECNOLOGIE ALTERNATIVE AL TRATTAMENTO TERMICO.....	19
2.3 ALTE PRESSIONI DI OMOGENEIZZAZIONE (HPH).....	21
2.3.1 MECCANISMO D'AZIONE DELLE ALTE PRESSIONI DI OMOGENEIZZAZIONE.....	24
2.3.2 EFFETTI DELLE HPH SUI MICRORGANISMI PATOGENI E DEGRADATIVI DI SUCCHI E BEVANDE.....	26
2.3.3 APPLICAZIONI DELLE HPH.....	28
3. BATTERI LATTICI E FERMENTAZIONE.....	30
3.1 DESCRIZIONE GENERALE.....	30
3.2 CLASSIFICAZIONE DEI BATTERI LATTICI.....	31
3.2.1 IL GENERE <i>Lactococcus</i>	32
3.3 PRODUZIONE DI BATTERIOCINE.....	34
3.3.1 MECCANISMO D'AZIONE DELLA NISINA.....	36
3.4 UTILIZZO DELLA FERMENTAZIONE DA PARTE DEI BATTERI LATTICI NEL SETTORE DELLE BEVANDE.....	38
4. GLI OLI ESSENZIALI E LORO POSSIBILE IMPIEGO NELL'AMBITO DELLE HURDLE TECHNOLOGIES.....	42
4.1 GLI OLI ESSENZIALI.....	42
4.2 COMPOSIZIONE E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DEGLI OLI ESSENZIALI.....	43
4.3 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DEGLI OLI ESSENZIALI.....	44

4.3.1	MECCANISMO D'AZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI.....	47
4.4	APPLICAZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI IN SUCCHI E BEVANDE.....	49
4.5	OLIO ESSENZIALE DI TIMO.....	50
5.	OBIETTIVI.....	54
6.	MATERIALI E METODI.....	58
6.1	CEPPI UTILIZZATI NELLA SPERIMENTAZIONE.....	58
6.2	DEFINIZIONE DELL'ANTIMICROBICO NATURALE DA UTILIZZARE NELLA SPERIMENTAZIONE.....	60
6.3	CHALLENGE TEST PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI DIVERSI TRATTAMENTI SULLA SICUREZZA DI SUCCO DI CAROTA.....	61
6.4	PROVA DI SHELF-LIFE: VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI FERMENTAZIONE, HPH E USO DI OLIO ESSENZIALE DI TIMO SULLA STABILIZZAZIONE DI SUCCO DI CAROTA.....	64
6.4.1	ANALISI MICROBIOLOGICHE.....	66
6.4.2	DETERMINAZIONE DEL pH.....	67
6.4.3	DETERMINAZIONE DEL COLORE.....	67
7.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	69
7.1	DEFINIZIONE DELLE CONDIZIONI OTTIMALI PER IL TRATTAMENTO AD ALTE PRESSIONI DI OMOGENEIZZAZIONE DI SUCCO DI CAROTA.....	69
7.2	DEFINIZIONE DELL'ANTIMICROBICO NATURALE DA UTILIZZARE IN SUCCO DI CAROTA.....	70
7.3	DEFINIZIONE DELLE CONDIZIONI DI FERMENTAZIONE OTTIMALI IN SUCCO DI CAROTA CON IL CEPPO DI <i>L. lactis</i> LBG2.....	73
7.4	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO COMBINATO DELLE TECNOLOGIE NON TERMICHE SULLA SICUREZZA DI SUCCO DI CAROTA.....	74
7.5	VALUTAZIONE DELL'EFFETTO COMBINATO DELLE TECNOLOGIE NON TERMICHE SULLA SHELF-LIFE DI SUCCO DI CAROTA.....	81
8.	CONCLUSIONI.....	96
9.	BIBLIOGRAFIA.....	99

10. SITOGRAFIA.....107

11. ELENCO TABELLE, FIGURE E IMMAGINI.....107

1. BEVANDE VEGETALI

1.1 SUCCHI DI FRUTTA E BEVANDE A BASE DI FRUTTA E VERDURA

La Direttiva 2012/12/UE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 19 aprile 2012, che modifica la direttiva 2001/112/CE del Consiglio concernente i succhi di frutta e altri prodotti analoghi destinati all'alimentazione umana, propone nell'Allegato 1 la definizione di succo di frutta secondo cui si intende “ il prodotto fermentescibile ma non fermentato, ottenuto dalla parte commestibile di frutta sana e matura, fresca o conservata mediante refrigerazione o congelamento, appartenente ad una o più specie e avente il colore, l'aroma e il gusto caratteristici dei succhi di frutta da cui proviene” (Direttiva Europea, 2012)

All'interno di questo documento vengono descritte tutte le tipologie di succhi a base di frutta e prodotti analoghi, che vengono così suddivisi:

1. Succo di frutta:

- L'aroma, la polpa e le cellule ottenute mediante processi fisici adeguati sulla base delle stesse specie di frutta possono essere restituiti al succo.
- Se i succhi sono ottenuti da frutti con acini, semi e bucce, le parti o i componenti di acini, semi e bucce non sono incorporati nel succo. Tale disposizione non si applica ai casi in cui le parti o i componenti di acini, semi e bucce non possono essere eliminati facendo ricorso a buone prassi di processo.

2. Succo di frutta da concentrato:

- Designa il prodotto ottenuto mediante ricostituzione del succo di frutta concentrato, con acqua potabile che soddisfa i criteri stabiliti dalla direttiva 98/83/CE, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano.
- Il succo di frutta da concentrato è preparato con processi adeguati che mantengono le caratteristiche fisiche, chimiche, organolettiche e nutritive essenziali di un succo di tipo medio del frutto da cui è ottenuto.

3. Succo di frutta concentrato:

- Designa il prodotto ottenuto dal succo di frutta di una o più specie di frutta, mediante eliminazione fisica di una determinata parte d'acqua. Se il prodotto è destinato al consumo diretto, l'eliminazione deve essere almeno pari al 50 % della parte d'acqua.

4. Succo di frutta estratto con acqua:

- È il prodotto ottenuto per estrazione ad acqua (diffusione) di: frutti polposi interi il cui succo non può essere estratto con altri processi fisici, oppure frutti interi disidratati.

5. Succo di frutta disidratato – in polvere:

- Designa il prodotto ottenuto dal succo di frutta di una o più specie di frutta, mediante eliminazione fisica della quasi totalità dell'acqua.

6. Nettare di frutta:

- Designa il prodotto fermentescibile ma non fermentato che è ottenuto con l'aggiunta di acqua, con o senza l'aggiunta di zuccheri e/o miele, ai prodotti definiti nei punti precedenti, alla purea di frutta e/o alla purea di frutta concentrata e/o ad un miscuglio di questi prodotti.

Oltre alla descrizione sono presenti anche gli ingredienti, e i trattamenti e sostanze autorizzati, ovvero:

1. Ingredienti autorizzati:

- vitamine e minerali autorizzati dal regolamento (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 dicembre 2006, sull'aggiunta di vitamine e minerali e di talune altre sostanze agli alimenti,
- additivi alimentari autorizzati in conformità del regolamento (CE) n. 1333/2008,
- per i succhi di frutta, i succhi di frutta da concentrati e i succhi di frutta concentrati: l'aroma, la polpa e le cellule restituiti,
- per i nettari di frutta: l'aroma, la polpa e le cellule restituiti; zuccheri e/o miele fino a un massimo del 20 % del peso totale dei prodotti finali e/o edulcoranti.
- al fine di correggerne il gusto acido: succo di limone e/o di limetta e/o succo concentrato di limone e/o di limetta in quantità non superiore ai 3 g per litro di succo, espresso in acido citrico anidro,

2. Trattamenti e sostanze autorizzati:

- processi meccanici di estrazione
- gli abituali processi fisici, compresi i processi di estrazione con acqua (processo "in line") della parte commestibile;
- preparati enzimatici: pectinasi (per la scissione della pectina), proteinasi (per la scissione delle proteine) e amilasi (per la scissione degli amidi) conformi ai requisiti del regolamento (CE) n. 1332/2008,
- gelatina alimentare,
- tannini,
- silice colloidale,
- carbone vegetale;
- azoto,

- bentonite come argilla assorbente,
- coadiuvanti di filtrazione e agenti precipitanti chimicamente inerti
- coadiuvanti di assorbimento chimicamente inerti conformi al regolamento (CE) n. 1935/2004, utilizzati per ridurre il tenore di limonoidi e naringina del succo di agrumi.

Per quanto riguarda gli zuccheri, l'indicazione che al nettare di frutta non sono stati aggiunti zuccheri e ogni altra indicazione che può avere lo stesso significato per il consumatore, sono consentite solo se il prodotto non contiene mono- o disaccaridi aggiunti o ogni altro prodotto alimentare utilizzato per le sue proprietà dolcificanti, inclusi gli edulcoranti quali definiti nel regolamento (CE) n. 1333/2008. Se il nettare di frutta contiene naturalmente zuccheri, sull'etichetta dovrebbe figurare l'indicazione seguente: “contiene in natura zuccheri” (Direttiva Europea, 2012).

I prodotti regolamentati sono definiti sulla base della loro composizione e dei processi di produzione in modo da garantire che i “nomi prescritti dalla legge” siano utilizzati correttamente e non siano fuorvianti. La direttiva sui succhi di frutta definisce anche designazioni particolari utilizzate in alcuni paesi e lingue. Il testo elenca le materie prime che possono essere utilizzate per produrre succhi e nettari, nonché tutti gli additivi autorizzati. Stabilisce i requisiti compositivi per sei prodotti, vale a dire: succo di frutta, succo di frutta da concentrato, succo di frutta concentrato, succo di frutta estratto con acqua, succo di frutta disidratato – in polvere e nettare di frutta.

Il succo è definito nel senso più generale come “contenuto fluido estraibile di cellule o tessuti”. La componente carnosa, che è normalmente la parte commestibile del frutto maturo, contiene principalmente cellule di parenchima, che possiedono pareti cellulari sottili e un vacuolo che occupa la maggior parte del volume cellulare. Pertanto, la linfa cellulare trovata all'interno del vacuolo rappresenta il componente principale del succo di frutta (Mihalev et al. 2018).

Questa tipologia di prodotti è consumata da una grande molteplicità di consumatori, dai più piccoli ai più grandi, e negli ultimi anni hanno acquisito un valore salutistico ad esempio grazie all'apporto di vitamine naturalmente presenti nei frutti, o anche grazie alle loro proprietà antiossidanti.

I succhi di frutta e verdura sono bevande popolari consumate da persone di tutte le età per le loro qualità sensoriali e nutrizionali. In realtà, sono percepiti come alimenti “sani” a causa del loro basso contenuto di sodio, colesterolo minimo, grassi e ricchezza di vitamina C, polifenoli e flavonoidi che contribuiscono a buone proprietà antiossidanti (Patrignani et al., 2009).

Secondo Alasalvar et al. (2001) la vitamina C (acido ascorbico) è il micronutriente più facilmente associato a frutta e verdura. Il suo contenuto varia considerevolmente tra diverse verdure e dipende anche sulla varietà e condizioni agronomiche.

Le tecniche per produrre succhi di frutta e bevande vegetali in genere sono molteplici, ma generalmente sono due le principali: estrazione a caldo (ottenuta tramite centrifughe) ed estrazione a freddo.

I succhi pressati a freddo, chiamati anche “cold pressed juice”, si ottengono con una tecnica avanzata che permette di estrarre delicatamente il liquido dai vegetali, mantenendo intatte tutte le sostanze nutritive racchiuse nella frutta e nella verdura. Si differenzia dalle tradizionali centrifughe, che comportando un aumento di temperatura e un processo di ossidazione, disperdono le proprietà nutrizionali degli ingredienti e ne alterano la composizione chimica (Ashurst, 2005).

Il processo produttivo consiste in una serie di fasi, come si può vedere in Figura 1.

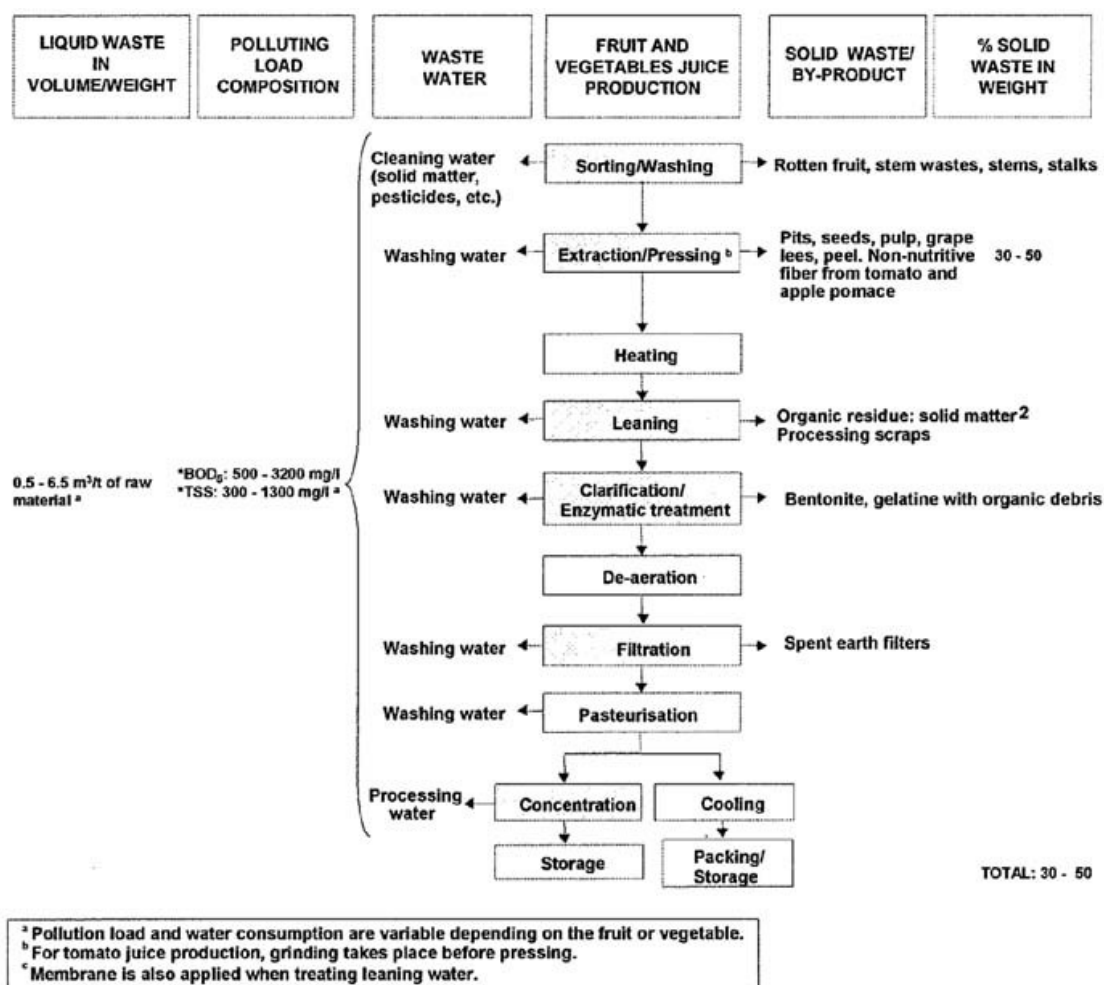


Figura 1 – Processo produttivo di succhi di frutta e di vegetali (BAT for Food, Drink and Milk Industries, January 2017)

La frutta e la verdura minimamente trasformate ed in particolare quelle fresche, hanno una breve conservabilità poiché soggette a rapido deterioramento microbico e, in alcuni casi, alla contaminazione da agenti patogeni. La cottura e la pastorizzazione, nonché l’aggiunta di conservanti chimici, sono le principali opzioni tecnologiche che garantiscono frutta e verdura

sicure. Infatti come si può notare in Figura 1 tra le ultime fasi del processo produttivo vi è la pastorizzazione che ha il compito di garantire la stabilità microbiologica nel tempo di questo prodotto alimentare.

Però questi processi determinano una serie di cambiamenti non sempre desiderabili nelle caratteristiche fisiche e composizione chimica di tali alimenti. Per ridurre questi inconvenienti sono state adottate alcune nuove tecnologie, come ad esempio la stabilizzazione tramite le alte pressioni idrostatiche, le radiazioni di ionizzazione e i campi elettrici pulsati; vengono considerati innovativi anche i sistemi di imballaggio attivi e l'uso di antimicrobici naturali come conservanti (Di Cagno et al., 2013).

Per quanto riguarda il packaging dei succhi di frutta, vengono utilizzati soprattutto il cartone asettico come il Tetra Pak, o altrimenti il PET (Polietilentereftalato), il vetro e raramente la plastica.

Tradizionalmente si utilizzava il vetro ma, data la sua fragilità, negli ultimi anni ci si è concentrati sullo sviluppo del packaging “cartone-polimero-alluminio” usato per formare scatole in linea e che sono confezionate in modo asettico. Varie materie plastiche sono state e continuano ad essere utilizzate: polietilene ad alta e bassa densità (HDPE, LDPE), polivinilcloruro (PVC), polistirene (PS), ma quella di gran lunga più importante è il PET che ha proprietà sorprendentemente simili a quelle del vetro, ma non presenta gli stessi svantaggi di peso e fragilità (Ashurst, 2005).

Generalmente il pH della frutta è basso, infatti oscilla tra valori di pH 2,0 – 4,5 a causa del loro alto contenuto di acidi organici (Dewanti-Hariyadi, 2014), anche se molte tipologie di frutti e verdure come le carote hanno un pH maggiore, normalmente superiore a 6.

Un importante parametro di questa tipologia di prodotti è il grado Brix (°Bx) che esprime il contenuto dei solidi solubili; è la misura delle sostanze allo stato solido all'interno di un liquido. Questa “scala” di valori riflette la concentrazione della sostanza disciolta (prevalentemente zucchero) nel liquido.

Secondo Mihalev et al. (2019) il livello Brix dei succhi di frutta dovrebbe rappresentare il livello di estrazione dei frutti.

La misurazione viene effettuata con il rifrattometro e nei succhi il livello di Brix corrisponde all'1-2 % di zucchero sul peso totale.

Frutta e verdura sono fonti fondamentali di vitamine idrosolubili (vitamina C e vitamine del gruppo B), provitamina A, fitosteroli, fibre alimentari, minerali e sostanze fitochimiche per la dieta umana. Prove scientifiche incoraggiano il consumo di frutta e verdura per prevenire patologie croniche come l'ipertensione, malattie coronariche e rischio di ictus (Di Cagno et al., 2013).

Molti frutti contengono una varietà di ingredienti minori, vitamine e minerali particolari, nonché carboidrati, che sono la componente solida predominante. Sebbene la frutta contenga piccole quantità di proteine e grassi, questi non sono ingredienti importanti dei succhi. I nutrienti frequentemente consumati in concentrazioni non ottimali dall'uomo sono proteine, calcio, ferro, vitamina A, tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2) e acido ascorbico (vitamina C). Oltre a questi evidenti benefici, il succo di frutta risulta essere anche una fonte di potassio.

Vi sono anche numerosi componenti con attività antiossidante, tra cui acido ascorbico, tocoferoli (vitamina E), beta-carotene e flavonoidi (Ashurst, 2005).

Per bevande vegetali a base di frutta e verdura si intendono invece prodotti in cui sono stati aggiunti altri ingredienti oltre ai derivati della frutta (zuccheri ad esempio).

Frutta e verdura, essendo ricchi di composti fenolici, carotenoidi, glucosinolati, vitamina C e tocoferoli, sono abbondanti in composti bioattivi. Questi composti bioattivi hanno un'elevata capacità antiossidante e sono importanti per prevenire lo stress ossidativo e le malattie croniche (Barba et al., 2017).

L'alto contenuto di potassio e basso di sodio della maggior parte dei succhi, aiutano a mantenere una pressione sanguigna sana. La vitamina C naturalmente presente nei succhi è essenziale per l'organismo dato che aiuta nella formazione di collagene, cartilagine, muscoli e vasi sanguigni. Aiuta anche nell'assorbimento del ferro (Aneja et al., 2014).

1.2 SUCCO DI CAROTA

Una delle bevande vegetali che negli ultimi anni ha riscontrato un notevole successo è il succo di carote, in particolare per le sue caratteristiche nutrizionali quali l'essere fonte di betacarotene e di potassio.

Le origini della carota risalgono probabilmente all'Antica Persia nel X secolo, dove fu diffusa verso il Mediterraneo dall'attuale Afghanistan. Si pensava che la carota più comune di quel tempo fosse di colore viola a causa degli alti livelli di pigmenti di antociani, da allora sono state sviluppate le specie di carote arancioni che oggi risultano essere le più consumate (Barzee et al., 2019).

Per quanto riguarda le caratteristiche sensoriali delle carote, dagli studi di Alasalvar et al. (2001), esse risultano caratterizzate da un sapore complesso. Non c'è nessun composto in particolare che rappresenta il sapore tipico di carota, questo perché ci sono molti fattori che lo influenzano, come ad esempio i componenti chimici non volatili quali zuccheri liberi, fosfati e composti azotati, fenoli e acidi organici.

Tuttavia, il sapore caratteristico delle carote è principalmente dovuto ai componenti volatili, che sono principalmente costituiti da terpeni e sesquiterpeni. I composti fenolici in frutta e verdura sono di grande interesse per due aspetti: in primo luogo, contribuiscono alle qualità sensoriali di frutta e verdura come colore, astringenza, amarezza e aroma; in secondo luogo, alcuni composti fenolici possiedono proprietà farmacologiche e vengono utilizzate a fini terapeutici. Pertanto, il metabolismo dei composti fenolici può essere usato come un buon indicatore per valutare la qualità e conservabilità di questo alimento.

Inoltre, si è visto che i più importanti indicatori per la percezione sensoriale di questo ortaggio sono i terpenoidi e gli zuccheri.

Le carote sono tra le principali fonti di energia nella dieta umana poiché, insieme ad altri frutti e verdure, contengono molti nutrienti. Sono meglio conosciute per il loro alto contenuto di composti fenolici, in particolare i carotenoidi come i caroteni α e β che conferiscono distintivi colori arancioni. Questi sono importanti precursori della vitamina A nel metabolismo umano che è coinvolta nello sviluppo e nella funzione di denti, ossa, pelle ed occhi (Barzee et al., 2019).

I carotenoidi hanno anche un'importante funzione antiossidante in grado di disattivare l'ossigeno singoletto e i radicali liberi; inoltre sono anche associati a benefici per la salute umana tra cui: inibizione di alcuni tumori, prevenzione delle malattie cardiovascolari, riduzione dei rischi di formazione di cataratta, prevenzione della degenerazione muscolare e miglioramento della funzione del sistema immunitario (Sharma et al., 2012).

Grazie ai benefici per la salute associati alle verdure rosse e arancioni ricche di pigmenti carotenoidi, l'USDA raccomanda agli adulti di mangiare fino a 350 g di queste verdure ogni settimana (USDA, 2015).

Le carote hanno solitamente un'umidità compresa tra l'86% e l'89%, relativamente povere di proteine e grassi e ricche in carboidrati e fibre. I contenuti biochimici generali delle carote crude sono mostrati nella Tabella 1 sottostante (Sharma et al., 2012).

	Unit	Value	References
MC	% (w.b.)	86–89	Sharma et al. (2012), USDA (2018a)
Protein		0.7–0.93	
Fat		0.2–0.5	
Carbohydrate		6–10.6	
Crude Fiber		1.2–2.8	
Total Ash		1.1	
Ca	mg/	34–80	
Fe	100 g	0.3–2.2	
P		25–53	
Na		40–69	
K		240–320	
Mg		9–12	
Cu		0.02	
Zn		0.2–0.24	
Carotenes		5.33	
Thiamin		0.04–0.066	
Riboflavin		0.02–0.058	
Niacin		0.2–0.983	
Vitamin C		4–5.9	

Tabella 1 - Composizione biochimica di carote crude (Sharma et al., 2012)

La principale fonte di sottoprodotti della carota è associata alla spremitura la quale produce una grande quantità di sansa di carota. Questo è il secondo succo di verdura più consumato dopo quello di pomodoro (Barzee, et al., 2019).

Anche secondo Liu et al. (2018), il succo di carota è uno dei principali prodotti di trasformazione della carota ed è considerato come alimento salutare grazie alla ricchezza di carotenoidi che contribuiscono all'attività della pro vitamina A e proprietà antiossidanti.

Inoltre, la produzione convenzionale di succo di carota con pressatura meccanica produce un succo leggermente torbido e vinacce ricche di carotene, poiché il carotene è insolubile in acqua rimane nelle cellule della carota (Demir et al., 2006).

Come già anticipato, in genere le tecniche per produrre bevande vegetali sono molteplici ma due sono quelle più utilizzate, ovvero l'estrazione a caldo con centrifuga e l'estrazione a freddo.

Di seguito viene riportato il diagramma di flusso della produzione del succo dalle carote (Figura 2), che dopo esser state lavate, tagliate, sbiancate in acqua calda a 95 ± 1 °C per 2 minuti con acido citrico allo 0,3% (usata per preservare il colore e prevenire la coagulazione delle proteine nel succo di carota), vengono sottoposte a spremitura.

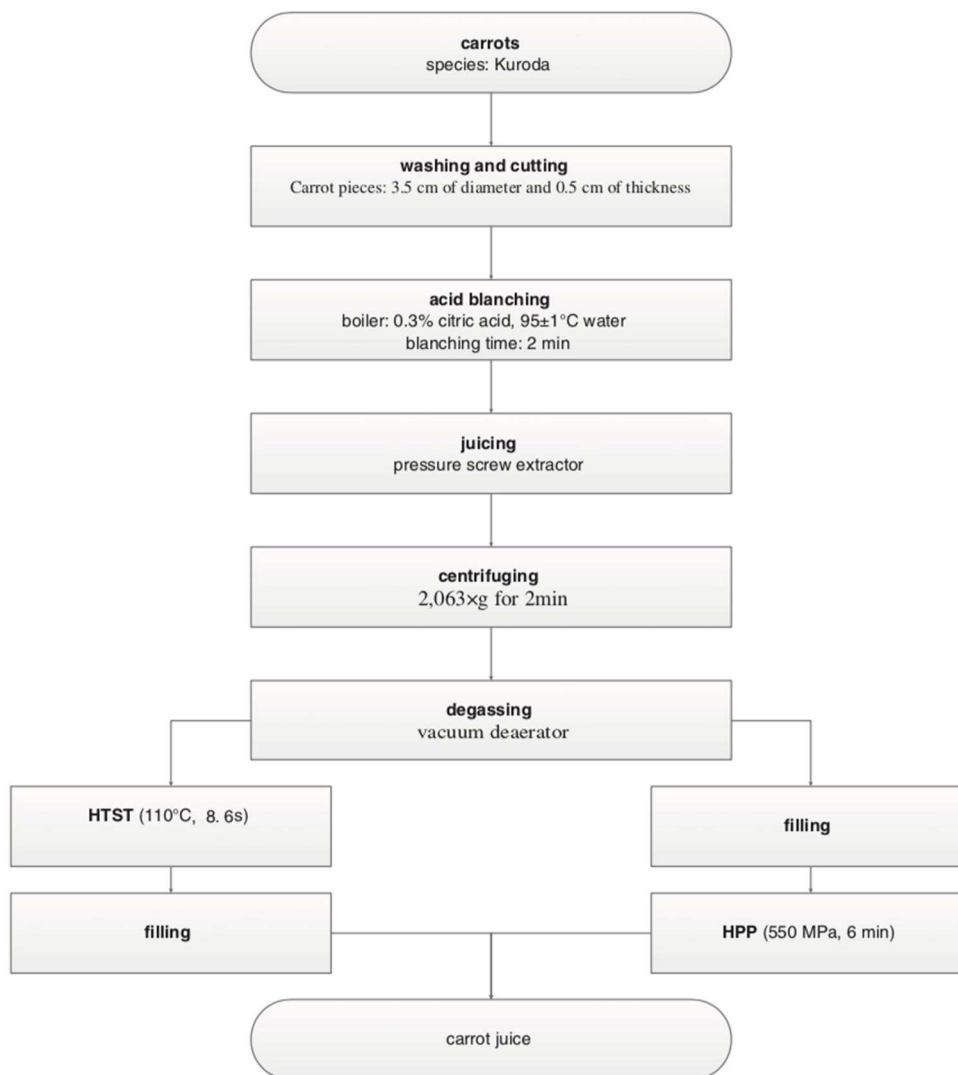


Figura 2 - Flow chart della produzione standard di succo di carota (Zhang et al. 2015)

Il succo che viene fuori da tale processo può essere:

- processato tramite trattamento ad alte temperature per breve tempo (High Temperature Short Time – HTST);
- oppure sottoposto alle alte pressioni idrostatiche HPP in modo tale da avere un minor impatto sulle caratteristiche organolettiche del prodotto ma ottenendo comunque una certa stabilità microbiologica.

Una recente tecnologia, ovvero quella delle alte pressioni di omogeneizzazione, è stata utilizzata per produrre succhi di frutta "pastorizzati a freddo". Questo tipo di prodotto ha il vantaggio di apparire al consumatore come un succo di frutta appena fatto, inoltre permette di avere sicurezza microbiologica dato che effettua la distruzione di agenti patogeni e della maggior parte degli agenti

degradativi, migliorando la durata di conservazione di un prodotto essenzialmente fresco (Wareing & Davenport, 2017).

1.2.1 PROPRIETÀ E CARATTERISTICHE DEL SUCCO DI CAROTA

Per quanto riguarda le proprietà chimico-fisiche del succo di carota che sono riportate in Tabella 2, molto importante è il valore di pH iniziale superiore a 6 che implica un'esposizione del prodotto ad un elevato rischio di contaminazione microbica (Ross et al., 2002).

Parameters	Untreated [*]	Pasteurized [*]
pH	6.23 ± 0.01 ^a	6.08 ± 0.02 ^b
Acidity (malic acid/100 g)	0.14 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^a
Ashes (%)	0.59 ± 0.01 ^a	0.63 ± 0.04 ^a
Reducing sugars (g/100 mL)	2.44 ± 0.05 ^a	2.08 ± 0.07 ^b
Total sugars (g/100 mL)	5.47 ± 0.11 ^a	5.37 ± 0.31 ^a
Soluble solids (°Brix)	7.57 ± 0.06 ^a	8.04 ± 0.04 ^b
Total solids (%)	8.94 ± 0.39 ^a	8.90 ± 0.56 ^a
Density (g cm ⁻³)	1.035 ± 0.001 ^a	1.031 ± 0.001 ^b
Calcium pectate (%)	0.15 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.01 ^b
Proteins (g/100 mL)	0.36 ± 0.06 ^a	0.08 ± 0.01 ^b
Total fibers (%)	0.47 ± 0.12 ^a	0.42 ± 0.14 ^a

^{*} Averages on the same line followed by different superscript letters are statistically different, according to the Duncan test at the 5% significance level.

Tabella 2 - Proprietà fisico-chimiche del succo di carota (Vandresen et al., 2008)

Si può dedurre che il succo di carota non trattato possiede una breve shelf-life a causa del suo alto pH, motivo per cui dovrebbe essere consumato entro uno o due giorni. Per risolvere tale problema, durante il processo produttivo il pH deve essere abbassato in modo tale da avere un prodotto più stabile e meno accessibile alle contaminazioni microbiche.

L'abbassamento del pH può avvenire in vari modi, ad esempio tramite l'aggiunta di acidi organici oppure tramite la fermentazione operata dai batteri lattici inoculati nella matrice.

La fermentazione, di cui se ne parlerà nel capitolo 4, può essere di due tipi: spontanea, ovvero quella operata dai batteri lattici naturalmente presenti nella carota; oppure guidata, ovvero utilizzando una coltura starter tale da favorire la fermentazione lattica.

Altro importante parametro è il grado Brix che, da come si può notare nella Tabella 2 precedente, ha un valore elevato, dato dalla presenza di solidi solubili all'interno del succo.

Secondo Zhang et al. (2015), il succo di carota è uno dei succhi vegetali più popolari ed è preferibilmente usato come fonte naturale di pro-vitamina A. È anche fonte alimentare di poliacetileni che hanno potenziali effetti positivi sulla salute umana.

Perciò come detto precedentemente, le carote e quindi anche il succo di carota sono ricchi di nutrienti che hanno importanti funzioni nell'organismo umano. Questi benefici sono:

- **Prevenzione delle malattie cardiovascolari:** secondo Potter et al. (2011) l'elevata incidenza di obesità e malattie cardiovascolari è attribuibile ad uno stile di vita sedentario, ai cibi ricchi di grassi e carboidrati raffinati, e soprattutto a diete povere di frutta e verdura. Studi epidemiologici hanno confermato una forte associazione tra diete alimentari ricche di frutta e verdura e salute cardiovascolare;
- **Prevenzione dell'insorgenza del cancro:** infatti secondo Sharma et al. (2012) e Vandresen et al. (2008) i carotenoidi possiedono attività anti-cancerogena;
- **Miglioramento della funzione del sistema immunitario:** la Vitamina A favorisce il mantenimento del rivestimento degli organi interni per prevenire infezioni da organismi patologici (Potter et al., 2011);
- **Prevenzione delle patologie croniche come l'ipertensione, malattie coronariche e rischio di ictus:** grazie alla presenza di Vitamina A, la cui assunzione quotidiana può prevenire patologie cardiovascolari, come l'infarto (Di Cagno et al., 2013); inoltre grazie ai composti fenolici, carotenoidi, glucosinolati, vitamina C e tocoferoli che sono abbondanti in composti bioattivi e dotati di attività antiossidante prevengono le malattie croniche (Barba et al., 2017);
- **Benefici funzionali a denti, ossa e pelle:** sempre dovuto alla forte presenza della Vitamina A e al beta-carotene che migliorano la resistenza della pelle ai raggi solari, alla vitamina K che aiuta a legare ioni Calcio nelle ossa e al potassio (Barzee et al., 2019);
- **Miglioramento della salute dell'occhio e riduzione dei rischi di formazione di cataratta:** grazie all'attività dei carotenoidi (Sharma et al., 2012; Vandresen et al., 2008);
- **Miglioramento della digestione:** in quanto contiene alte quantità di fibre che permettono una digestione più regolare (Potter et al., 2011);
- **Aumenta il metabolismo:** la grande quantità di vitamina B permette di scomporre il glucosio, i grassi e le proteine; inoltre anche il fosforo aumenta il metabolismo del corpo, ottimizzando i consumi energetici durante un allenamento (Potter et al., 2011);
- **Riduzione dei livelli di colesterolo:** caratteristica attribuibile al potassio (Ashurst, 2005);
- **Controlla i livelli di zucchero:** poiché contengono antiossidanti, vitamine e minerali essenziali per l'essere umano, svolgono un ruolo importante nella prevenzione di diabete (Aneja et al., 2014; Vandresen et al., 2008).

1.2.2 PROBLEMATICHE MICROBIOLOGICHE

Le problematiche microbiologiche dei succhi di frutta e bevande vegetali in genere, dipendono innanzitutto dal tipo di frutta o verdura, dal pH, dai trattamenti effettuati, dall'igiene degli impianti utilizzati e da tutto ciò che riguarda la lavorazione di tali prodotti.

Generalmente i soft-drinks sono delle matrici che permettono la presenza di un numero relativamente limitato di microrganismi, di solito lieviti e alcuni batteri resistenti agli acidi organici; i lieviti in generale e *Zygosaccharomyces bailii* in particolare, rimangono i microrganismi chiave del deterioramento a causa della loro fisiologia generale e della resistenza agli acidi organici utilizzati per la conservazione di questa tipologia di alimenti (Wareing & Davenport., 2017).

Secondo Aneja et al. (2014) i fattori critici che influenzano il deterioramento dei succhi sono il pH, il potenziale di ossidoriduzione, l'attività dell'acqua, la disponibilità di nutrienti, la presenza di composti antimicrobici e la microflora concorrente. Tra questi fattori, il pH e l'attività dell'acqua sono quelli che influenzano di più il deterioramento dei succhi. L'alterazione causata dai microrganismi nelle bevande vegetali comprende lo sviluppo di aromi sgradevoli, la produzione di CO₂ e i cambiamenti di colore, consistenza e aspetto con conseguente deterioramento del prodotto.

Wareing e Davenport (2017) hanno definito che lavorando sul pH e rendendolo acido (<4,5) si determina una barriera importante per la crescita microbica. Tuttavia, agenti patogeni di origine alimentare come *E. coli* e *Salmonella*, in alcuni casi, possono sopravvivere anche nell'ambiente acido dei succhi di frutta. I problemi microbici nelle soft-drinks e nei succhi di frutta possono essere suddivisi in due gruppi:

- 1- Problemi dovuti alla crescita e al deterioramento del prodotto da parte di microrganismi che producono spoilage;
- 2- Problemi dovuti alla crescita o alla contaminazione del prodotto da parte di agenti patogeni che causano intossicazione alimentare.

Nella Tabella 3 sono riportati i valori di pH iniziali di diversi succhi di frutta e verdura. Nello specifico il succo di carota presenta dei valori di pH piuttosto elevati e questo determina il rischio di contaminazione da parte di batteri. Proprio per prevenire lo spoilage microbico vengono aggiunti acidi organici, viene effettuata la fermentazione tramite l'utilizzo di batteri lattici o in alternativa vengono stabilizzati termicamente e non.

	Approximate pH ranges	Risk organisms
<i>Fruits</i>		
Apples	2.9–3.91	Yeasts
Grapes	3.20–4.51	Yeasts
Oranges	3.20–4.3	Yeasts
Raspberries	3.12	Yeasts
Blackcurrants	2.48–3.60	Yeasts
Pineapples	3.3–3.7	Yeasts and bacteria
Mangoes	3.95–4.50	Yeasts and bacteria
Tomatoes	3.80–4.80	Yeasts, bacteria and moulds/bacteria
<i>Vegetables</i>		
Carrot	4.90–6.44	Bacteria
Celery	5.7–6.1	Bacteria
Cabbage	5.4–6.0	Bacteria
Pea	6.65–6.77	Bacteria

Tabella 3 - Esempi di pH e specie microbiche che alterano succhi di frutta e verdura (Wareing & Davenport, 2017)

I generi di batteri più comuni come causa di alterazione sono *Acetobacter*, *Alicyclobacillus*, *Bacillus*, *Gluconobacter*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Zymomonas* e *Zymobacter*; mentre i lieviti sono *Pichia*, *Candida*, *Saccharomyces* e *Rhodotorula* che solitamente sono i responsabili dell'alterazione dei succhi (Wareing, et al., 2017).

La pastorizzazione è il metodo più usato per ridurre il carico microbico e inattivare i patogeni nei succhi di frutta, infatti vengono utilizzate varie combinazioni temperatura-tempo per avere una riduzione di 5-6 cicli logaritmici dei microrganismi presenti.

Per i succhi non pastorizzati, la presenza di alti livelli di microrganismi nelle materie prime, vale a dire l'uso di frutti di qualità inferiore comporterà un deterioramento precoce; inoltre anche la qualità dell'acqua aggiunta o utilizzata per la ricostituzione del succo di frutta influisce sulla sicurezza di questi prodotti. In genere frutta e verdura sono veicolo di muffe, lieviti e batteri. Questi microrganismi sono prontamente inattivati dalla pastorizzazione, quindi sono più problematici nei succhi di frutta non pastorizzati. I succhi pastorizzati, trattati termicamente o stabilizzati con trattamenti non termici, tuttavia, possono deteriorarsi a causa di batteri termoacidofilici (Dewanti-Hariyadi, 2014).

Infatti anche secondo Wareing e Davenport (2017), solitamente nei succhi di frutta e verdura stabilizzati tramite trattamenti termici e non termici, i microrganismi presenti sono dovuti o a contaminazioni ambientali o a contaminazione delle materie prime. I microrganismi rimanenti

devono avere la capacità di sopravvivere all'ambiente acido e con basso contenuto di ossigeno tipico di questi prodotti alimentari.

I succhi di frutta correttamente pastorizzati sono generalmente considerati sicuri e molto raramente associati a focolai di malattie di origine alimentare. Per ridurre l'uso del calore, vengono generalmente aggiunti conservanti acidi deboli (acido citrico, acido benzoico, anidride solforosa o loro combinazione) che permettono di abbassare il pH evitando la contaminazione microbica (Dewanti-Hariyadi, 2014).

In questi ultimi anni ci sono stati relativamente pochi casi di intossicazione alimentare causati da succhi di frutta, ma il deterioramento microbico di tali prodotti è molto comune (Wareing & Davenport., 2017).

Infatti secondo Lanciotti et al. (2012) questi prodotti sono suscettibili di deterioramento, e caratterizzati da una durata di conservazione limitata. Il deterioramento dei succhi di frutta è principalmente dovuto ai lieviti responsabili del gusto fermentato e della produzione di anidride carbonica, ai batteri lattici che possono produrre un sapore sgradevole di latticello, e muffe che contribuiscono al deterioramento dovuto alla loro crescita superficiale.

1.2.3 TENDENZE DI MERCATO E CONSUMI IN ITALIA

Per quanto riguarda la produzione totale di carote è aumentata, dopo essere più che raddoppiata negli ultimi 20 anni da 18 milioni di tonnellate nel 1994 a 47 milioni di tonnellate nel 2016 (FAO, 2018). Allo stesso tempo, la superficie totale raccolta e la resa sono aumentate rispettivamente del 54% e del 66%. Le principali regioni produttrici di carote nel mondo includono Asia, Europa e Stati Uniti. L'Asia ha registrato l'incremento più notevole della produzione di qualsiasi continente negli ultimi 20 anni e ora rappresenta oltre la metà (53%) della produzione totale mondiale di carote e rape (FAO, 2018).

Invece, il mercato dei succhi e delle bevande a base di frutta e verdura è uno di quelli in maggiore espansione nel settore alimentare e delle bevande; inoltre è uno dei segmenti più competitivi nel settore del beverage. Spinto dalla crescente consapevolezza e preferenza dei consumatori per i prodotti sani, il mercato si sta espandendo con l'uso dell'alta tecnologia nella lavorazione e nel confezionamento.

I succhi di frutta fanno parte di quelle che vengono definite le "bevande new age". Attualmente, le bevande naturali, prive di additivi o conservanti, stanno dominando il mercato dei succhi di frutta

e verdura e le bevande a base di ingredienti biologici stanno guadagnando popolarità. In sincronia con la crescente propensione del consumatore a scelte più sane, i produttori stanno passando all'utilizzo di ingredienti più sani (Priyadarshini et al., 2018).

In Figura 3 si possono notare le economie in crescita come la Cina e l'India che presentano opportunità redditizie in termini di potenziali consumatori. Cina, Francia, Germania, Regno Unito e Stati Uniti rappresentano i maggiori mercati di succhi di frutta e verdura, con la Cina leader mondiale. Il suo mercato dei succhi è quasi il doppio di quello degli Stati Uniti nel volume di mercato. I volumi in Cina hanno superato per la prima volta l'Europa nel suo insieme nel 2014. Tuttavia, attualmente i mercati dei succhi dell'America Latina sono tra le regioni a più rapida crescita a livello globale (Priyadarshini et al., 2018).

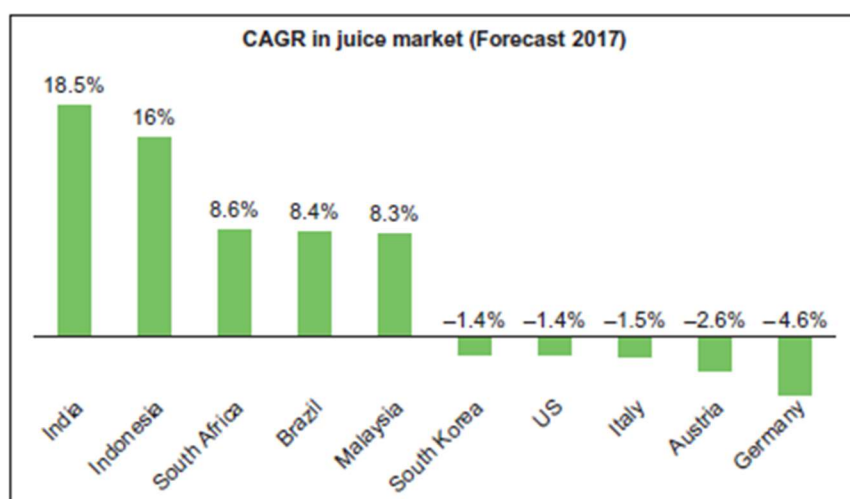


Figura 3 - Tasso di crescita annuale composto (CAGR) nel mercato dei succhi: previsioni fino all'anno 2017 (Priyadarshini et al., 2018)

Complessivamente, mentre il succo è una categoria matura, il suo mercato si sta espandendo a causa delle tendenze dei consumatori orientate sulla salute e relative all'uso di aromi, coloranti e conservanti artificiali nelle bevande che stanno portando a una maggiore domanda di prodotti sani e naturali (Priyadarshini et al., 2018).

Il mercato dei prodotti ortofrutticoli minimamente trasformati è notevolmente aumentato negli ultimi anni, infatti da come si può vedere in Figura 4 negli Stati Uniti il loro consumo copre circa il 48% del mercato. Inoltre, poiché caratterizzato da alti livelli di vitamine, fibre, minerali e antiossidanti possono apportare effetti benefici per la salute (Patrignani et al., 2015).

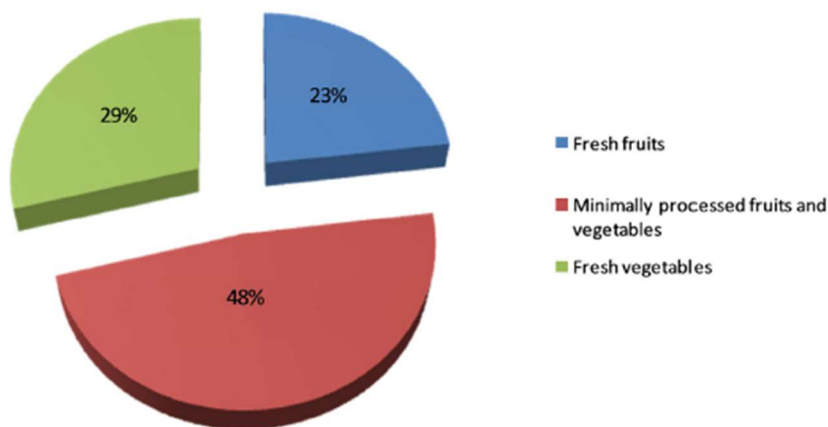


Figura 4 - Mercato di frutta e verdura fresca e minimamente trasformata in USA (Patrignani et al., 2015)

In Italia i succhi di frutta sono sempre più in pole position nella scelta di gradimento dei consumatori con un aumento di preferenza soprattutto tra i bambini nel periodo estivo, ma la fascia di età interessata resta comunque molto ampia.

La bevanda ogni anno è consumata nel nostro Paese per 765 milioni di litri, in media circa 13 a testa, con un giro d'affari complessivo che nel 2018 ha fatto registrare un fatturato in euro di 683 milioni (ANSA, 2019).

Ovviamente il mercato dei succhi di frutta dipende dalla tipologia di prodotto considerata dato che la maggior parte di questi prodotti ha una shelf-life prolungata grazie ai trattamenti con cui vengono stabilizzati. Succhi e bevande venduti freschi, e che quindi non hanno subito trattamenti, hanno una vita molto più limitata. Infatti secondo Zhang et al. (2015) il succo di carota non trattato ha un potenziale di mercato limitato a causa della sua breve durata di conservazione e dovrebbe normalmente essere consumato entro uno o due giorni.

In media, le famiglie hanno speso 457 euro mensili per prodotti alimentari e bevande analcoliche. Tuttavia, le singole spese hanno un peso diverso all'interno del paniere alimentare. Come già nel 2016, tra le voci alimentari più rilevanti vi è quella dei vegetali, ovvero l'unica a segnare un aumento consistente rispetto al 2016 (+4,2%, che segue il +3,1% dell'anno precedente). Anche la spesa per frutta è in crescita. Le voci di spesa con gli aumenti più alti sono quelle per bevande analcoliche e succhi di frutta e verdura (+7,6%) (ANSA, 2017).

L'attenzione dei consumatori rivolta a una dieta più naturale ha portato ad un incremento delle vendite dei succhi di frutta 100%. Per quanto riguarda i formati, in testa c'è il brik o la bottiglia da 1 lt, con il 46% dei volumi, quasi metà dell'intero mercato; a seguire il brik 200 ml, una delle

tipiche merende per bambini. Formati intermedi si ritrovano nel vetro, che anche per questo ha avuto un significativo trend di crescita con il +10% a volume.

Il pubblico a cui si rivolge il mercato dei succhi e nettari di frutta è diventato, nell'ultimo anno, sempre più adulto e consapevole, che sceglie salute e naturalità per i propri consumi. In linea con altri mercati, l'offerta bio è sensibilmente aumentata, segnando un fatturato di 37 milioni di euro. Fra le novità più apprezzate ci sono i succhi a base di frutti con principi attivi interessanti per la salute, prodotti senza aggiunta di zuccheri, arricchiti con ingredienti dalle proprietà salutari.

Secondo IRI, analizzare il profilo dei consumatori e proporre un'offerta innovativa che tenga conto delle nuove richieste è l'elemento chiave per il futuro dei mercati in generale, ma in particolare del mercato dei succhi (IRI, 2018).

Nella Tabella 4 sottostante si può notare come nell'anno 2018, secondo uno studio effettuato dall'IRI (istituto che effettua ricerche di mercato), la categoria dei succhi di frutta, UHT e freschi, ha sviluppato un fatturato di 627 milioni di euro nella GDO con un aumento del 2,7%.

Anno Terminante Febbraio 2018	Vendite in Valore (€)	% Variazione Vendite In Valore vs Anno Precedente	Vendite in Volume (litri)	% Variazione Vendite In Volume vs Anno Precedente	Vendite in Unità	% Variazione Vendite In Unità vs Anno Precedente
Tot Succhi Uht e Freschi	626.567.960	2,7	434.076.540	1,0	468.833.862	1,5
Succhi e Nettari UHT	582.453.248	1,3	423.963.488	0,8	449.468.736	0,7
Nettari E Simili	203.519.696	-3,3	134.917.664	-3,0	163.170.096	-3,9
Bevande Base Frutta 30-99%	221.377.536	3,2	180.835.712	3,3	169.382.864	3,1
Bevande Base Frutta Fino 29%	61.235.388	1,9	50.911.172	-0,3	52.138.196	3,6
Succhi 100%	92.947.688	7,4	56.366.716	4,0	62.317.660	4,7
Frullati Uht	3.372.946	-3,8	932.214	-7,3	2.459.912	-4,1
Succhi Freschi	44.114.712	25,3	10.113.052	8,6	19.365.126	26,5

Fonte: IRI InfoScan Census ®- Totale Italia Ipermercati, Supermercati, LSP- Segmentazione ECR

Tabella 4 – Andamento delle vendite dei succhi di frutta (IRI, 2018)

2. STABILIZZAZIONE NON TERMICA DELLE BEVANDE VEGETALI

2.1 PROBLEMATICHE DEI TRATTAMENTI TERMICI

Tradizionalmente, la conservazione e la sicurezza degli alimenti vengono raggiunte tramite l'utilizzo di trattamenti termici.

I prodotti alimentari che richiedono una shelf-life prolungata sono generalmente sottoposti a trattamento termico di cui il più comune è la pastorizzazione (72°C per 15 minuti). Si utilizzano tecniche come l'immersione in acqua calda per un periodo di tempo specifico al fine di inattivare i microrganismi indesiderati. Esistono molti metodi di lavorazione degli alimenti che utilizzano aria, acqua e radiazioni elettromagnetiche per prolungarne la vita o conferirgli caratteristiche desiderate.

Nonostante l'importanza dei trattamenti termici per garantire la sicurezza alimentare, la pastorizzazione influenza e riduce la freschezza e la qualità del prodotto. Inoltre, secondo Barzee et al. (2019) può influenzare diversi criteri di qualità, quali: vitamine, carotenoidi, polifenoli e contenuto di acidi organici, pH e colore.

Proprio per questo motivo e per il fatto che l'attenzione del consumatore, negli ultimi anni, si è orientata verso alimenti freschi, minimamente trattati e senza l'aggiunta di conservanti chimici, sono stati definiti dei metodi non termici per stabilizzarli nel tempo. Infatti, come riportato da Lanciotti et al. (2012), negli ultimi anni il cambiamento delle abitudini dei consumatori e la crescente domanda di succhi freschi privi di conservanti chimici hanno stimolato la ricerca di tecnologie di lavorazione alternative per produrre alimenti con minimi cambiamenti nutrizionali, fisico-chimici o organolettici indotti dalle tecnologie stesse.

Nel caso specifico dei succhi di frutta e delle bevande vegetali, il trattamento termico è il metodo più utilizzato per la loro conservazione grazie alla sua efficacia nel ridurre la presenza e il numero di microrganismi, infatti secondo Liu et al. (2019) il trattamento termico (HT) è ampiamente utilizzato per la conservazione del succo di frutta e verdura grazie alla sua efficacia nell'inattivazione microbica. Tuttavia, l'HT causa la perdita di proprietà nutritive e cambiamenti fisici indesiderabili che influenzano negativamente le proprietà sensoriali del prodotto.

Sebbene i succhi di frutta siano sempre stati considerati sicuri (a causa dei bassi valori di pH), alcuni studi hanno dimostrato che i succhi non pastorizzati possono veicolare agenti patogeni di origine alimentare come la *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* O157: H7. Per migliorare la sicurezza e la durata di conservazione, i succhi di frutta commerciali sono dunque generalmente trattati termicamente tramite pastorizzazione e possono contenere conservanti. Tuttavia, il

trattamento termico provoca alcuni effetti indesiderati, come l'imbrunimento non enzimatico, la formazione di aromi sgradevoli e la perdita di vitamine (Patrignani et al., 2012).

Per risolvere le problematiche indotte dal trattamento termico, ci si è concentrati su tecnologie alternative che prevedono l'utilizzo di pressione come le alte pressioni di omogeneizzazione (HPH) e idrostatiche (HHP) o i campi elettrici pulsati. In generale queste tecnologie si sono dimostrate, in taluni casi, delle valide alternative al trattamento termico per quanto riguarda l'inattivazione dei microrganismi patogeni e anche per il miglioramento della conservabilità del succo di frutta.

Il "Minimally Processing" (lavorazione minima degli alimenti) è un concetto che descrive un approccio alla sicurezza e alla conservazione degli alimenti tramite la minima trasformazione e lavorazione. È stato definito per permettere la conservazione delle proprietà intrinseche e di freschezza degli alimenti, e si è visto come l'impatto di tali processi sulle proprietà sensoriali e nutritive degli alimenti è ridotto al minimo.

Negli studi condotti da Ross et al. (2003), si è visto che combinando tecnologie e processi non termici al fine di migliorare la sicurezza degli alimenti, è stato possibile ridurre al minimo quei cambiamenti nutrizionali, fisico-chimici o organolettici negativi tipici del trattamento termico.

I succhi di frutta possono essere considerati un campo di applicazione interessante per i trattamenti tramite le alte pressioni di omogeneizzazione (HPH), al fine di ottenere la riduzione del carico microbico ma preservando gli attributi di qualità dei prodotti freschi (Patrignani et al., 2012).

2.2 TECNOLOGIE ALTERNATIVE AL TRATTAMENTO TERMICO

Dagli anni '90 ad oggi sono state condotte molte ricerche nello sviluppo di nuovi metodi di conservazione degli alimenti di tipo non termico, con il fine di raggiungere l'inattivazione dei microrganismi, avendo così dei prodotti microbiologicamente sicuri, e con modifiche minime alle qualità intrinseche degli alimenti.

Secondo Kumar et al. (2009) e Barba et al. (2017), dato che la domanda dei consumatori è sempre più indirizzata verso prodotti alimentari a base di frutta e verdura più naturali e freschi possibile, ci si è concentrati sulla ricerca di nuove tecniche di conservazione dove la lavorazione dell'alimento è ridotta al minimo. Queste comprendono l'utilizzo delle alte pressioni in genere (HP), delle alte pressioni di omogeneizzazione (HPH), dei campi elettrici pulsati (PEF), dei campi magnetici oscillanti, della luce UV e pulsata, delle radiazioni ionizzanti e degli ultrasuoni.

Quando nella lavorazione degli alimenti viene impiegato qualsiasi metodo di conservazione, è importante che la biodisponibilità di componenti chiave come i composti bioattivi non sia influenzata negativamente (Barba et al., 2017).

Le tecnologie non termiche, secondo Ross et al. (2003), sono in grado di inattivare i microrganismi a temperatura ambiente o subletale, quindi senza l'utilizzo del calore, e vengono applicate come trattamenti di conservazione dato che negli ultimi anni hanno ricevuto una notevole attenzione in risposta alle richieste di prodotti alimentari più "freschi" e "naturali" da parte dei consumatori, evitando anche tutti gli effetti deleteri che il calore ha sul sapore, sul colore e sui valori nutrizionali. Queste comprendono tutti i trattamenti di conservazione efficaci a temperatura ambiente, incluso l'uso di additivi antimicrobici, regolazione del pH e le atmosfere modificate.

Di seguito vengono riportate tutte quelle nuove tecnologie non termiche utilizzate per la stabilizzazione dei prodotti alimentari:

- **Alte pressioni (HP):** possono essere di due tipologie ovvero, alte pressioni idrostatiche HHP o di omogeneizzazione HPH.

In genere il processo delle HP prevede l'applicazione di pressioni statiche da 50 a 1000 MPa su alimenti liquidi, solidi o confezionati, con tempi di trattamento variabili da alcuni secondi a minuti. L'alta pressione influisce solo sui legami non covalenti delle molecole, lasciando intatti i legami covalenti e, di conseguenza, induce alterazioni nella struttura delle molecole.

Recentemente buoni risultati sono stati ottenuti con l'impiego delle alte pressioni di omogeneizzazione, capaci di inattivare microrganismi in alcuni succhi di frutta e in grado di migliorare colore e aspetti nutrizionali del succo stesso (Dewanti-Hariyadi, 2014);

- **Campi elettrici pulsati (PEF):** comportano il passaggio di un campo elettrico ad alta tensione (10–80 kV / cm) attraverso un alimento liquido tenuto tra due elettrodi, con impulsi molto veloci tipicamente di 1–100- μ s di durata. La distruzione delle cellule microbiche da parte della PEF è dovuta all'azione dell'elettricità irreversibile sulla membrana cellulare, che porta alla perdita di contenuto intracellulare e infine alla lisi della cellula;
- **Ultrasuoni ad alta intensità:** uso di potenza 160/640 W e frequenza 35 kHz, l'effetto antimicrobico è dovuto alla cavitazione, ovvero alla creazione e al collasso estremamente rapidi delle bolle formate da onde ultrasoniche in un mezzo liquido. La cavitazione produce intensi cambiamenti di pressione e temperatura, causando

la rottura delle pareti cellulari indotta dal taglio, rottura e assottigliamento delle membrane cellulari;

- **Radiazioni ionizzanti:** l'irradiazione di alimenti sfusi o preconfezionati è raggiunta esponendo il prodotto a una fonte di energia ionizzante, tipicamente Cobalto-60; il prodotto alimentare viene convogliato attraverso una camera schermata contenente la sorgente di radiazioni il cui dosaggio è controllato dalla velocità del trasportatore. L'inattivazione dei microrganismi da parte di le radiazioni ionizzanti è principalmente dovuta a danni al DNA;
- **Uso di ozono:** l'ozono (O₃) grazie alla sua elevata reattività, penetrabilità e decomposizione spontanea in prodotti non tossici (ovvero O₂) è un disinfettante utilizzato per garantire la sicurezza microbiologica dei prodotti alimentari. L'ozono è stato usato e riconosciuto come agente sicuro (GRAS) per decenni da molti paesi grazie alle sue migliori proprietà antimicrobiche rispetto al cloro. Concentrazioni di O₃ relativamente basse nelle fasi gassose o acquose sono efficaci contro la maggior parte dei microrganismi e anche un breve tempo di contatto è sufficiente per inattivare batteri, muffe, lieviti, parassiti e virus (Akdemir-Evrendilek & Ozdemir, 2019);
- **Luce ultravioletta;**
- **Luce pulsata;**
- **Campi magnetici oscillanti.**

Con questo tipo di trattamenti è possibile inattivare e inibire i microrganismi e gli enzimi a basse temperature, mentre i composti a basso peso molecolare, come le vitamine e quelli correlati alla pigmentazione e all'aroma, rimangono inalterati. Inoltre, negli alimenti fluidi, la pressione viene trasmessa in modo uniforme e istantaneo, seguendo la cosiddetta regola isostatica (Barba, et al., 2012).

2.3 ALTE PRESSIONI DI OMOGENEIZZAZIONE (HPH)

La parola "omogeneizzazione", secondo Patrignani e Lanciotti (2016), si riferisce alla capacità di produrre una distribuzione dimensionale omogenea di particelle sospese in un liquido, forzando il passaggio di tale liquido, sotto l'effetto della pressione, attraverso una valvola di omogeneizzazione appositamente progettata. L'omogeneizzatore ad alte pressioni viene oggi largamente impiegato nelle industrie lattiero-casearie delle bevande principalmente per ridurre la

dimensione dei globuli di grasso e, di conseguenza, aumentare la stabilità delle emulsioni al fine di evitare fenomeni di scrematura e coalescenza.

La domanda dei consumatori ha aumentato il fabbisogno di alimenti con aromi e colori più naturali, con elevata qualità nutrizionale e una durata di conservazione sufficiente per la loro distribuzione e consumo. Il trattamento HPH è una nuova tecnologia non termica utilizzata per la stabilizzazione degli alimenti ed è stato dimostrato commercialmente e scientificamente che è in grado di stabilizzare microbiologicamente determinati prodotti rendendoli sicuri dal punto di vista microbiologico con qualità migliorata, incluso sapore e colore (Zhang et al., 2015).

Oltre agli effetti sulle cellule microbiche, è stato definito che il trattamento HPH agisce sui costituenti alimentari, in particolare proteine ed enzimi, modificandone le proprietà e le attività funzionali. In effetti, è stato visto che migliora la microstruttura alimentare, la reologia e la disponibilità di composti bioattivi alimentari (Patrignani & Lanciotti, 2016).

Secondo Zamora & Guamis (2014) i vantaggi delle alte pressioni comprendono: l'estensione della shelf-life attraverso l'inattivazione di microrganismi e il miglioramento della funzionalità della matrice, con effetti minimi sui valori nutrizionali e sulle caratteristiche sensoriali.

Quando applicate, le alte pressioni causano un aumento della temperatura a causa del calore di compressione. Questo aumento della temperatura è potenziato dagli effetti di taglio e dalla parziale conversione dell'energia meccanica in calore. Il risultato è un aumento della temperatura di 17-21°C per ogni 100 Mpa. Questo deve essere controllato in caso di composti alimentari sensibili al calore e generalmente lo si fa utilizzando scambiatori di calore in grado di limitare l'incremento termico (Dumay et al., 2012).

Molti progetti di ricerca europei si sono concentrati sullo studio delle alte pressioni sia idrostatiche (HHP) e di omogeneizzazione (HPH), per applicazioni in bevande vegetali e succhi di frutta. Questi progetti si sono concentrati sulla valutazione degli effetti su un gran numero di componenti alimentari, con particolare attenzione al controllo degli enzimi.

Inoltre è stato studiato, da Liu et al. (2018), che l'omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) migliora la stabilità fisica e la qualità del succo di carota, inattiva i microrganismi presenti al suo interno e mantiene intatte le proprietà di vitamina C, polifenoli e antiossidanti. Si è visto che le HPH potrebbero migliorare il rilascio e l'incorporazione micellare di carotenoidi nelle emulsioni di carota.

In Tabella 5 si possono vedere alcuni effetti delle HPH sul succo di carota, secondo alcuni studi già effettuati. In particolare vi sono delle perdite di valori nutrizionali solo in seguito a lunghi periodi di conservazione, ovvero: perdite di vitamina C in seguito a conservazione del succo di

carota per 30 giorni a 4°C dopo aver applicato 250 Mpa - 35°C - 15 minuti, e un ulteriore aumento delle perdite (55 %) di concentrazione di vitamina C è stato osservato quando la bevanda era conservata a temperature maggiori (25°C).

Product	Treatment conditions	Major findings	References
Orange juice	600 MPa/20 °C/1 min, 12 wk storage at 4 and 10 °C	Vit. C and β -carotene remained stable immediately after HP and during storage	Bull and others (2004)
	500 to 800 MPa/room temperature/5 min, 21 d storage at 4 °C	No significant changes in Vit. C, carotene content, and TAC during storage	Fernández-García and others (2001a)
	100 to 400 MPa/30 to 60 °C/1 to 5 min, 40 d storage at 4 °C	No significant changes in Vit. C immediately after HP and 14% losses during subsequent storage. Significant increase in TC after HP and less than 11% decrease during subsequent storage	Sánchez-Moreno and others (2003a)
	100 to 400 MPa/30 to 60 °C/1 to 5 min, 40 d storage at 4 °C	Increase (22 to 34%) in hesperitin concentration after HP and increase in flavanones during subsequent storage	Sánchez-Moreno and others (2003b)
	400 MPa/40 °C/1 min, 20 d storage at 4 °C	Naringetin and hesperitin increased 20 and 40%, respectively. No changes in TAC	Sánchez-Moreno and others (2005)
	100 to 400 MPa/30 to 60 °C/1 to 5 min, 40 d storage at 4 °C	No significant changes in Vit. C immediately after HP and 18% losses during subsequent storage	Plaza and others (2006a)
	400 MPa/40 °C/1 min, 20 d storage at 4 °C	Increase in flavanone concentration immediately after HP and decrease during subsequent storage	Plaza and others (2011)
	400 MPa/42 °C/5 min, 7 wk storage at 4 and 10 °C	Decrease of 4% in TC and no changes in TPC in comparison with fresh juice immediately after HP. 24% TC losses and 5% increase in TPC during storage at 4 °C. Decrease in TAC smaller than pasteurized juice	Esteve and Frígola (2008)
	400 to 600 MPa/20 °C/15 min, 7 wk storage at 4 and 10 °C	Vit. C losses lower than 6% after HP. First-order degradation kinetics for Vit. C and anthocyanin (cyanidin-3-glucoside) during storage. The cyanidin-3-glucoside concentration was greater in HP than untreated juice	Torres and others (2011)
	500 to 800 MPa/25 to 50 °C/1 min	No significant changes in Vit. C after HP. Losses lower than 20% during storage	Nienaber and Shellhammer (2001)
	500 to 600 MPa/35 to 40 °C/4 to 5 min	Vit. C degradation rates lower than pasteurized juice immediately after HP and during subsequent storage. Lower TAC loss of HP samples during storage	Polydera and others (2003; 2005a; 2005b)
	100 to 800 MPa/30 to 100 °C/0 to 90 min	Pressure induced thermal degradation of folic acid. TAC decreased as a function of treatment time	Indrawati and others (2004)
	50 to 350 MPa/30 to 60 °C/2.5 to 15 min, 30 d storage at 4 °C	20 to 43% increase in TC at 350 MPa. Better preservation in TC during storage than fresh juice. TAC decreased during storage	De Ancos and others (2002)
Citrus juices Orange–lemon– carrot juice	200 to 500 MPa/30 °C/1 min	No changes in Vit. C, and vitamins B ₁ , B ₂ , B ₆ , and niacin after HP	Dorsi and others (1996)
	500 to 800 MPa/room temperature/5 min, 21 d storage at 4 °C	No significant changes in vitamin C, carotene content, and antioxidant capacity during storage	Fernández-García and others (2001a)
Orange juice mixed with milk	100 to 400 MPa/20 to 42 °C/2 to 9 min	Vit. C losses lower than 9% and significant increase when pressure time increased. TPC increased after HP and TAC was higher in pressurized samples	Barba and others (2011a)
Vegetable beverage	100 to 400 MPa/20 to 42 °C/2 to 9 min	Vit. C losses lower than 9% and 16 to 48% losses in TC after HP. TPC remained stable. TAC decreased as treatment pressure increased	Barba and others (2010)
Blueberry juice	200 to 600 MPa/20 to 42 °C/5 to 15 min	Vit. C losses lower than 8%. Increase in TPC after 200 MPa during 5 to 15 min and 400 MPa during 15 min. TAC decreased when 400 MPa/15 min and 600 MPa/5 to 15 min were applied	Barba and others (2011b)
Vegetable soup 'gazpacho'	150 to 350 MPa/60 °C/15 min, 40 d storage at 4 °C	Decrease in carotene concentration as treatment pressure increased. Decrease (40 to 46%) in total carotenoid concentration after storage and TAC decreased as treatment pressure increased	Plaza and others (2006b)
Tomato juice	250 MPa/35 °C/15 min, 30 d storage at 4 °C and 25 °C	Vit. C losses lower than 30% and TAC loss of 10% after storage at 4 °C	Dede and others (2007)
	200 MPa at 4 and 25 °C	Pressure treatments at and below 200 MPa at 4 and 25 °C maintained the extractable TC and lycopene and TAC	Hsu and others (2008)
Carrot juice	250 MPa/35 °C/15 min, 30 d storage at 4 °C and 25 °C	Vit. C losses of 55% after storage at 25 °C and TAC loss of 10% after storage at 4 °C	Dede and others (2007)
	100 to 800 MPa/30 to 100 °C/0 to 90 min	5-Methyltetrahydrofolic acid is rather unstable at pressures exceeding 500 MPa/60 °C	Indrawati and others (2004)
	600 MPa/75 °C/40 min	Small losses of carotenes after HP	Tauscher (1998)

Tabella 5 - Effetti delle HP sui composti bioattivi e sull'attività antiossidante di alcuni succhi di frutta e verdura (Barba et al., 2012)

Oltre agli effetti delle HPH sulle caratteristiche fisiche del succo e sulle proprietà microbiologiche, in uno studio effettuato da Barba et al. (2012) è stato visto che utilizzando alte pressioni con valori prossimi ai 600 Mpa vi è un incremento della quantità totale di composti fenolici e della capacità antiossidante del succo di carota.

Anche l'imbrunimento enzimatico causato dagli enzimi è uno dei principali problemi per la produzione di succhi freschi, poiché contribuisce al deterioramento della qualità e del contenuto di composti biologicamente attivi come i polifenoli. Le alte pressioni di omogeneizzazione

possono essere utilizzati³ come approccio non termico per la conservazione del succo di carota NFC (Not From Concentrate, cioè succo di frutta non da concentrato) al fine di aumentarne la stabilità attraverso l'inattivazione enzimatica e microbica con relativamente pochi cambiamenti nella qualità sensoriale e nutrizionale (Stinco et al., 2019).

La tecnica di omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) è in grado di ridurre significativamente il microbiota del deterioramento nel succo di frutta. D'altra parte, i composti aromatici e gli oli essenziali possono avere un ruolo chiave nella stabilità microbica di questi prodotti (Lanciotti et al., 2012).

2.3.1 MECCANISMO D'AZIONE DELLE ALTE PRESSIONI DI OMOGENEIZZAZIONE

Diversi studi, come quello effettuato da Maresca et al. (2011), hanno valutato il potenziale dei trattamenti ad alta pressione di omogeneizzazione nell'inattivazione dei patogeni e nel deterioramento della microflora come alternativa ai trattamenti termici e per il prolungamento della shelf-life del succo di frutta, mantenendo inalterate le proprietà fisico-chimiche del succo fresco.

Secondo Patrignani e Lanciotti (2016), l'efficacia dell'HPH per l'inattivazione microbica è influenzata da diversi parametri come ad esempio i fattori di processo, i fattori microbiologici-fisiologici del prodotto considerato e gli aspetti relativi alle caratteristiche del fluido trattato.

Il termine omogeneizzazione si riferisce alla capacità di produrre una dispersione omogenea delle particelle sospese in un liquido, infatti viene forzato il passaggio del liquido, sotto l'effetto della pressione, attraverso una valvola omogeneizzatrice appositamente progettata (Zamora & Guamis, 2014).

Da un punto di vista tecnologico, un omogeneizzatore è costituito principalmente da una pompa e una valvola di omogeneizzazione (Figura 5). La pompa viene utilizzata per forzare il passaggio del fluido attraverso un piccolo orifizio che si trova nella valvola ed è qui che si verifica l'omogeneizzazione. La pressione di esercizio viene controllata.

Tra i parametri di processo, il livello di pressione applicata e la temperatura raggiunta nella matrice alimentare durante il processo sono le variabili che sono in grado di avere un effetto sui componenti degli alimenti e sulle cellule microbiche eventualmente presenti. L'inattivazione microbica causata dall'applicazione delle HPH, sebbene influenzata da numerosi fattori e principalmente dalle caratteristiche chimico-fisiche della matrice alimentare e dalla sensibilità di

diversi microrganismi, aumenta con il livello di pressione. Gli effetti indotti dalla temperatura devono essere necessariamente presi in considerazione poiché, durante l'omogeneizzazione, si osserva un aumento della temperatura (circa $2,5 \text{ }^\circ \text{C}$ per 10 Mpa). Tuttavia, tale aumento di temperatura, nei campioni di alimenti trattati con HPH, non comporta gli stessi effetti negativi tipici del trattamento termico, probabilmente perché la durata del trattamento è particolarmente breve (Patrignani & Lanciotti, 2016).



Figura 5 - Omogeneizzatore, modello GEA Niro Soavi (Patrignani & Lanciotti, 2016)

Secondo Patrignani e Lanciotti (2016), la prima applicazione dell'omogeneizzazione per la stabilizzazione di un'emulsione alimentare di tipo caseario fu presentata alla Fiera mondiale di Parigi del 1900, dove Auguste Gaulin presentò un'invenzione per miscelare il latte usando pressioni fino a 30 MPa. Da allora l'omogeneizzazione convenzionale ha esteso l'intervallo di pressione fino a 200 MPa. Il metodo delle HPH è stato spesso messo in evidenza per il suo potenziale di pastorizzazione a freddo per alimenti. Il moderno omogeneizzatore ad alta pressione consente pressioni 10-15 volte superiori a quelle tradizionali e copre intervalli di pressione compresi tra 300 e 400 MPa. Questi ultimi intervalli sono stati definiti Ultra High Pressure Homogenization UHPH, che hanno portato anche a nuove opportunità di sterilizzazione, tra cui anche l'inattivazione microbica.

La temperatura di ingresso dei prodotti pompati all'interno dell'omogeneizzatore e il livello di pressione, che determinano entrambi la temperatura raggiunta durante il trattamento, sono considerati come i principali fattori che determinano l'efficacia dell'inattivazione microbica. Questo trattamento garantisce la distruzione dei microrganismi e ha un'influenza positiva sulla stabilità degli alimenti, non alterando il valore nutrizionale e le caratteristiche sensoriali dei fluidi trasformati. Inoltre, questa tecnologia consente una riduzione della dimensione delle particelle più efficiente rispetto alla classica omogeneizzazione (Figura 6) e il suo effetto è il risultato di diversi meccanismi come ad esempio: l'improvvisa caduta di pressione, la torsione e le sollecitazioni di taglio, la turbolenza, i fenomeni di cavitazione, le onde d'urto e l'aumento della temperatura di

brevissima durata, con una concomitante riduzione di carico microbico e conseguenze interessanti sulle proprietà emulsionanti.

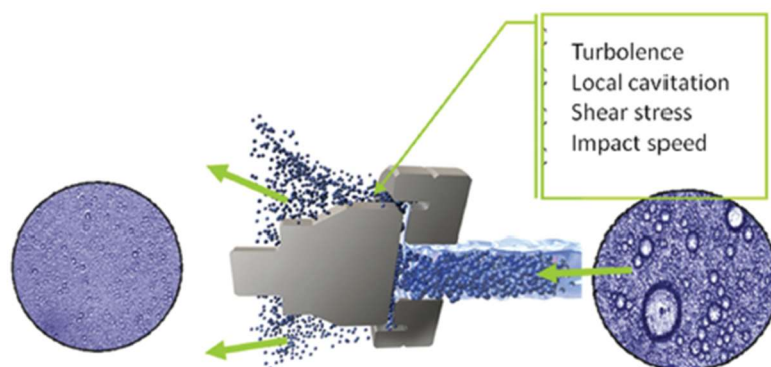


Figura 6 - Meccanismo d'azione dell'HPH (Patrignani & Lanciotti, 2016)

Il significativo miglioramento della funzionalità e flessibilità delle apparecchiature HPH e gli importanti sforzi di ricerca, hanno reso la tecnologia HPH pronta per l'utilizzo a livello industriale per lo sviluppo di nuovi prodotti diversi da quelli tradizionali per quanto riguarda le caratteristiche sensoriali, strutturali e le proprietà funzionali (Patrignani & Lanciotti, 2016).

2.3.2 EFFETTI DELLE HPH SUI MICRORGANISMI PATOGENI E DEGRADATIVI DI SUCCHI E BEVANDE

Gli effetti delle alte pressioni di omogeneizzazione, come già anticipato, sono molteplici. In particolare la nostra attenzione si è posta sull'allungamento della conservabilità del succo vegetale e sulla riduzione dello spoilage microbico e l'inattivazione di microrganismi patogeni.

Secondo Zamora & Guamis (2014), la procedura di stabilizzazione di succhi di frutta e bevande vegetali mediante HPH, determina i seguenti effetti:

- l'allungamento della shelf-life degli alimenti;
- la riduzione dello spoilage microbico;
- l'inattivazione dei microrganismi patogeni;
- la stabilizzazione microbica del prodotto senza l'uso di additivi;
- l'inattivazione degli enzimi responsabili della separazione di fase del succo di frutta o verdura;
- il mantenimento della stabilità del colore, del sapore e degli aromi originali del succo, nonché la protezione delle caratteristiche nutrizionali;

- la stabilità delle proprietà del succo per un lungo periodo di tempo.

Per quanto riguarda le caratteristiche fisiche delle bevande trattate, così come hanno definito Lanciotti et al. (2012), l'utilizzo delle alte pressioni ne provoca una modifica. Infatti l'essere sottoposto ad un'improvvisa caduta di pressione causa la modifica della dimensione media delle particelle solide sospese e della viscosità, pur mantenendo inalterate le caratteristiche sensoriali (sapore, colore, aroma).

Considerando invece l'effetto che le alte pressioni hanno sui microrganismi presenti nel succo, si è visto in vari studi (Patrignani & Lanciotti, 2016), che esse permettono di destabilizzare le membrane microbiche esterne dei batteri Gram-negativi e di modificare la struttura chimica degli enzimi presenti.

Le ricerche riguardo l'inattivazione microbica raggiunta attraverso l'impiego delle alte pressioni di omogeneizzazione sono state effettuate sia in sistemi modello che in alimenti reali come ad esempio il latte, il gelato e i succhi di frutta (Guerzoni et al., 1999; Thiebaud et al., 2003; Patrignani et al., 2009).

Dai diversi autori citati sopra sono state trovate molte differenze sulla modalità di disattivazione microbica e una spiegazione plausibile di ciò può essere data dal fatto che bisogna tener conto dei diversi mezzi colturali utilizzati, delle differenti condizioni operative e dei diversi modelli di omogeneizzatore.

In generale, i parametri che influenzano l'inattivazione microbica possono essere divisi in tre gruppi:

1. parametri di processo: infatti la sensibilità dei microrganismi alle alte pressioni di omogeneizzazione dipende dalle condizioni del substrato in cui essi si trovano, come temperatura, pH e attività dell'acqua;
2. parametri fisiologici dei microrganismi,
3. parametri collegati alle caratteristiche del fluido.

Detto ciò, il tipo di microrganismo e la fase di crescita in cui esso si trova sono i principali parametri fisiologici da prendere in considerazione.

Per quanto riguarda il tipo di microrganismo, l'elemento che determina la resistenza cellulare è la parete, ovvero la struttura che circonda la membrana cellulare. Essa svolge due importanti funzioni: strutturale, in quanto è necessaria per il mantenimento della caratteristica forma batterica, e protettiva nei confronti dello scoppio della cellula quando le differenze tra la pressione osmotica all'interno e all'esterno della cellula superano la forza tensile della membrana cellulare.

La forza della cellula dipende dallo spessore del peptidoglicano e dal numero di legami crociati presenti tra catene di polisaccaridi adiacenti (Middelberg et al., 1992) e in ciò la parete dei Gram negativi differisce notevolmente da quella dei Gram positivi. Questi ultimi hanno la parete più spessa (circa 40 strati) e ciò determina una maggiore resistenza strutturale alla rottura meccanica. Proprio per questi motivi i batteri Gram negativi risultano più sensibili alle alte pressioni di omogeneizzazione.

Invece per quanto riguarda la fase di crescita del microorganismo, è noto che la crescita cellulare in fase esponenziale è maggiore rispetto a quella in fase stazionaria, questo perché vi è un ridotto numero di nutrienti essenziali ed una concentrazione maggiore di sostanze tossiche prodotte dalle cellule stesse. Quindi bisogna agire proprio nella fase di crescita stazionaria perché le cellule risultano più sensibili alla rottura meccanica (Kelemen & Sharpe, 1979).

L'effetto letale della tecnologia HPH, quando applicata a livelli compresi tra 60 e 200 MPa, è stato valutato nei confronti di diversi patogeni come *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, numerosi sierotipi di *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e microrganismi degradativi come *Bacillus subtilis* e lieviti (Guerzoni et al., 1999; Patrignani et al. 2009) deliberatamente inoculati in latte, uova, creme a base di latte. A seconda delle condizioni adottate, sono state ottenute riduzioni del carico cellulare di questi patogeni e dei degradativi compresi tra 3 e 5 log UFC/g o mL.

Inoltre, le principali cause di morte dei microrganismi sono attribuibili ai danni irreversibili nei confronti delle membrane esterne dei batteri Gram negativi e delle pareti e membrane citoplasmatiche dei batteri Gram positivi e dei lieviti. A ciò, si aggiunge anche l'inattivazione o denaturazione di proteine ed enzimi di membrana che presiedono al trasporto di nutrienti e all'attività metabolica.

Bisogna però tener conto del fatto che l'omogeneizzazione provoca una minore disattivazione di enterococchi, lieviti e batteri lattici omo ed eterofermentanti, che invece sembrano essere favoriti dal trattamento (Lanciotti et al., 2007).

2.3.3 APPLICAZIONI DELLE HPH

Secondo gli studi di Donsì et al. (2006), l'omogeneizzazione è stata ampiamente utilizzata soprattutto dall'industria lattiero-casearia ed in generale nell'industria alimentare (ad esempio: emulsioni alimentari, alimenti a base di uova, succhi di frutta).

Di seguito vi sono alcuni esempi delle più conosciute applicazioni delle alte pressioni di omogeneizzazione effettuate negli anni:

- Applicazione per prolungare la shelf-life di prodotti alimentari (Popper, et al., 1990);
- Effetto delle alte pressioni di omogeneizzazione sulle caratteristiche microbiologiche e chimico-fisiche del formaggio di capra (Guerzoni et al., 1999);
- Effetto sulla sicurezza e proprietà strutturali di formulati a base di uova (Vannini, et al., 2002);
- Modificazione della struttura di alimenti quali creme, gelati, yogurt, emulsioni (Schultz, et al., 2004);
- Effetto delle alte pressioni di omogeneizzazione del latte sulla resa del formaggio e microbiologia, lipolisi e proteolisi durante la maturazione del formaggio caciotta (Lanciotti et al., 2005)
- Stabilizzare le emulsioni alimentari e distruggere i globuli lipidici (Donsì et al., 2006).
- Effetto sulla distribuzione dei globuli di grasso e inattivazione microbiologica su latte (Thiebaud, et al., 2003);
- Effetto delle alte pressioni di omogeneizzazione sull'inattivazione di *Saccharomyces cerevisiae* e sulle caratteristiche fisico-chimiche nei succhi di albicocca e carota (Patrignani et al., 2009);
- Inattivazione di microorganismi presenti nei succhi di frutta, al fine di incrementarne la stabilità (Patrignani et al., 2015; Maresca et al., 2011).

Da come si è potuto notare, i dati della letteratura hanno sottolineato un miglioramento delle proprietà sensoriali e nutrizionali, e della stabilità dei prodotti trattati con le HPH. La sostituzione del trattamento termico tradizionale può rappresentare un vantaggio per l'industria poiché è una tecnologia a freddo quindi non impatta negativamente sul prodotto, inoltre ha un impatto inferiore sull'ambiente, più sostenibile, si risparmia energia, tempo e costi aggiuntivi.

3. BATTERI LATTICI E FERMENTAZIONE

3.1 DESCRIZIONE GENERALE

Il concetto di batteri lattici (LAB) come un gruppo di microrganismi, fu sviluppato all'inizio del 1900, preceduto da ricerche scientifiche durante l'ultima parte del XIX secolo. Le interazioni dei LAB con gli alimenti hanno destato l'attenzione degli scienziati, in particolare di Pasteur che si soffermò sulla fermentazione lattica nel 1857, dopodiché fece il primo isolamento di una coltura batterica pura di *Bacterium lactis* nel 1873.

Uso di colture starter per la produzione di formaggio e prodotti lattiero-caseari nacque nel 1890. Ciò ha aperto la strada all'industrializzazione degli alimenti fermentati; inoltre i LAB sono generalmente coinvolti in un gran numero di fermentazioni spontanee di alimenti (Stiles & Holzapfel, 1997).

Nel 1920, grazie agli studi di Orla Jensen, i batteri lattici sono stati raggruppati sulla base della loro morfologia, temperatura ottimale di sviluppo e prodotti principali di fermentazione.

I LAB in generale sono:

- Gram-positivi, immobili, asporigeni, catalasi-negativi, perossidasi-positivi
- di forma bacillare o coccica
- anaerobi facoltativi (in alcuni casi microaerofili)
- metabolismo fermentativo tramite cui producono acido lattico a partire dal glucosio
- hanno esigenze nutritive complesse, in particolare nei riguardi di fattori di crescita come aminoacidi e vitamine
- acido-tolleranti, talvolta acidofili
- il DNA ha un contenuto di G + C inferiore al 55%
- sviluppano in un range di temperatura ampio da 2 a 55°C, con optimum da 20 a 30°C (specie mesofile) o da 37 a 45°C (specie termofile)
- mancano di citocromi e non sono in grado di sintetizzare le porfirine
- formano colonie piccole e incolori
- non patogeni, non tossigeni, considerati GRAS (sicuri dal punto di vista alimentare) e QPS (con qualificata presunzione di sicurezza).

I batteri lattici (LAB) sono considerati i batteri più importanti riguardanti la fermentazione degli alimenti. I ceppi più comunemente usati negli alimenti appartengono a diversi generi e specie,

compresi i generi di *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* e *Bifidobacterium*.

I vari ceppi vengono continuamente aggiornati e riclassificati in base alla loro tassonomia e sulla descrizione delle caratteristiche fisiologiche e biochimiche (Liu et al., 2014).

Il ruolo dei batteri lattici nel settore alimentare è in generale pro-tecnologico. Sebbene in alcuni casi possono risultare alterativi come ad esempio in vino e birra, ed in particolari casi possono essere produttori di amine biogene a partire da diversi aminoacidi, essi sono largamente impiegati come colture starter nei prodotti fermentati grazie alle loro molteplici attività positive, ovvero:

- acidificazione,
- attività proteolitica,
- produzione di aromi,
- produzione di sostanze antimicrobiche (batteriocine),
- attività probiotica.

3.2 CLASSIFICAZIONE DEI BATTERI LATTICI

I batteri lattici, come anche König e Fröhlich (2017) hanno definito, sono caratterizzati dalla produzione di acido lattico come principale prodotto finale catabolico a partire dal glucosio.

Riguardo alla fermentazione i LAB si distinguono in tre diversi gruppi sulla base delle capacità fermentative:

I GRUPPO: Omofermentanti obbligati: attraverso la via di Embden-Meyerhof-Parnas degradano il glucosio via glicolisi e non sono in grado di utilizzare i pentosi. Il piruvato viene poi ridotto ad acido lattico, unico prodotto della fermentazione. La sequenza metabolica porta alla produzione di due molecole di acido lattico e due molecole di ATP a partire da una molecola di glucosio. Di questo gruppo fanno parte alcuni ceppi di *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* e *Pediococcus*.

II GRUPPO: Eterofermentanti facoltativi: in presenza di esosi i microrganismi, appartenenti al genere *Leuconostoc*, *Oenococcus* e *Weissella* ad alcuni Lattobacilli, fermentano attraverso la via degli esosomonofosfati con produzione equimolare di acido lattico, CO₂ ed etanolo, oppure possono seguire la normale glicolisi comportandosi perciò

come omofermentanti. In presenza di pentosi, effettuano l'ossidazione di tali composti attraverso la via dei pentoso fosfati, senza produzione di CO₂, portando però ad una minor produzione energetica.

III GRUPPO: Eterofermentanti obbligati: non possono degradare il glucosio via glicolisi in quanto non possiedono l'enzima fruttosio 1,6 difosfato aldolasi che catalizza la scissione del fruttosio 1,6 difosfato in gliceraldeide-3-fosfato e diidrossi-acetone-fosfato. Per tale ragione essi fermentano il glucosio attraverso la via dei pentoso fosfati, ottenendo tre prodotti finali in rapporto equimolare: acido lattico, etanolo e CO₂. Possono utilizzare anche i pentosi, nel qual caso senza produzione di CO₂. Sono in grado di produrre anche piccole quantità di acido acetico.

In Tabella 6 è possibile vedere le diverse caratteristiche dei batteri lattici, in particolare quelle legate alla produzione dei due diversi isomeri di acido lattico in relazione al loro diverso metabolismo.

Le due forme isomeriche sono l'acido-L-lattico, l'acido-D-lattico e l'acido-DL-lattico, prodotti in base al diverso genere.

Genus	Morphology from Glc	Carbohydrate fermentation ^a	Lactic acid isomer
<i>Lactobacillus</i>	Rods, coccobacilli cells single or in chains	homo- or heterofermentative, facultatively heterofermentative	D, L, DL
<i>Leuconostoc</i> ^b	Spherical or lenticular cells in pairs or chains	heterofermentative	D
<i>Oenococcus</i> ^b	Spherical or lenticular cells in pairs or chains	heterofermentative	D
<i>Pediococcus</i>	Spherical cells, pairs or tetrads	homofermentative or facultatively heterofermentative ^c	DL, L
<i>Weissella</i>	Spherical, lenticular, irregular cells	heterofermentative	D, DL

Tabella 6 - Differenti caratteristiche fermentative dei LAB (Konig & Frohlic, 2017)

3.2.1 IL GENERE *Lactococcus*

Come già anticipato, i batteri lattici (LAB) in generale sono definiti come un gruppo di microrganismi Gram-positivi che fermentano zuccheri esosi per produrre principalmente acido lattico. In particolare, il genere *Lactococcus lactis* produce solo acido L - (+) - lattico, enantiomero

prodotto dal glucosio. Questo carattere omofermentativo può essere modificato regolando le condizioni di coltura come pH, concentrazione di glucosio e limitazione dei nutrienti.

Il genere *Lactococcus* è uno dei numerosi cambiamenti nella tassonomia del genere *Streptococcus* accaduti negli ultimi anni. Attualmente, il genere *Lactococcus* appartiene alla famiglia delle Streptococcaceae e vengono riconosciute sette specie di *Lactococcus*, tra cui *Lc. Lactis*, che è l'unica specie del genere utilizzata nelle tecnologie alimentari ed è ulteriormente suddivisa in quattro sottospecie. Di queste quattro, sono tre i diversi fenotipi utilizzati a livello industriale, tra cui *Lc. lactis* subsp. *lactis* e *Lc. lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* che sono comunemente isolati dal materiale vegetale, mentre *Lc. lactis* subsp. *cremoris* è ancora oggetto di studio.

Essi sono caratterizzati da cellule di forma coccica che si presentano individualmente, in coppie o in catene (Figura 7). Quando le cellule di lattococchi formano catene, possono essere difficili da differenziare dai lattobacilli.

Molti di loro sono particolarmente esigenti dal punto di vista nutrizionale e prediligono fattori utili per la crescita come ad esempio proteine, zuccheri, metabolismo del lattosio, metabolismo dei citrati e produzione di batteriocine. (Kim, 2014).



Figura 7 - *Lactococcus lactis*

Questi batteri mesofili, nel settore lattiero-caseario, sono in grado di prendere il sopravvento sulle altre colture ubiquitarie già dopo poche ore.

Successivamente, partendo dalla flora microbica appena stabilita, si avrà una diminuzione del numero di colture microbiche con una conseguente instaurazione di alcuni specifici ceppi di *Lactococcus*, grazie anche alla azione combinata tra produzione di batteriocine e di acidi organici.

Da alcuni studi è emerso che isolando ceppi presenti all'interno della matrice, esiste una maggiore variabilità tra ceppo e ceppo da un punto di vista fenotipico rispetto all'impiego di colture starter.

I lattococchi sono generalmente caratterizzati da una capacità di idrolizzare l'arginina,

metabolizzare gli zuccheri, avere un ottimo di temperatura attorno ai 40 °C e di essere in grado di crescere a queste condizioni (Salama et al., 1991).

I test standard per la caratterizzazione fenotipica possono dare risultati ambigui sui lattococchi, specialmente per quelli isolati dalle matrici naturali.

Questa forte eterogeneità può essere però vista come un dato positivo poiché è proprio grazie alla presenza di batteri lattici non starter (NSLAB), dotati di specifiche caratteristiche metaboliche, che alcuni prodotti ottengono il loro caratteristico flavour (Beresford et al., 2001).

Inoltre, le culture pure isolate da un ecosistema complesso, esprimono una attività metabolica fortemente diversa da un ceppo simile ma non isolato da una matrice complessa (Klijn et al., 2005).

Questa differenza risulta interessante il ceppo non solo da un punto di vista metabolico, ma grazie al suo adattamento al substrato di crescita porta alla manifestazione genetica di diverse tipologie di metaboliti antimicrobici, tra cui le batteriocine, un altrettanto eterogeneo gruppo di molecole con attività inibitoria nei confronti dei microrganismi concorrenti, che verranno perciò prodotte nella forma e nella tipologia che risulterà essere maggiormente attiva nei confronti dei competitor presenti all'interno di quella specifica matrice (Hugas et al., 1995).

3.3 PRODUZIONE DI BATTERIOCINE

Il legame tra fermentazione e conservazione è la bio-preservazione che si riferisce all'estensione della shelf-life e al miglioramento della sicurezza degli alimenti mediante l'uso di microrganismi e dei loro metaboliti. A questo proposito, si è visto come i batteri lattici starter possono produrre una vasta gamma di acidi organici con effetti positivi sulla conservabilità, ma non è da sottovalutare anche la produzione di una vasta gamma di composti antimicrobici come le batteriocine, sostanze proteiche che possono inibire o ridurre la microflora indesiderata nei prodotti alimentari.

La conservazione di alimenti e bevande derivanti dalla fermentazione è stata una forma efficace per prolungare la shelf-life degli alimenti per millenni. Tradizionalmente, i cibi venivano conservati attraverso fermentazioni naturali, tuttavia, la moderna produzione su larga scala ora generalmente sfrutta l'uso di starter per garantire coerenza e qualità nel prodotto finale.

Questi ceppi che vengono utilizzati possono anche produrre una vasta gamma di sostanze ad attività antimicrobica, alcune delle quali hanno attività contro i patogeni alimentari come *Listeria monocytogenes* e *Clostridium botulinum* (Ross et al., 2002).

Tali sostanze antimicrobiche, definite convenzionalmente batteriocine, sono state osservate per la prima volta da Rogers e Whittier (1928) in Inghilterra quando scoprirono che alcuni ceppi di lattococchi avevano un effetto inibitorio sulla crescita di altri LAB.

Esse consistono in sostanze di natura proteica con attività inibitoria e antibatterica, che costituiscono un sottogruppo eterologo di peptidi sintetizzati ribosomicamente e di cui successivamente si spiegherà il meccanismo d'azione. Questi inibitori generalmente agiscono attraverso la depolarizzazione della membrana cellulare bersaglio o attraverso l'inibizione della sintesi della parete cellulare.

In alcuni studi di Ross et al. (2002) è stato visto che quasi tutte le diverse specie che compongono il gruppo dei LAB producono queste proteine inibenti, ed è stato anche definito che l'uso di ceppi produttori di nisina, la batteriocina più importante ed utilizzata a livello alimentare, ha migliorato alcune fermentazioni vegetali.

Questo bio-preservante (nisina) è stato anche aggiunto all'elenco europeo degli additivi alimentari e dove gli è stato assegnato il numero E234.

A seconda dell'organismo produttore e della loro composizione aminoacidica, le batteriocine sono classificate in quattro classi principali (I – IV), di cui le classi I e II sono le più accuratamente studiate.

Le 4 classi di batteriocine sono:

- **Classe I:** famiglia dei lantibiotici, ovvero piccoli peptidi a membrana attiva che contengono aminoacidi come la lantionina, o β -metil lantionina, e residui disidratati; la più conosciuta è la Nisina.

Possono essere distinti in 3 sottogruppi in base alla differenza della struttura e della modalità d'azione:

1. tipo A: può formare pori sulla membrana citoplasmatica dei batteri;
 2. tipo B: svolge il suo ruolo principalmente distruggendo la funzionalità degli enzimi;
 3. tipo C: contiene due catene polipeptidiche che svolgono un ruolo antibatterico sinergico.
- **Classe II:** piccoli peptidi non modificati, termolabili, spesso con attività enzimatica; a membrana non attiva e caratterizzati dalla presenza di un sito di elaborazione Glicina-Glicina; questa classe è suddivisa in 3 sottogruppi:
 1. Sottoclasse IIa: Pediocina ed enterocina
 2. Sottoclasse IIb: Lactocina G

3. Sottoclasse IIc: Lactocina B

- **Classe III:** grandi proteine termolabili, con attività enzimatica;
- **Classe IV:** proteine complesse, composte da una o più frazioni chimiche lipidi o carboidrati.

La nisina, è certamente la più nota batteriocina di classe I, è un piccolo peptide lantibiotico che comprendente 34 amminoacidi, la presenza di tre residui disidratati e cinque anelli tioetere, prodotto da diversi ceppi di *Lc. lactis* subsp. *lactis*. La regione N-terminale contenente due anelli tioetere presente in questa batteriocina svolge un ruolo essenziale legandosi a lipide II, la molecola di attracco necessaria per farle esercitare la sua attività.

Essa forma pori nelle membrane dei batteri Gram-positivi, mediando l'afflusso di ioni, aminoacidi e ATP dalle cellule.

È stata riconosciuta come conservante alimentare dalla Food and Agriculture Organization (FAO) e dalla World Health Organization (WHO) nel 1969, inoltre la Food and Drug Administration (FDA) degli Stati Uniti ha approvato il suo uso come additivo nei prodotti in scatola per inibire la crescita di *Clostridium botulinum* nel 1988. È concesso l'uso di nisina come conservante alimentare in oltre 45 paesi.

3.3.1 MECCANISMO D'AZIONE DELLA NISINA

Per quanto riguarda il meccanismo di azione della nisina, è stato studiato che il bersaglio specifico di questa batteriocina e di tutte quelle appartenenti alla Classe I è il cosiddetto lipide II, ovvero il lipide presente nella membrana cellulare.

Molti studi condotti da Hechard e Sahl (2002) hanno definito il ruolo inibitorio della nisina nella biosintesi della parete cellulare che potrebbe quindi essere attribuita all'interazione del lantibiotico con i precursori della membrana cellulare lipide I e lipide II.

Tuttavia, le indagini riguardanti la crescita dei batteri insieme alla presenza di nisina hanno mostrato chiaramente che la grande maggioranza delle cellule batteriche è stata disattivata rapidamente insieme a una depolarizzazione istantanea della membrana citoplasmatica, perdita di materiale cellulare e arresto completo dei processi biosintetici.

In Figura 8 è possibile vedere il meccanismo d'azione della nisina che utilizza il lipide II principalmente come molecola di attracco per la formazione di pori sulla membrana citoplasmatica del batterio bersaglio. Allo stesso tempo, la biosintesi della parete cellulare viene inibita tramite l'arresto del precursore di membrana.

La nisina e le relative batteriocine inibiscono i batteri in un intervallo di concentrazione nanomolare.

È stato osservato un numero finito di siti di legame e una specifica attività antagonista della nisina da parte del suo frammento N-terminale inattivo, indicando che quel frammento specifico viene bloccato da un sito di legame definito. Agendo in questo modo essa inibisce la biosintesi di peptidoglicano nella membrana citoplasmatica e si lega al precursore del peptidoglicano ovvero il cosiddetto lipide II. Da questi studi è stato visto che il lipide II è coinvolto nella formazione dei pori sulla membrana cellulare dei batteri, proprio perché funge da sito di attacco per il legame specifico della parte N-terminale della nisina con la membrana cellulare.

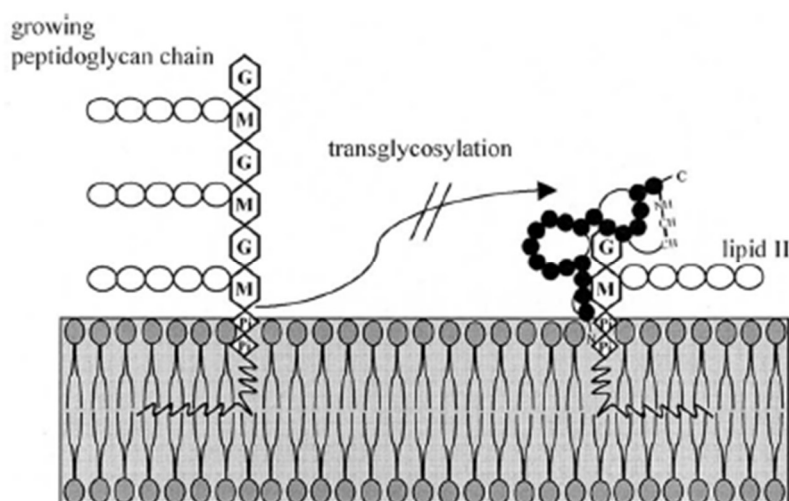


Figura 8 - Rappresentazione schematica della modalità d'azione della nisina (Hechard & Sahl, 2002)

L'interazione tra il frammento N-terminale della nisina e il Lipide II di membrana è definita a doppio anello, e si presume che tutti i lantibiotici agiscano nello stesso modo della nisina cioè attaccandosi al lipide e inibendo la sintesi di peptidoglicano (Hechard & Sahl, 2002).

Dagli studi di Yoneyama et al. (2008) si è visto che la nisina:

- forma pori nella membrana cellulare di batteri gram-positivi, principalmente sporigeni, questo perché la parete cellulare dei batteri gram-positivi è spessa e la sua composizione è relativamente semplice;

- è inefficace verso i funghi e i batteri Gram-negativi, perché la parete cellulare dei batteri gram-negativi è complessa e compatta, consente il passaggio solo di molecole con massa molecolare relativa inferiore a 600 Da.

Inoltre, per risultare attiva contro i microrganismi, la nisina deve essere presente in minima concentrazione inibente (MIC). Le MIC sono state definite come le concentrazioni più basse di nisina in cui non è stata osservata alcuna crescita microbica.

Infine, il gene che codifica per la produzione e l'attività delle batteriocine è solitamente associato a un gene che codifica per la cosiddetta proteina dell'immunità (Hechard & Sahl, 2002).

3.4 UTILIZZO DELLA FERMENTAZIONE DA PARTE DEI BATTERI LATTICI NEL SETTORE DELLE BEVANDE

La lunga conservazione dei succhi di verdura freschi, risulta difficile da ottenere a causa della loro bassa acidità e dell'alta concentrazione di microrganismi che ne causano il deterioramento. Proprio per questo motivo, questa tipologia di prodotti può essere sottoposta volutamente a fermentazione in modo tale da aumentarne la shelf-life, grazie alla produzione di acidi organici dovuta al metabolismo dei batteri lattici.

La produzione moderna e su larga scala di cibi e bevande fermentati dipende quasi interamente dall'uso di colture starter ben definite che hanno sostituito le colture naturali tradizionalmente utilizzate per la produzione di questi prodotti. La moderna trasformazione degli alimenti dipende da una serie di tecnologie di conservazione atte a garantire che essi siano mantenuti ad un livello accettabile di qualità dal momento della produzione fino al momento del consumo. Una delle più antiche di queste tecnologie è appunto la fermentazione, un processo che dipende dall'attività biologica dei microrganismi e che produce una vasta gamma di metaboliti che può sopprimere la crescita e la sopravvivenza della microflora indesiderata nei prodotti alimentari.

Infatti secondo Ross et al. (2002) il processo di fermentazione comporta l'ossidazione dei carboidrati per generare una serie di prodotti che sono principalmente acidi organici, alcool e anidride carbonica. Tali prodotti hanno un effetto conservativo perché permettono la limitazione della crescita dei microrganismi responsabili del deterioramento e della flora patogena (Ross et al., 2002).

La produzione di succhi vegetali fermentati non può essere realizzata senza microrganismi e nella maggior parte dei casi vengono utilizzati i batteri lattici, in particolare ceppi commerciali appartenenti delle specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus xilosus*,

Lactobacillus brevis, *Lactobacillum reuteri*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium bifidum* (Karovicova & Kohajdova, 2003), che fungono da colture starter per effettuare la cosiddetta fermentazione lattica.

Possono essere distinte due diverse tipologie di fermentazione di bevande vegetali, in base ai microrganismi utilizzati:

- 1- **Fermentazione spontanea:** effettuata usando i batteri lattici tipicamente già presenti nella matrice vegetale;
- 2- **Fermentazione guidata:** effettuata usando una coltura di microrganismi starter, in questo specifico caso sono stati utilizzati LAB selezionati.

La fermentazione, così come Di Cagno et al. (2012) riportano, è considerata una biotecnologia semplice e preziosa per conservare e / o migliorare le proprietà di sicurezza igienico-sanitaria, proprietà nutrizionali, sensoriali e di conservazione di frutta e verdura.

Come mostrato nei dati della letteratura dell'ultimo decennio, la combinazione di questo antico metodo di bio-conservazione con gli attuali strumenti di biotecnologia ha portato alla definizione di processi di fermentazione controllati e alla selezione di colture starter per aumentare la conservabilità di prodotti a base di frutta e verdura.

La fermentazione può essere perseguita tramite l'uso di starter autoctoni, cioè isolati da una matrice e riutilizzati nella stessa, oppure alloctoni, cioè isolati da alcune matrici alimentari e riutilizzate per fermentarne altre.

I microrganismi starter responsabili della fermentazione guidata vengono utilizzati per produrre succhi di verdura con l'obiettivo di:

- favorire l'attività degli enzimi pectolitici che aumentano la resa del succo
- ridurre rapidamente il valore del pH soprattutto quando la matrice è scarsamente acida come nel caso di carote.

Con la fermentazione lattica, i prodotti che ne risultano hanno un gusto desiderabile e un pH basso. Allo stesso tempo, la conservazione del prodotto, e quindi la sua shelf-life, diventa molto più lunga. Le proprietà desiderabili dei succhi vegetali fermentati possono essere raggiunte scegliendo ceppi di LAB adatti alle singole materie prime.

I criteri utilizzati da Demir et al. (2006) per verificare l'idoneità di un ceppo adatto alla fermentazione sono i seguenti:

- velocità e produzione totale di acidi,
- variazione del pH,
- diminuzione della concentrazione di nitrati

- capacità di produrre amine biogene.

Nella Tabella seguente (Tabella 7) vengono definiti alcuni dei microrganismi appartenenti alla famiglia dei batteri lattici utilizzati nella bio-conservazione di alcuni alimenti. Nel caso di prodotti vegetali, il processo fermentativo può essere ottenuto tramite l'utilizzo dei generi *Enterococcus*, *Lactococcus* e *Lactobacillus*.

Biopreservation by lactic acid bacteria	
Product	Microorganisms
Wine, beer	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , LAB
Bread	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , LAB
Cheddar cheese	<i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> and <i>leuconostoc</i>
Swiss-type cheese	<i>Lactobacillus (delbruckii, bulgaricus, helveticus)</i>
Mould- and smear-ripened cheeses	<i>Carnobacterium piscicola</i> , <i>Brevibacterium linens</i>
Yogurts	<i>St. thermophilus</i> and <i>Lb. bulgaricus</i>
Kefir	Lactococchi, yeast, <i>Lb. kefir</i> (and others)
Fermented meats (< chicken)	Pediococchi, Staphylococchi, various LAB
Sauerkraut	<i>L. lactis</i> , <i>Leuc. mesent.</i> , <i>Lactobacillus (brevis, plantarum, curvatus, sake)</i>
Soy sauce	<i>Aspergillus oryzae/soyae</i> , lactobacilli and <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>
Vegetables	<i>Enterococcus (mundtii, faecium)</i> , <i>Lactococcus (cremoris, lactis)</i> , <i>Lactobacillus (plantarum, casei)</i>

Tabella 7 - Batteri lattici coinvolti nella fermentazione di prodotti alimentari (Ross et al., 2002)

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione degli acidi organici sul prolungamento della shelf-life del prodotto, Ross et al. (2002) ritengono che gli acidi prodotti con la fermentazione esercitino il loro effetto antimicrobico interferendo con il mantenimento del potenziale della membrana cellulare, inibendo il trasporto attivo, riducendo il pH intracellulare e inibendo funzioni metaboliche.

Essi hanno una modalità d'azione molto ampia e inibiscono sia i batteri Gram-positivi che i Gram-negativi, lieviti e muffe.

I fattori che influenzano la massima crescita specifica dei LAB nel processo di fermentazione di matrici vegetali secondo quanto detto da Demir et al. (2006), sono:

- la temperatura,
- il grado di esposizione all'aria,
- livello di zucchero fermentescibile,
- capacità tampone,
- pH,

- acidità,
- presenza di composti antimicrobici naturali
- quantità di acido lattico prodotta.

UTILIZZO DELLA FERMENTAZIONE DA PARTE DI LATTOCOCCHI NEL SETTORE DELLE BEVANDE

Negli ultimi anni interessanti risultati sono stati ottenuti con l'impiego di colture starter costituite da batteri lattici produttori di batteriocine che hanno permesso di ottenere fermentazioni vegetali più controllate e riproducibili (Omar et al., 2006). In particolare, ceppi appartenenti alla specie *Lactococcus lactis* produttori di nisina sono stati proposti come promettenti biopreservanti in diversi alimenti quali prodotti lattiero-caseari, carni e frutta e verdura di IV gamma (Ho et al., 2018; Siroli et al., 2016). La nisina è stata la prima batteriocina caratterizzata ed il cui utilizzo è regolato e consentito come conservante alimentare nell'Unione Europea in specifiche categorie di prodotti alimentari (Jones et al., 2005; Siroli et al., 2016). Infatti, la nisina, e in particolare la variante naturale Z, ha un'elevata solubilità e stabilità in diversi sistemi alimentari e un ampio spettro antimicrobico, essendo efficace in particolare contro i batteri Gram-positivi, tra cui *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp. e *Staphylococcus aureus*, sia in condizioni di laboratorio che in alimenti (Gharsallaoui et al., 2016; Yang et al., 2012) inclusi succhi e bevande a base vegetale (Settani & Corsetti, 2008; Zhao et al., 2013). I prodotti alimentari possono essere integrati con preparati di batteriocine (nisina, pediocina) ottenuti dalla coltivazione del ceppo produttore in un fermentatore industriale, seguito da un adeguato recupero. Sono comunemente usati tre approcci nell'applicazione di batteriocine (nisina e pediocina) per la bio-conservazione degli alimenti:

- Aggiunta di nisina purificata o semi-purificata come conservante alimentare.
- L'uso di un prodotto precedentemente fermentato con un ceppo produttore di nisina, come ingrediente di trasformazione alimentare.
- Semina dell'alimento con LAB produttori di nisina. La capacità dei LAB di crescere e produrre nisina nei prodotti è fondamentale per il buon funzionamento.

La nisina e in generale fermentazioni da parte di lattococchi produttori di nisina sono usati principalmente nei prodotti derivati dal latte, quali: formaggi, formaggi fusi, ricotta, yogurt, ma anche per la preparazione di creme, dessert preparati con del latte. È infine impiegata nei succhi di frutta, ketchup e maionese. È importante infine sottolineare come la nisina espleta la propria azione antimicrobica a pH acidi ed elevate concentrazioni saline, mentre viene inattivata già in condizioni di leggera basicità.

4. GLI OLI ESSENZIALI E LORO POSSIBILE IMPIEGO NELL'AMBITO DELLE HURDLE TECHNOLOGIES

4.1 GLI OLI ESSENZIALI

Siroli et al. (2018) definiscono gli oli essenziali (EO) come dei composti aromatici e volatili, estratti da piante intere o da materiale vegetale come fiori, radici, foglie, semi, buccia e frutta. Queste molecole sono prodotte dalle piante come metaboliti secondari a scopo di difesa nei confronti di condizioni ambientali avverse o attacchi parassitari, e di essi sono ben note le proprietà antimicrobiche. Vi è sempre stato un ampio uso di EO in molti ambiti, come ad esempio in medicina, profumeria e cosmetica, e grazie alle sperimentazioni degli ultimi anni vengono anche aggiunti agli alimenti sottoforma di spezie, erbe oppure oli.

Dato che vengono utilizzati nell'industria alimentare come agenti aromatizzanti da molti anni, sono stati definiti GRAS (generalmente riconosciuti come sicuri) e quindi sicuri dalla Food and Drug Administration (FDA, 2017) e dall'Autorità Europea per la sicurezza alimentare (EFSA, 2010).

Grazie alle proprietà antimicrobiche di alcuni EO, la loro applicazione come conservanti alimentari è molto promettente, in particolare in frutta e verdura minimamente trasformati, prodotti a base di carne, bevande e prodotti lattiero-caseari.

Gli EO e i loro componenti sono stati utilizzati in molte ricerche, come quella di Siroli et al. (2015a), con lo scopo di fungere da antimicrobici naturali alternativi per controllare la crescita di patogeni di origine alimentare e di batteri alterativi associati a prodotti alimentari come le verdure minimamente trasformate.

Questi oli essenziali vengono definiti additivi di origine naturale poiché non sono sintetizzati chimicamente. Essi consistono in miscele complesse di composti volatili con un forte impatto sensoriale e vengono prodotti naturalmente da piante sottoforma di metaboliti secondari.

Essi vengono estratti da varie piante aromatiche, generalmente situate in paesi temperati caldi come nel Mediterraneo e nelle zone tropicali, paesi in cui rappresentano una parte importante della medicina tradizionale. Le loro funzioni in natura possono essere diverse, ad esempio possono agire come messaggeri interni, oppure come sostanze utilizzate dalle piante per difendersi dall'attacco di erbivori o volatili (Patrignani et al, 2015).

Però l'uso limitato in campo alimentare degli EO è dovuto a motivi che sono ancora oggetto di studio, ovvero:

- la variabilità della composizione: dovuta all'origine geografica, alle tecniche agricole, alla stagione, ai metodi di estrazione, ecc. che sono in grado di influenzare la loro effettiva attività antimicrobica complessiva;

- l'interazione delle molecole bioattive con la matrice alimentare: in particolare con proteine, lipidi, amido, ecc., limitando così l'attività di queste molecole con le cellule microbiche, riducendo così gli effetti sulla vitalità cellulare;
- la mancanza di una completa conoscenza dei meccanismi attraverso i quali queste molecole esercitano la loro attività antimicrobica;
- la mancanza di conoscenza riguardo all'interazione tra i parametri tecnologici e di composizione, e la loro attività.

4.2 COMPOSIZIONE E CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE DEGLI OLI ESSENZIALI

Generalmente, gli EO contengono dai 20 ai 60 composti, tutti presenti in diverse concentrazioni (Siroli et al., 2018). Inoltre, secondo Ballester-Costa et al. (2013), questi composti sono: terpenoidi, sesquiterpeni e diterpeni, con diversi gruppi di idrocarburi alifatici, acidi, alcoli, aldeidi, esteri acilici o lattoni. Sono caratterizzati da 2-3 composti presenti ad alte concentrazioni, ma quasi sempre si possono trovare dei composti presenti in tracce. In generale, i composti presenti in concentrazioni maggiori determinano le proprietà biologiche degli oli essenziali (Bakkali et al., 2008).

Ogni tipologia di olio essenziale ha la sua specifica composizione chimica che varia sia in base alla specie vegetale da cui è stato estratto e dalle caratteristiche proprie della pianta. Dal momento che i componenti degli oli essenziali sono metaboliti secondari, la loro composizione chimica subisce una forte influenza dell'ambiente esterno, infatti ad esempio la composizione è principalmente influenzata dal clima e in particolare dalla stagionalità della pianta (Burt, 2004).

Tra le molecole che costituiscono gli oli essenziali, le più importanti sono i terpeni, i terpenoidi e i composti alifatici (Bowles, 2003). Tuttavia, i terpeni sono i principali costituenti chimici degli oli e sono molecole organiche rappresentate da idrocarburi. Tali terpeni vegetali non solo giocano un ruolo fondamentale nelle piante, ma sono anche impiegati come aromi, fragranze e medicinali. Oltre ad essi, tra i componenti degli oli essenziali vi sono anche i fenoli o altri idrocarburi ossigenati.

La tipologia e la quantità dei componenti di un olio essenziale ne determinano e ne caratterizzano le proprietà, inoltre la varietà e la ricchezza di quei composti contribuiscono alle peculiarità di ciascun di loro (Burt, 2004).

In alcuni oli essenziali può o predominare un solo costituente, oppure può esserci un equilibrio dei vari composti aromatici. Anche i componenti presenti in minime tracce possono influenzare in modo preponderante l'attività biologica dell'olio essenziale stesso.

Tra le caratteristiche chimiche più importanti degli EO vi sono l'idrofilia e la lipofilia delle molecole, in particolare riguardo ai fini dell'attività biologica dei composti organici volatili; la loro solubilità nei grassi consente alle sostanze volatili di solubilizzarsi nelle membrane citoplasmatiche.

Caratteristica di estrema importanza è anche la volatilità, cioè la tendenza delle molecole a passare dalla fase liquida alla fase di vapore.

Secondo Gardini et al. (2001), l'attività biologica delle sostanze aromatiche vegetali, che generalmente si esprime come inibizione o stimolazione di processi metabolici, è strettamente correlata alla loro volatilità, infatti all'aumentare della pressione di vapore delle molecole aromatiche si ha un aumento della loro attività antimicrobica, in quanto incrementa la loro solubilità nelle membrane cellulari.

4.3 ATTIVITÀ ANTIMICROBICA DEGLI OLI ESSENZIALI

Anche se inizialmente venivano utilizzati per migliorare l'aroma degli alimenti, molte sperimentazioni (Siroli et al., 2017; Patrignani et al., 2015), hanno definito che in sostanza gli EO hanno attività:

- Antimicrobica
- Antiossidante
- Aromatizzante
- Antitumorale
- Antifunginea
- Antivirale
- Immunomodulatoria
- Anti-trombina
- Anti-ipertensiva.

In questi ultimi due decenni, gli EO e i loro componenti hanno guadagnato molta attenzione perché sono dotati di tutte le proprietà citate sopra.

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica, si presume che essa sia correlata a parametri relativi alla natura chimica degli stessi oli, cioè:

- alla loro composizione
- alla configurazione strutturale dei componenti
- ai loro gruppi funzionali
- alle possibili interazioni sinergiche tra i componenti.

La loro attività antimicrobica dipende dalle proprietà stereochimiche e dalla loro interazione o sinergia con i componenti della matrice alimentare. L'esposizione cellulare a concentrazioni sub-letali di composti antimicrobici naturali ha effetti particolari sui componenti della parete cellulare dei batteri e sui loro processi catabolici. Essendo una caratteristica comune di questi composti la loro natura idrofoba, le cellule microbiche accumulano questi composti nella membrana citoplasmatica, dove possono provocare diversi effetti tossici e che possono eventualmente portare alla morte cellulare (Braschi et al., 2018).

Tra le varie proprietà fisiche che le molecole aromatiche possiedono, le due ritenute più importanti e che influenzano il loro meccanismo d'azione sono: la scarsa solubilità in acqua e l'alta idrofobicità. Proprio per questo motivo, molti studi (Patrignani et al., 2015) hanno indicato che i loro effetti antimicrobici dipendono proprio da queste caratteristiche e dalla loro capacità di agire sulla membrana cellulare.

Inoltre, la bioattività di molti composti aromatici può dipendere dalla tensione di vapore, che può essere considerata una misura indiretta dell'idrofobicità.

I fattori responsabili dell'aumento della tensione di vapore delle molecole aromatiche conducono ad un aumento dell'attività antimicrobica, poiché aumenta la loro solubilità nelle membrane cellulari. Precisamente, l'idrofobicità permette loro di avere una buona ripartizione nei lipidi delle membrane cellulari e nei mitocondri dei microrganismi alterativi e patogeni bersaglio, alterandone così le strutture e rendendoli più permeabili, portando alla perdita di ioni e altri contenuti cellulari. La cellula batterica può tollerare fino ad un certo limite la perdita di alcuni contenuti cellulari, infatti la loro perdita eccessiva o la perdita di molecole e ioni fondamentali può portare alla morte cellulare.

Molti studi hanno permesso di indicare la membrana cellulare come bersaglio primario dei composti aromatici bioattivi. Generalmente, le membrane vengono distrutte dall'azione dei terpeni e questo può essere osservato sia sui batteri che sui funghi.

L'azione antimicrobica di molti EO sembra essere connessa anche alla presenza di composti fenolici. Perciò, i diversi componenti di un olio essenziale possono avere effetti antagonistici, sinergici o additivi sulle cellule microbiche.

Inoltre l'intrinseca variabilità nella composizione degli oli essenziali può influenzare la loro attività antimicrobica complessiva portando ad un'apparente contraddizione nei risultati. Perciò è possibile ritenere che gli effetti antimicrobici dei componenti degli oli essenziali dipendono dalla loro idrofobicità e dalla loro divisione nelle membrane citoplasmatiche dei batteri.

In generale, gli effetti antimicrobici degli OE sono stati principalmente spiegati attraverso la presenza di terpeni C10 e C15 con anelli aromatici e un gruppo fenolico idrossilico in grado di formare legami idrogeno con siti attivi di enzimi bersaglio. Tuttavia, altri terpeni e alcoli attivi, aldeidi e esteri possono contribuire agli effetti antimicrobici complessivi degli OE.

L'idrofobicità dell'olio essenziale di timo e dei suoi componenti consente di interagire con il doppio strato di fosfolipidi della membrana cellulare, interferendo con la sua integrità e funzionalità.

La presenza del gruppo idrossile ha un ruolo chiave nell'inattivazione degli enzimi microbici da parte di timolo e carvacrolo. Le aldeidi con insaturazione α e β , dopo la penetrazione nelle cellule, possono reagire con gruppi nucleofili biologicamente importanti. Inoltre, le aldeidi possono reticolare i gruppi amminici nella parete cellulare e nel citoplasma, e inibiscono gli enzimi della membrana citoplasmatica con un gruppo tiolo causando la coagulazione e la precipitazione di componenti citoplasmatici (Siroli et al., 2015b).

Secondo Burt (2004) l'idrofobicità degli EO consente loro di ripartirsi nei lipidi della membrana cellulare e nei mitocondri, rendendoli permeabili e portando alla fuoriuscita del contenuto cellulare. Le condizioni fisiche che migliorano questa azione sono:

- basso pH,
- bassa temperatura
- bassi livelli di ossigeno.

Gli oli essenziali vegetali, costituiti principalmente da terpenoidi, sono stati studiati soprattutto per la loro attività antimicrobica contro molti microrganismi tra cui diversi agenti patogeni (Lanciotti et al., 2004). Tra gli EO, uno molto utilizzato in ambito alimentare è il citral, ovvero una miscela di due isomeri, geraniale e nerale, che sono aldeidi monoterpene acicliche con insaturazione α e β (Patrignani et al., 2013).

4.3.1 MECCANISMO D'AZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI

In numerose ricerche (Burt, 2004; Siroli et al., 2015), è stato definito che è molto probabile che l'attività antibatterica dei componenti dell'olio essenziale non sia attribuibile a uno specifico meccanismo, ma all'azione verso diversi specifici target cellulari.

In generale, si accetta che l'obiettivo principale degli EO e dei loro componenti sono:

1. la parete cellulare
2. la membrana citoplasmatica
3. le proteine di membrana.

Proprio a causa dell'azione su tali elementi cellulari, si ritiene che gli oli essenziali e le loro molecole attive possano portare ad una serie di alterazioni (Siroli et al., 2018), ovvero:

- a degradazione della parete cellulare,
- a danni della membrana citoplasmatica e delle proteine di membrana,
- alla fuoriuscita del contenuto cellulare,
- alla coagulazione del citoplasma,
- all'esaurimento della forza proton-motrice e più in generale la perturbazione del metabolismo energetico.

In ogni caso la modifica della membrana cellulare è segnalata come la causa fondamentale dell'inibizione di microrganismi alterativi e patogeni, compreso *E. coli*.

Secondo Lanciotti et al. (2004) i precisi meccanismi d'azione di tutti questi composti antimicrobici non sono ancora chiari, però il 2-(E)-esanale sembra agire come un tensioattivo e probabilmente permea per diffusione passiva attraverso la membrana plasmatica. Una volta all'interno delle cellule bersaglio, la sua porzione aldeidica insatura reagisce con i gruppi nucleofili biologicamente importanti.

In Figura 9 viene mostrato, in generale, il meccanismo d'azione degli EO secondo Burt (2004). È possibile notare innanzitutto i 3 bersagli principali su cui i composti degli EO esplicano la loro attività, ovvero: la membrana citoplasmatica, le proteine di membrana e la parete cellulare; inoltre, è possibile notare alcune delle conseguenze di tali attività, cioè la perdita della forza proton-motrice, la coagulazione del citoplasma e la perdita dei costituenti principali del citoplasma come ioni fondamentali e metaboliti.

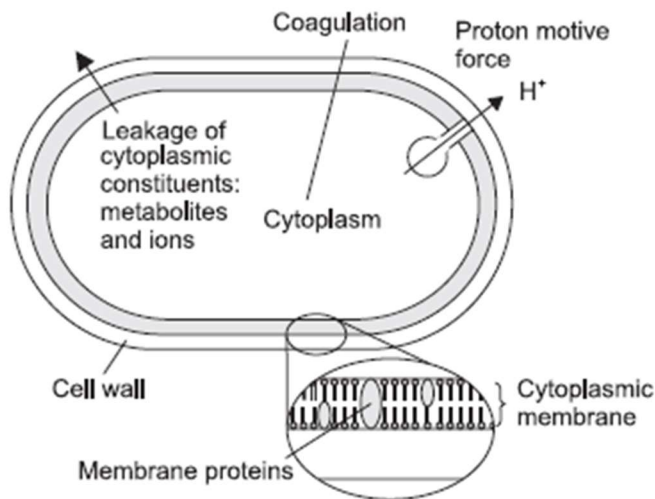


Figura 9 - Meccanismo d'azione degli EO (Burt, 2004)

L'idrofobicità degli oli e dei loro componenti li abilita alla ripartizione nei lipidi della membrana cellulare dei batteri e nei mitocondri, disturbandone le strutture e rendendole più permeabili.

Avvengono una serie di cambiamenti all'interno della cellula microbica quando viene "attaccata" dagli EO che, come abbiamo visto, i principali sono: l'alterazione della membrana citoplasmatica, la disgregazione della forza proton-motrice (FPM), un flusso di elettroni, il trasporto attivo e la coagulazione del contenuto cellulare.

La struttura chimica dei singoli componenti degli EO influisce sulla loro precisa modalità di azione e sull'attività antibatterica. In particolare è importante la presenza del gruppo ossidrilico nei composti fenolici come il carvacolo e il timolo.

Inoltre è stata dimostrata, sempre da Burt (2004), l'attività degli EO sugli enzimi situati nella membrana citoplasmatica, ad esempio le ATPasi, che sono delimitati da molecole lipidiche. Gli idrocarburi ciclici presenti negli oli essenziali possono modificare la struttura lipidica di questi enzimi tramite due meccanismi: o gli idrocarburi lipofili si accumulano nel doppio strato lipidico e distorcono l'interazione lipide-proteina, oppure è possibile l'interazione diretta dei composti lipofili con le parti idrofobe della proteina.

Un aspetto molto importante che è stato valutato in molte ricerche (Burt, 2004; Lanciotti et al., 2004) è che gli oli essenziali sono molto più attivi verso i gram-positivi piuttosto che nei confronti dei gram-negativi. Questi ultimi sono meno sensibili all'attività degli antimicrobici perché possiedono una membrana esterna che circonda la parete cellulare e che perciò limita la diffusione dei composti idrofobici degli oli attraverso questo strato di lipopolisaccaridi. Questa membrana esterna funge da barriera di permeabilità ed è efficiente contro macromolecole e sostanze idrofobe.

Ci sono però alcuni composti attivi degli oli essenziali, come il carvacrolo e il timolo, che sono in grado di disintegrare la membrana esterna dei batteri gram-negativi, rilasciando lipopolisaccaridi (LPS) e aumentando la permeabilità della membrana citoplasmatica all'ATP.

4.4 APPLICAZIONE DEGLI OLI ESSENZIALI IN SUCCHI E BEVANDE

Negli ultimi anni sono state effettuate una grande quantità di ricerche sull'applicazione degli oli essenziali negli alimenti in generale ed in particolare in bevande a base di frutta e verdura o in frutta e verdura minimamente trasformate.

Tra le applicazioni degli oli essenziali nei succhi di frutta e nelle bevande vegetali vi è quella di Lin et al. (2019), in cui sono stati combinati i campi magnetici pulsati con l'olio essenziale di *Litsea cubeba* per contrastare l'attività di *E. coli* O157:H7 in quattro diverse bevande vegetali, ovvero succo di cetriolo, carota, spinaci e zucca.

Secondo Lin et al. (2019), i succhi di frutta e verdura sono probabilmente le bevande più diffuse in tutto il mondo, ma spesso sono alimenti vulnerabili a causa della presenza di patogeni di origine alimentare. Dal momento che queste bevande hanno bisogno di mantenere il loro sapore originale, non possono essere aggiunti troppi conservanti chimici, perciò è necessario trovare nuovi metodi efficaci per inibire i patogeni come ad esempio *E. coli* O157: H7.

Attualmente, le sostanze antimicrobiche di tipo naturale come gli oli essenziali delle piante hanno attirato sempre più attenzione, grazie alla loro sicurezza, all'alta efficienza e agli effetti non tossici. Noti anche come oli vegetali volatili, in generale consistono in liquidi oleosi con forti caratteristiche di odore e sapore, hanno una buona attività battericida e un effetto antibatterico ad ampio spettro, il che porta una buona prospettiva per il controllo dei batteri in matrici alimentari come i succhi e le bevande.

Tra le altre applicazioni vi è quella di Braschi et al. (2018), che hanno definito che una delle strategie emergenti per prevenire la presenza e la crescita di *L. monocytogenes* Scott A in molti prodotti alimentari è proprio l'uso di questi antimicrobici naturali o dei loro componenti, da soli o in combinazione con altri ostacoli.

Inoltre, la crescente domanda dei consumatori di alimenti senza o con pochi conservanti chimici, ha creato una domanda di mercato orientata verso tecnologie più naturali e non termiche per garantire la sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti.

Come già anticipato, gli oli essenziali e i composti aromatici possono essere un'alternativa interessante per migliorare la sicurezza e la conservabilità delle bevande a base di frutta e verdura.

Lanciotti et al. (2004) infatti hanno dimostrato, in una sperimentazione riguardante la frutta minimamente processata, che il loro potenziale antimicrobico è ben noto e le principali limitazioni all'uso industriale di queste sostanze come conservanti sono il loro impatto organolettico e la loro composizione variabile.

Siroli et al. (2014) invece hanno studiato gli effetti dei componenti degli oli essenziali, in particolare hanno visto che le aldeidi, come il 2-(E)-esanale e il citral, hanno mostrato un grande potenziale antimicrobico contro agenti patogeni come *Salmonella* spp., *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* in mele minimamente processate e conservate in atmosfera modificata.

Altra ricerca effettuata da Siroli et al. (2015a), riguardava lo studio dell'effetto di antimicrobici naturali come olio essenziale di timo e origano, per prolungare la shelf-life di lattuga minimamente processata.

Anche Patrignani et al. (2013) hanno effettuato una sperimentazione, precisamente una ricerca riguardante la combinazione delle alte pressioni di omogeneizzazione, che sono in grado di ridurre significativamente il microbiota responsabile del deterioramento nel succo di frutta, insieme all'utilizzo di un olio essenziale, ovvero il citral, che può avere un ruolo chiave nella stabilità microbica di succhi di frutta, in questo caso succo di albicocca, oltre ad apportare buone caratteristiche sensoriali. Essi hanno definito che i composti aromatici e gli oli essenziali possono essere un'alternativa interessante per migliorare la sicurezza e la conservabilità dei succhi di frutta. Una ulteriore sperimentazione di Patrignani et al. (2015) è stata quella riguardante le strategie innovative, come l'uso di oli essenziali, per migliorare la sicurezza, la shelf-life e la qualità di frutta e verdura minimamente processate. Precisamente, sono stati applicati acido citrico, acido ascorbico, citral e 2-(E)-esanale in mele minimamente processate, e olio essenziale di timo e origano in lattuga minimamente processata.

4.5 OLIO ESSENZIALE DI TIMO

Il *Thymus vulgaris*, pianta erbacea aromatica, è un'erba medicinale appartenente alla famiglia delle *Lamiaceae*. È comunemente coltivato e utilizzato in molti paesi principalmente come un condimento alimentare e sottoforma di olio essenziale, inoltre viene utilizzato nell'industria alimentare, nella cosmetica e per uso medico.

Nella medicina tradizionale il timo è di solito usato come rimedio ad una varietà di disturbi come ad esempio quelli gastroenterici; ha anche attività immunomodulatoria, effetto anti-infiammatorio, capacità antibatterica, azione antiossidante, capacità anti-trombina ed è un potente antiipertensivo (Rtibi et al., 2019).

È stato ipotizzato da Patrignani et al. (2015) che l'inibizione contro *S. typhimurium* e *S. aureus* dall'olio essenziale di timo, dipendeva dall'idrofobicità e dalla natura dei composti fenolici presenti, che hanno determinato l'alterazione della funzionalità delle proteine di membrana dopo la ripartizione nel doppio strato fosfolipidico. L'effetto inibitorio dei fenoli può essere spiegato tramite l'interazione con la membrana cellulare dei microrganismi, ed è spesso correlato con l'idrofobicità dei composti. La struttura lipofila dei monoterpeni ciclici promuove la loro divisione nella fase acquosa con conseguente espansione e aumento di fluidità e di permeabilità della membrana, che alla fine porta a un'inibizione degli enzimi di membrana. I danni alla parete cellulare e nelle membrane, può portare alla perdita di macromolecole fino alla lisi cellulare. In questo modo, l'attività totale delle cellule è fortemente compromessa, così come il turgore cellulare (pressione osmotica), il trasporto di soluti e la regolazione del metabolismo.

Nella Tabella 8 è possibile vedere l'utilizzo di diversi oli essenziali in base alla matrice alimentare di riferimento. Ad esempio, nel nostro caso, in un prodotto minimamente trasformato come il succo di carota viene perlopiù utilizzato l'olio essenziale di timo, in concentrazione 0,1-10 mL/L e per cui è stata definita attività antimicrobica nei confronti di un patogeno target di riferimento, ovvero *E. coli* O157:H7.

Table 1

Overview of cases testing the antimicrobial activity of essential oils (EO) or their components in minimally processed fruits and vegetables.

	Food	EO or component	Concentration applied	Microbial targets
Fruits	<i>Kiwifruits</i>	Carvacrol	1 mM in dipping solution	Natural microflora
	<i>Honeydew melon</i>	Carvacrol and cinnamic acid	1 mM in dipping solution	Natural microflora
	<i>Fresh sliced apples</i>	Hexanal, hexyl acetate, E(2)hexenal	50–250 ppm 20–200 ppm	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Sweet cherries</i>	Eugenol, thymol, menthol, eucalyptol	1000 µL in gas used for MAP	Natural microflora
	<i>Table grape</i>	Eugenol thymol	75-150 µL in gas used for MAP	Natural microflora
	<i>Fresh sliced apples</i>	Oregano, Lemongrass, vanillin used encapsulated	1.1 and 0.5% (w/w) 1 and 1.5% (w/w) 2.2 and 0.6% (w/w)	Natural microflora and inoculated <i>L. innocua</i>
	<i>Fruit salads</i>	Citral Citron EO	25–125 ppm 300–600 ppm	<i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Fresh cut apples</i> <i>Avocado</i>	Vanillin Thyme EO in MAP	12 g/L 75 µL in filter	<i>E. coli</i> O157:H7 <i>Listeria</i> spp Natural microflora
	<i>Fresh cut apples in MAP</i>	Citron EO, Hexanal, E(2)hexenal, Citral, carvacrol	Alone 250 mg/L Combination 125 mg/L	Natural microflora <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>
	Vegetables	<i>Lettuce</i>	Thyme EO	0.1–10 mL/L
<i>Carrots</i>		Thyme EO	0.1–10 mL/L	<i>E. coli</i> O157:H7

Tabella 8 - Uso di oli essenziali in relazione al tipo di prodotto ortofrutticolo (Patrignani et al., 2015)

In Tabella 9 invece vengono mostrati i maggiori componenti degli oli essenziali che hanno mostrato, nei numerosi studi, attività antimicrobica. Nell'olio di timo i composti più rilevanti, presenti in diverse concentrazioni, sono:

- Timolo
- Carvacrolo
- P-cimene
- γ -terpinene.

Major components of selected^a EOs that exhibit antibacterial properties

Common name of EO	Latin name of plant source	Major components	Approximate % composition ^b
Cilantro	<i>Coriandrum sativum</i> (immature leaves)	Linalool	26%
		E-2-decanal	20%
Coriander	<i>Coriandrum sativum</i> (seeds)	Linalool	70%
		E-2-decanal	–
Cinnamon	<i>Cinnamomum zeylandicum</i>	Trans-cinnamaldehyde	65%
Oregano	<i>Origanum vulgare</i>	Carvacrol	Trace-80%
		Thymol	Trace-64%
		γ -Terpinene	2–52%
		p-Cymene	Trace-52%
Rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i>	α -pinene	2–25%
		Bornyl acetate	0–17%
		Camphor	2–14%
		1,8-cineole	3–89%
Sage	<i>Salvia officinalis</i> L.	Camphor	6–15%
		α -Pinene	4–5%
		β -pinene	2–10%
		1,8-cineole	6–14%
		α -tujone	20–42%
Clove (bud)	<i>Syzygium aromaticum</i>	Eugenol	75–85%
		Eugenyl acetate	8–15%
Thyme	<i>Thymus vulgaris</i>	Thymol	10–64%
		Carvacrol	2–11%
		γ -Terpinene	2–31%
		p-Cymene	10–56%

Tabella 9 - Maggiori componenti di oli essenziali con attività antibatterica (Burt, 2004)

Il timolo, fenolo monoterpenco e composto chimico fondamentale dell'olio di timo, ha struttura chimica con al centro un anello aromatico, rappresentata dalla Figura 10.

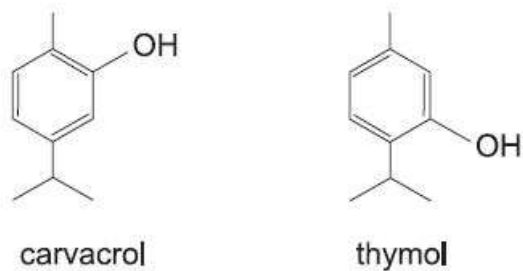


Figura 10 - Timolo e carvacrolo (Burt, 2004)

Studi in vitro effettuati da Siroli et al. (2018), hanno dimostrato che gli EO come quello di timo possiedono attività antimicrobica contro un ampio spettro di batteri Gram-negativi e Gram-positivi, nonché di lieviti e muffe.

Il carvacrolo è, oltre al timolo, uno dei componenti principali degli EO di timo e origano; è un monoterpenoide fenolico con una forte attività antimicrobica contro una vasta gamma di microrganismi patogeni e funghi.

5. OBIETTIVI

Una dieta ricca di frutta e verdura può avere un impatto positivo sulla salute e sul benessere dell'uomo (Gironés-Vilaplana et al., 2016), per via della presenza di alcuni composti bioattivi (tocoferoli, carotenoidi, polifenoli, fenoli e antociani) (Kongkachuichai et al., 2015), vitamine, minerali e fibre. Per una dieta da 2000 kcal, le Linee guida dietetiche americane del 2010 raccomandano 9 porzioni di frutta e verdura al giorno, 4 porzioni di frutta e 5 porzioni di verdura. L'Unione europea sostiene la raccomandazione dell'OMS per almeno 400 g/giorno di frutta e verdura fresca (Bevilacqua et al., 2018). Le strategie per aumentare il consumo di frutta e verdura sono un punto chiave al centro delle politiche comunitarie sulla salute pubblica (Mytton et al., 2014). Pertanto, la promozione del consumo di frutta e verdura è un obiettivo chiave degli interventi di politica alimentare e nutrizionale condotti in tutto il mondo da parti interessate sia governative che non governative (Rekhy & McConchie 2014). Succhi di frutta e verdura, miscele di succhi di frutta, frullati, bevande fermentate e arricchite sono un modo sempre più popolare di consumare frutta e verdura fresca e possono contribuire a una dieta e a una vita sana (Wootton-Beard & Ryan, 2011).

I succhi di frutta e verdura sono tradizionalmente conservati mediante trattamento termico. Nonostante l'efficacia di questi trattamenti per garantire la sicurezza alimentare, secondo Barzee et al. (2019) la pastorizzazione riduce la freschezza e la qualità del prodotto, inoltre può influenzare negativamente diversi criteri di qualità, quali: vitamine, carotenoidi, polifenoli e contenuto di acidi organici, pH e colore. Inoltre, le recenti richieste dei consumatori di alimenti sicuri e minimamente trasformati con attributi di alta qualità hanno incoraggiato l'industria alimentare e ricercatori scientifici a progettare tecnologie non termiche alternative per produrre alimenti con cambiamenti minimi indotti dalle tecnologie stesse (Jiménez-Sánchez et al., 2017). Sebbene il trattamento non termico appaia meno impattante sulle caratteristiche nutrizionali rispetto a quelli termici, gli effetti dipendono fortemente dalla matrice alimentare. Pertanto, risulta fondamentale selezionare la tecnologia non termica più appropriata insieme a condizioni di processo validate per preservare i componenti nutritivi e gli attributi di colore e sapore del prodotto.

Tra le bevande vegetali, il succo di carota rappresenta una di quelle a più ampio consumo allo stato attuale. Infatti, è ricco di una molteplicità di composti importanti dal punto di vista nutrizionale, che secondo Di Cagno et al. (2013) sono: vitamine idrosolubili (vitamina C e vitamine del gruppo B), provitamina A, fitosteroli, fibre alimentari, minerali e sostanze fitochimiche importanti per la dieta umana, oltre ad una notevole concentrazione di potassio. Ma soprattutto è considerato alimento salutare grazie alla ricchezza di carotenoidi che contribuiscono all'attività della

provitamina A e delle proprietà antiossidanti. I componenti con attività antiossidante sono acido ascorbico, tocoferoli (vitamina E) e flavonoidi (Ashurst, 2005).

Considerando il succo di carota non trattato termicamente, esso possiede una breve shelf-life a causa dell'alto pH (circa 6), motivo per cui dovrebbe essere consumato entro uno o due giorni. In questo caso la necessità di impiego di tecnologie non termiche per allungare la conservazione del prodotto risulta ancora più accentuata.

Tra i trattamenti non termici, da utilizzare in combinazione o meno con la refrigerazione, sono stati proposti trattamenti UV, campi elettrici pulsati, alta pressione idrostatica HHP (Bello, et al., 2014), omogeneizzazione ad alta pressione (HPH) (Patrignani et al., 2013), utilizzo di antimicrobici naturali come oli essenziali (Patrignani et al., 2013; Siroli et al., 2015) e fermentazione lattica di matrici vegetali (Bevilacqua, et al., 2018; Siroli et al. 2019).

L'utilizzo di batteri lattici per fermentare matrici vegetali è da considerarsi come un processo sempre più utilizzato a livello industriale (Siroli et al. 2019). La fermentazione è ampiamente riconosciuta come uno strumento fondamentale per aumentare la sicurezza, la conservabilità e le proprietà funzionali e sensoriali di molte bevande a base di verdure, in particolare se gestita con colture starter selezionate su misura (Serrazanetti, et al., 2013). Attualmente, i processi di fermentazione dei succhi e delle bevande a base vegetale in Europa sono guidati utilizzando ceppi microbici commerciali ben caratterizzati appartenenti alle specie *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bavaricus*, *Lactobacillus xylosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium bifidus* (Siroli et al., 2019). Negli ultimi anni, sono stati ottenuti risultati interessanti con l'impiego di colture starter di *Lactococcus lactis* produttori di nisina (Siroli, et al., 2016; Ho, et al., 2018). La nisina è stata la prima batteriocina caratterizzata e autorizzata come conservante alimentare nell'Unione europea (Siroli et al., 2016). Infatti, la nisina, e in particolare la variante naturale Z, ha un'alta solubilità e stabilità in diversi sistemi alimentari e un ampio spettro di attività antimicrobica (Settani & Corsetti, 2008; Gharsallaoui, et al., 2016).

Recentemente, Siroli et al. (2019) hanno evidenziato le interessanti proprietà di diversi ceppi di *L. lactis* subsp. *lactis* come agenti fermentanti di latte di soia e succo di carota. In particolare, i ceppi LBG2, 3LC39 e FBG1P hanno portato ad una rapida acidificazione entro 24 ore delle bevande vegetali considerate, trattate termicamente e fermentate a 20°C per 144 ore. Gli stessi autori hanno dimostrato come i ceppi fossero in grado di produrre nisina nelle matrici alimentari considerate e portassero ad un miglioramento dei profili sensoriali di queste bevande fermentate, suggerendo un incremento delle proprietà organolettiche dei campioni trattati termicamente.

Un'ampia letteratura indica che le bevande vegetali possono essere considerate un campo di applicazione interessante per i trattamenti HPH, al fine di ottenere la riduzione del carico microbico preservando allo stesso tempo gli attributi di qualità dei prodotti freschi (Donsi et al., 2011). I trattamenti HPH sono in grado di ridurre significativamente sia i microrganismi degradativi naturalmente presenti che quelli deliberatamente inoculati nei succhi di frutta (Patrignani et al., 2013). Inoltre, diversi studi hanno dimostrato il potenziale dei trattamenti HPH per migliorare la sicurezza e la conservabilità di succhi e bevande vegetali (Patrignani et al., 2013). Il trattamento HPH provoca la modifica di diverse caratteristiche fisiche dei succhi, come la dimensione media delle particelle dei solidi sospesi e la viscosità (Patrignani et al., 2013). Inoltre, i composti funzionali naturali dei succhi, come il contenuto di flavonoidi nei succhi di agrumi, nonché gli attributi di freschezza e consistenza sono meglio preservati dai trattamenti HPH rispetto a quelli termici.

Anche i composti aromatici e gli oli essenziali possono essere considerati un'interessante alternativa per migliorare la sicurezza e la conservabilità di succhi e bevande vegetali. Il loro potenziale antimicrobico è ben noto (Burt, 2004). Inoltre, un ruolo chiave degli oli essenziali e dei loro componenti nella stabilità microbica di bevande e succhi è stato precedentemente riportato (Patrignani et al., 2013). Tra gli oli essenziali, quello di timo è riportato avere una forte attività antimicrobica. Diversi studi hanno dimostrato l'elevata efficacia di questo olio essenziale nei confronti di microrganismi patogeni come *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes* sia in sistemi modello che in sistemi reali come insalate minimamente processate (Siroli et al., 2015) e succo di carota (Irkin e Korukluoglu, 2009).

In questo contesto, l'obiettivo della mia tesi è stato quello di valutare le potenzialità del ceppo di *Lactococcus lactis* LBG2 produttore di nisina (già caratterizzato e utilizzato da Siroli et al. 2019 in combinazione con pastorizzazione flash per la fermentazione di succo di carota) in combinazione o meno con trattamenti ad alte pressioni di omogeneizzazione e olio essenziale di timo per la stabilizzazione e il miglioramento della sicurezza del succo di carota. A tal fine, nella prima fase è stato valutato l'effetto di stabilizzazione microbiologica di succo di carota, non trattato termicamente, da parte di diversi trattamenti HPH, in termini di pressione, numero di passaggi e temperatura di ingresso. Allo stesso tempo è stata valutata la concentrazione ottimale di olio di timo da aggiungere in succo di carota sulla base dell'accettabilità organolettica. Successivamente si è valutata la combinazione di tutte le tipologie di trattamento non termico messe a punto nelle fasi precedenti, ovvero trattamento HPH (150MPa per 3 passaggi), fermentazione da parte del ceppo *L. lactis* LBG2 (inoculo 6.0 log ufc/ml, fermentazione a 30°C per 7 ore) e l'aggiunta di olio di timo (60ppm) per la stabilizzazione microbiologica di succo di carota. In particolare,

rispetto a quanto riportato da Siroli et al. 2019, oltre ad avere sostituito completamente il trattamento termico con il trattamento HPH e l'aggiunta di olio di timo, è stata valutata la shelf-life microbiologica del succo di carota a due diverse temperature di conservazione (4 e 10°C). Ogni combinazione dei trattamenti non termici è stata testata e successivamente sono state valutate le cinetiche di crescita dei gruppi microbici degradativi principali di succo di carota (mesofili aerobi totali, lieviti e coliformi). Ove inoculato è stata valutata anche la cinetica di crescita e acidificazione del ceppo LBG2 e la sua vitalità durante la conservazione. Infine, è stato valutato l'effetto antimicrobico della combinazione o meno dei trattamenti non termici considerati (HPH, fermentazione con ceppo LBG2 e olio essenziale di timo) nei confronti di diversi patogeni alimentari frequentemente associati a questa tipologia di prodotti quali *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* deliberatamente inoculati in succo di carota, al fine di determinare l'effetto sulla sicurezza microbiologica dei trattamenti testati.

6. MATERIALI E METODI

6.1 CEPPI UTILIZZATI NELLA SPERIMENTAZIONE

In questa sperimentazione è stato utilizzato il ceppo di *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LBG2 isolato da latte vaccino e da precedenti studi risultato produttore di nisina Z. questo ceppo appartiene al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari dell'Università di Bologna. Il ceppo oggetto della sperimentazione è stato stoccato in eppendorf con glicerolo al 25% (v/v) e conservato ad una temperatura di -40 °C per mantenerlo vitale durante la sperimentazione. È stato poi pre-coltivato inoculando sterilmente 500µl della coltura in 9 mL di brodo di coltura M-17 (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito).

Infine è stato fatto crescere a 30 °C per 24 ore e ripreso almeno tre volte nel medesimo brodo di coltura prima dell'inoculo nei diversi campioni di succo di carota. Il ceppo è stato precedentemente caratterizzato anche per le capacità fermentative, produzione di nisina, attività antimicrobica e effetti sul profilo in molecole volatili di succo di carota fermentato.

Nei Challenge-test eseguiti sono stati utilizzati i patogeni alimentari *Listeria monocytogenes* SCOTT A, *Escherichia coli* 555 e *Staphylococcus aureus* SR31 tutti appartenenti al Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari (DISTAL) dell'Università di Bologna. Tutti i ceppi impiegati sono stati stoccati in eppendorf con glicerolo al 25% (v/v) e conservati ad una temperatura di -40 °C per mantenerli vitali per tutto il periodo della sperimentazione. Tutti i ceppi sono stati precoltivati inoculando sterilmente 500µl della coltura stoccata a -40 °C in 9 mL di brodo di coltura specifico a seconda del ceppo utilizzato, Brain Heart Infusion-BHI (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito). I tre ceppi sono stati fatti crescere a 37°C per 24 ore e ripresi almeno due volte nel medesimo brodo di coltura prima del loro inoculo.

DEFINIZIONE DEL TRATTAMENTO HPH OTTIMALE PER SUCCO DI CAROTA

L'obiettivo è stato quello di definire le condizioni ottimali di trattamento iperbarico di succo di carota in termini di pressione, numero di cicli e temperatura di ingresso all'omogeneizzatore nell'ottica di combinare poi questo con altre tecnologie "mild". Per questo sono stati acquistati 2 Kg di carote presso un rivenditore locale lo stesso giorno della prova. Successivamente le carote sono state sanitizzate con lavaggio in acqua contenente 100 ppm di ipoclorito di sodio per 2 minuti dopo di che sono state asciugate, pelate e tagliate. Il succo di carota è stato ottenuto utilizzando un estrattore domestico (Russel Hobbs) e raccolto all'interno di bottiglie da 750 mL precedentemente sterilizzate in autoclave.

Il succo di carota è stato poi sottoposto alle altre pressioni di omogeneizzazione (HPH) utilizzando un omogeneizzatore PANDA (GEA Niro Soavi) mostrato nell'Immagine 1. Il test è stato svolto impostando due diverse temperature di ingresso del succo quali RT (25°C) e 50°C, quest'ultima è stata raggiunta mettendo il prodotto in autoclave e rilevando con una sonda termica la temperatura, in modo tale da sapere esattamente il momento in cui era raggiunta la temperatura richiesta.



Immagine 1 - Omogeneizzatore utilizzato

Il prodotto alle due differenti temperature è stato poi sottoposto a diversi cicli di omogeneizzazione: 0.1 MPa e poi 150 MPa per 1, 3 e 5 cicli. I cicli di omogeneizzazione sono stati eseguiti in presenza di uno scambiatore termico in modo da evitare l'incremento di temperatura dovuto al trattamento di omogeneizzazione.

I campioni sottoposti ai diversi trattamenti sono stati poi raccolti in falcon sterili e posti a due differenti temperature: temperatura ambiente (25°C) e a 4°C. In tutti i campioni si è proceduto con l'effettuare la determinazione della carica microbica totale per valutare l'andamento della crescita microbica immediatamente dopo l'inoculo e dopo 24 ore, per quanto riguarda quelli conservati a temperatura ambiente e immediatamente a seguito del trattamento e dopo 48 e 96 ore per i campioni conservati a 4°C.

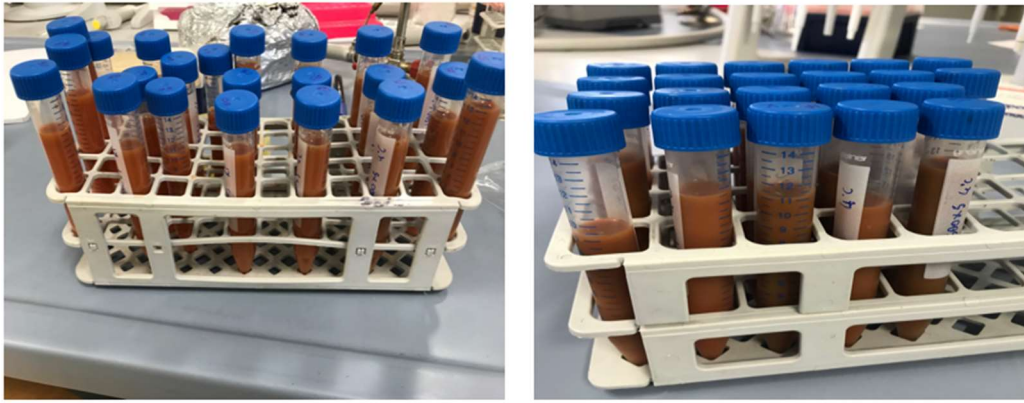


Immagine 2 - Estratto di carota subito dopo il trattamento HPH (sinistra) e dopo 48 ore dal trattamento (destra) conservati a 4°C

La determinazione del carico cellulare è stata eseguita dopo opportuna diluizione del campione in soluzione fisiologica sterile, e successivo inculo su piastre agarizzate di PCA (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) poi incubate 45h a 30°C per la determinazione del carico mesofilo totale. Sono stati inoltre i livelli del pH con pH-metro (pH Meter Basic 20, Crison) subito dopo l'incolo e dopo 24 ore, sempre per i campioni conservati a RT e dopo 24, 48 ore per i campioni conservati a 4°C.

6.2 DEFINIZIONE DELL'ANTIMICROBICO NATURALE DA UTILIZZARE NELLA SPERIMENTAZIONE

Nell'ottica di combinare diversi trattamenti "mild" tra loro per la stabilizzazione di succo di carota, assieme all'utilizzo della fermentazione da parte del ceppo di *L. lactis* LBG2 e delle alte pressioni di omogeneizzazione, si è deciso di aggiungere anche un antimicrobico naturale.

Sono stati eseguiti studi bibliografici e prove di compatibilità organolettica al fine di definire l'olio essenziale e la concentrazione più compatibile con il succo di carota.

L'olio essenziale utilizzato è stato l'olio di timo rosso (*Thymus vulgare*) del marchio Flora s.r.l. (Pisa, Italia). L'olio essenziale è stato utilizzato ad una concentrazione pari a 60 ppm in succo di carota e veicolato in soluzione acquosa con etanolo (<1%). La scelta di tale concentrazione è stata fatta sia sulla base di test di compatibilità organolettica che sulla base di dati riguardanti le concentrazioni minime inibenti (MIC) e battericide (MBC) dell'olio di timo nei confronti di diversi microrganismi patogeni e degradativi.

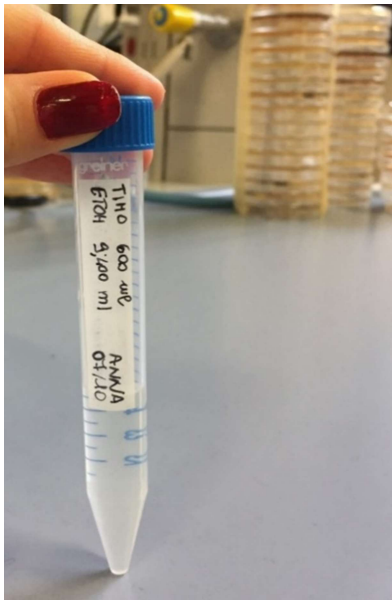


Immagine 3 - Soluzione finale di olio essenziale di timo rosso 60 ppm

6.3 CHALLENGE TEST PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI DIVERSI TRATTAMENTI SULLA SICUREZZA DI SUCCO DI CAROTA

Per la realizzazione di questa prova le carote sono state acquistate presso un rivenditore della zona la mattina stessa della prova, sono state sanitizzate con un lavaggio della durata di 2 minuti in acqua contenente 100 ppm di ipoclorito di sodio, infine sono state asciugate, pelate e tagliate.

Il succo è stato ottenuto utilizzando un estrattore domestico del marchio Russel Hobbs (Failsworth, Regno Unito) e raccolto all'interno di bottiglie sterili da 750 mL precedentemente sterilizzate in autoclave; le bottiglie con il succo sono state poi sottoposte ad un trattamento termico a 72°C per 15 minuti e raffreddate in ghiaccio fino ad arrivare a temperatura ambiente (25°C).

I differenti trattamenti eseguiti hanno portato all'ottenimento di 8 diversi campioni (Tabella 10).

CAMPIONE	TRATTAMENTO EFFETTUATO
Campione 1 - controllo	Patogeni
Campione 2	HPH + patogeni
Campione 3	HPH + patogeni + LBG2 + timo
Campione 4	HPH + patogeni + timo
Campione 5	HPH + patogeni + LBG2
Campione 6	LBG2 + patogeni + timo
Campione 7	LBG2 + patogeni
Campione 8	Timo + patogeni

Tabella 10 - Distinzione dei campioni in base ai trattamenti effettuati

Una parte di succo è stata trasferita in diversi falcon da 50 mL (campioni non trattati alle HPH) in cui sono stati aggiunti i ceppi patogeni, ovvero *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *E. coli*, in concentrazione compresa tra 10^3 e 10^4 ufc/ml e nei campioni ove previsto sono stati aggiunti il ceppo LBG2 alla concentrazione di 6,0 log ufc/ml e la soluzione di olio di timo a 60 ppm (campioni 1,6,7 e 8).

La restante parte è stata inoculata con i ceppi patogeni in concentrazione compresa tra 10^3 e 10^4 ufc/ml e sottoposta alle alte pressioni di omogeneizzazione (HPH). I cicli di omogeneizzazione sono stati 3 e ad una pressione di 150 Mpa, e sono stati eseguiti in presenza di uno scambiatore termico per evitare l'incremento di temperatura. Anche l'addizione di olio di timo alla concentrazione di 60ppm, ove prevista (condizioni 3 e 4), è avvenuta prima del trattamento HPH. Al contrario l'addizione del ceppo LBG2, ove prevista (campioni 2 e 5) è avvenuta successivamente al trattamento HPH.

Anche i campioni sottoposti alle HPH sono stati poi raccolti in falcon sterili da 50 mL e, ove previsto, il ceppo LBG2 in concentrazione 6 log ufc/ml ed una concentrazione di 60 ppm di olio essenziale di timo (Figura 11).

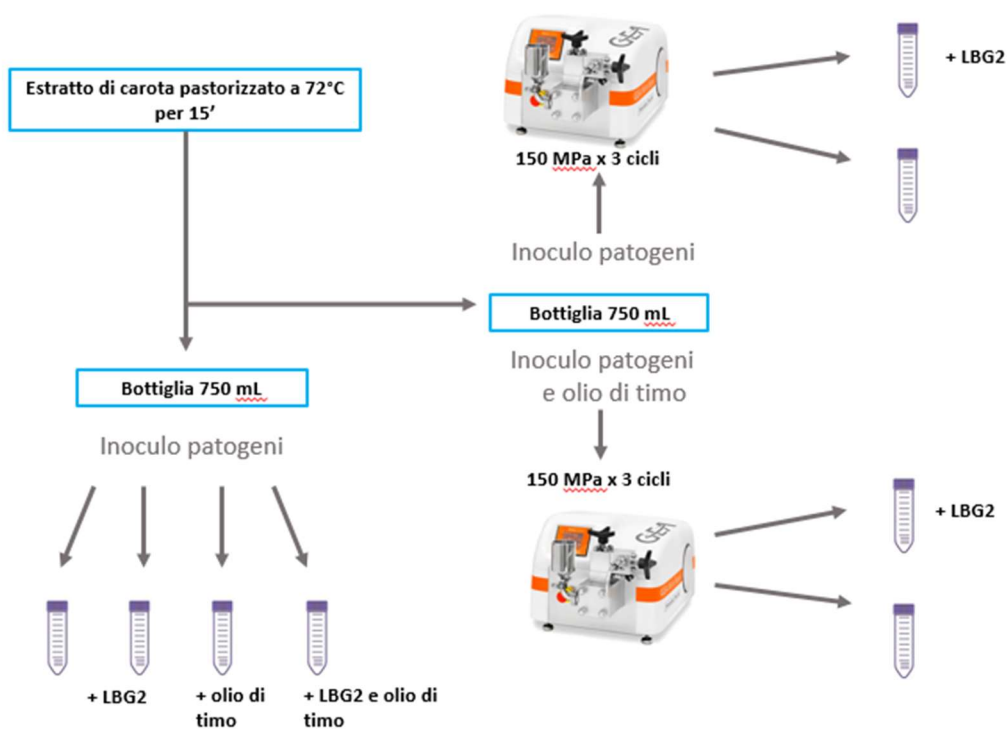


Figura 11 - Schema della sperimentazione eseguita durante il Challenge Test

Tutti i campioni sono stati poi posti ad una temperatura di 30°C per 24 ore, dopo tale periodo sono stati trasferiti a 4°C per ulteriori 24 ore.

È stato effettuato un primo campionamento al tempo zero, mentre i successivi campionamenti sono stati effettuati dopo 4, 8 e, 24 ore a 30°C e dopo ulteriori 24 ore a 4°C.

I campionamenti sono stati eseguiti a seguito di opportune diluizioni seriali in soluzione fisiologica (0,9 % NaCl) sterile. I terreni di crescita utilizzati sono stati quelli selettivi per ognuno dei ceppi ricercati, ovvero: per la ricerca di *Lactococcus lactis* LBG2 è stato utilizzato il terreno di coltura specifico agarizzato M17 e la tecnica di spatolamento superficiale; per la ricerca di *Listeria monocytogenes* è stato utilizzato il terreno selettivo agarizzato ALOA e la tecnica di spatolamento superficiale; per *Escherichia coli* è stato utilizzato il violet red bile lactose agar (VRBA) con la modalità per inclusione; per *Staphylococcus aureus* il terreno Baird Parker (BP) e la tecnica di spatolamento superficiale. Le piastre sono state poi incubate a 37°C per 24h nel caso di ALOA, BP e VRBA, mentre M17 è stato incubato a 30°C per 24h.

Dopo di ciò sono state conteggiate le colonie cresciute nei terreni di crescita per valutare le cinetiche di crescita del lattococco, ove presente, e le cinetiche di disattivazione dei microrganismi patogeni *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

6.4 PROVA DI SHELF-LIFE: VALUTAZIONE DELL'EFFETTO DI FERMENTAZIONE, HPH E USO DI OLIO ESSENZIALE DI TIMO SULLA STABILIZZAZIONE DI SUCCO DI CAROTA

Per studiare l'effetto combinato o meno di fermentazione, trattamento HPH e aggiunta di olio essenziale di timo sulla shelf-life microbiologica di succo di carota è stato messo a punto un piano sperimentale.

I campioni previsti dal piano sperimentale sono quelli riportati in Tabella 11.

CAMPIONE	TRATTAMENTO EFFETTUATO
Campione 1 - controllo	NON TRATTATO
Campione 2	HPH
Campione 3	HPH+timo
Campione 4	HPH+LBG2+timo
Campione 5	HPH+LBG2

Tabella 11 - Distinzione dei campioni in base ai trattamenti effettuati

Per ognuno dei trattamenti mild, quando previsto dal piano sperimentale, sono state utilizzate le seguenti condizioni ottimizzate in precedenti sperimentazioni:

- **trattamento HPH:** ad una pressione di 150 Mpa per 3 cicli, con la temperatura di ingresso pari a 25°C;
- **processo fermentativo:** da parte del ceppo di *Lactococcus lactis* LBG2 a 30°C per 7 ore;
- **antimicrobici naturali:** olio essenziale di timo rosso ad una concentrazione di 60 ppm.

Anche per la realizzazione di questa prova le carote sono state acquistate da un rivenditore locale la mattina stessa della prova, sono state poi sanitizzate con un lavaggio in acqua contenente 100

ppm di ipoclorito di sodio per 2 minuti (Immagine 4), sottoposte ad un risciacquo con acqua potabile ed infine sono state asciugate, pelate e tagliate.

Il succo è stato ottenuto utilizzando l'estrattore domestico del marchio Russel Hobbs (Failsworth, Regno Unito) e raccolto all'interno di bottiglie sterili da 750 mL precedentemente sterilizzate in autoclave.



Immagine 4 - Lavaggio carote in acqua contenente 100 ppm di ipoclorito di sodio

Il volume totale del succo era di circa 1 litro. Da qui sono state prelevate aliquote da 50 mL; queste corrispondevano ai campioni di controllo, cioè il Campione 1 (vedi Tabella 11).

La restante parte di liquido è stata sottoposta al trattamento HPH con una temperatura di entrata pari a quella ambientale (25°C). Il passaggio in omogeneizzatore è avvenuto per 3 cicli a 150 Mpa, ove era prevista l'aggiunta dell'olio di timo, questo è stato addizionato precedentemente al trattamento iperbarico. Al contrario, il succo è stato inoculato, ove previsto, con il lattococco LBG2 ad un livello di circa 6 log ufc/mL, successivamente al trattamento omogeneizzante.

Sono state prelevate almeno sei aliquote per ognuno dei campioni (1-5). Per i campioni 1, 2 e 3, ove non era prevista fermentazione, i campioni sono stati suddivisi e posti a 2 differenti temperature di conservazione pari a 4 e 10°C. Nel caso dei campioni 4 e 5, ove era prevista fermentazione da parte del ceppo LBG2, tutti i campioni sono stati posti a 30°C per il processo fermentativo per 7h e successivamente suddivisi e posti a 2 differenti temperature di conservazione pari a 4 e 10°C (Figura 12).

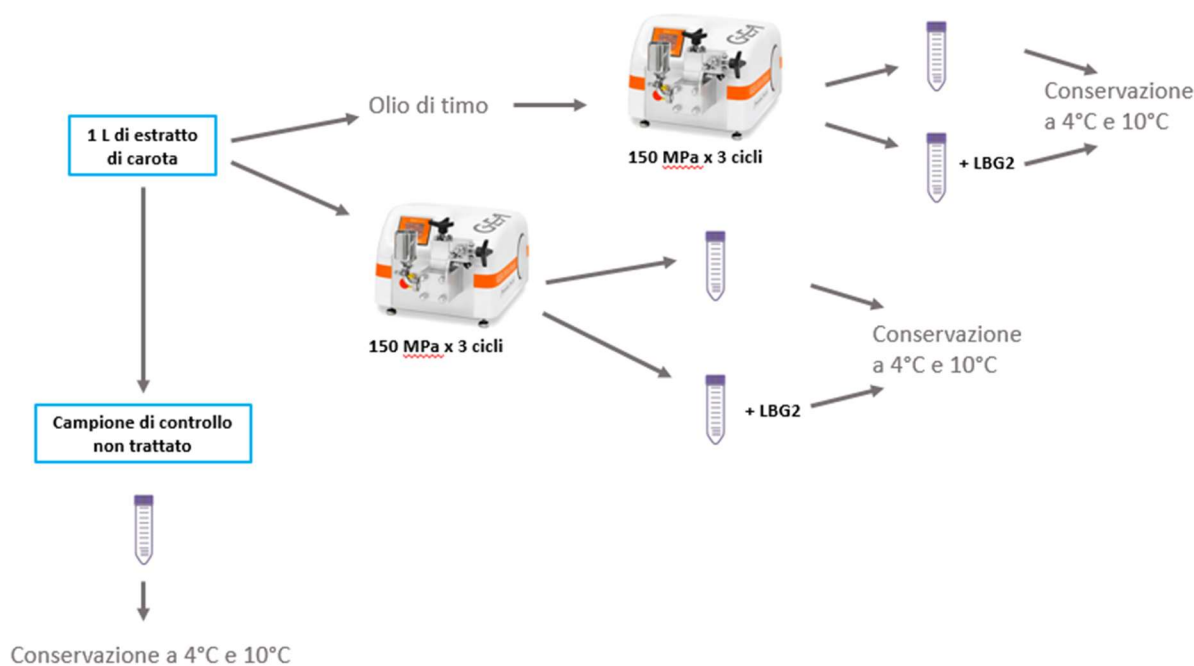


Figura 12 - Schema della sperimentazione eseguita durante la prova di Shelf-life

6.4.1 ANALISI MICROBIOLOGICHE

In tutti i campioni si è proceduto con l'effettuare la determinazione del carico microbico, sia del lattococco inoculato, che dei gruppi microbici alterativi (ovvero il carico mesofilo aerobio totale CMT, i lieviti e i coliformi), per valutare l'andamento della crescita dei microrganismi in diversi tempi. Per tutti i campioni sono state eseguite le analisi microbiologiche immediatamente dopo i trattamenti; successivamente per tutti i campioni conservati a 10°C le analisi sono state svolte dopo 1, 2, 5 e 7 giorni di stoccaggio; per quanto riguarda quelli conservati a 4°C invece, le analisi sono state svolte dopo 2, 6 e 9 giorni di stoccaggio.

Le determinazioni del carico cellulare sono state eseguite dopo le opportune diluizioni del campione in soluzione fisiologica (NaCl 0,9%) sterile e successivo inoculo su piastre agarizzate di terreno di coltura Plate Count Agar (PCA) per valutare la carica di mesofili aerobi totali (piastre incubate a 30°C per 48 ore), M17 (Oxoid, Ltd, Basingstoke, Hampshire, Regno Unito) per la determinazione dei lattococchi (piastre incubate a 30°C per 48 ore), Yeast Peptone Dextrose Agar (YPD) per valutare la crescita dei lieviti (piastre incubate a 30°C per 48 ore) ed infine Violet Red Bile Agar (VRBA) per i coliformi totali (piastre incubate a 37°C per 24 ore).

6.4.2 DETERMINAZIONE DEL pH

Oltre alle prove microbiologiche sono state effettuate delle analisi chimico-fisiche, ovvero la determinazione del pH e del colore.

Per quanto riguarda la determinazione del pH è stato utilizzato un pHmetro da banco, modello Basic 20 del marchio Crison (Barcellona, Spagna), che possiede come sensore di pH un elettrodo in vetro. Per la calibrazione della misura, tale strumento è stato preventivamente tarato in acidità a pH 7 e pH 4 tramite due soluzioni tampone.

Per la determinazione del pH sono stati prelevati 1mL di ogni campione e introdotti in singole Eppendorf, poi ne è stato misurato il pH a temperatura ambiente (25°C) in diversi tempi di analisi. In particolare, per tutti i campioni il pH è stato rilevato immediatamente dopo i trattamenti; e successivamente per tutti i campioni conservati a 10°C il pH è stato misurato dopo 1, 2, 5 e 7 giorni di stoccaggio; mentre per quanto riguarda quelli conservati a 4°C invece, il pH è stato misurato dopo 2, 6, 9 e 12 giorni di stoccaggio.

6.4.3 DETERMINAZIONE DEL COLORE

La variazione di colore dei campioni è stata determinata tramite colorimetro fotoelettrico tristimolo portatile modello CR 400/410 di Konica Minolta, Inc. (Tokyo, Giappone), in modalità SCE (Specular Component Excluded, componente speculare esclusa) e illuminante C, ovvero il vecchio standard per la luce diurna media.

Dopo la calibrazione dello strumento sono state effettuate diverse misure colorimetriche ai diversi tempi di analisi. In particolare, per tutti i campioni il colore è stato rilevato immediatamente dopo i trattamenti; e successivamente per tutti i campioni conservati a 10°C il colore è stato misurato dopo 1, 2, 5 e 7 giorni di stoccaggio; mentre per quanto riguarda quelli conservati a 4°C invece, il colore è stato misurato dopo 2, 6, 9 e 12 giorni di stoccaggio.

I risultati sono stati espressi tramite lo spazio colorimetrico L^* , a^* , b^* (Figura 13).

La scala CIE L^* , a^* , b^* definisce il colore mediante tre coordinate:

1. L^* o luminosità, il cui valore va da 0 a 100;
2. a^* , che esprime il rosso quando è positiva e il verde quando è negativa;
3. b^* , che esprime il giallo quando è positiva e il blu quando è negativa.

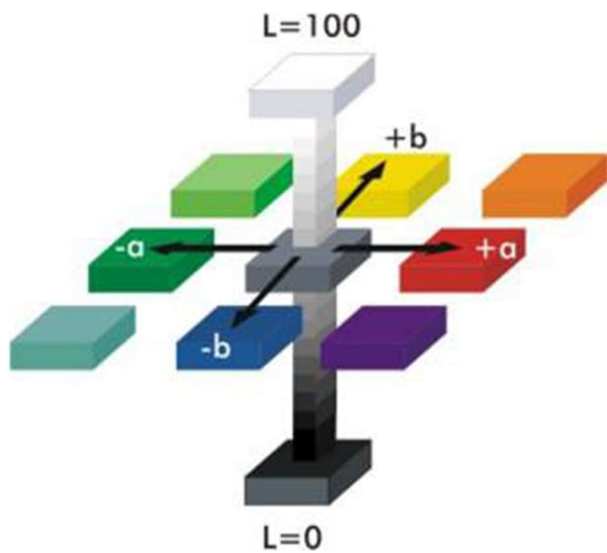


Figura 13 - Rappresentazione dello spazio di colore CIELab

Lo strumento è stato precedentemente calibrato con una piastrina bianca, i cui valori di luminosità (L^*) sono di 98.03, il valore di a^* di -0,23 ed un valore di b^* di 2,05.

I risultati sono stati espressi come L^* (luminosità), a^* (indice rosso) e b^* (indice giallo).

7. RISULTATI E DISCUSSIONE

7.1 DEFINIZIONE DELLE CONDIZIONI OTTIMALI PER IL TRATTAMENTO AD ALTE PRESSIONI DI OMOGENEIZZAZIONE DI SUCCO DI CAROTA

Nella presente tesi è stata valutata la potenziale applicazione delle alte pressioni di omogeneizzazione (HPH) in combinazione con la fermentazione da parte del lattococco LBG2 e l'utilizzo di un antimicrobico naturale, ovvero l'olio essenziale di timo, per migliorare la shelf-life e la sicurezza microbiologica di succo di carota in alternativa all'utilizzo di trattamenti termici.

Nella prima fase sono state eseguite delle prove per definire il trattamento iperbarico più idoneo per ridurre in modo ottimale la microflora naturalmente presente nella matrice. In particolare, è stato valutato l'effetto antimicrobico di trattamenti HPH su succo di carota considerando due differenti temperature di ingresso (25°C e 50°C) del succo poi sottoposto ad una pressione pari a 150 MPa per un diverso numero di passaggi all'omogeneizzatore (1, 3 e 5 passaggi).

In Tabella 12 sono mostrati le riduzioni del carico microbico totale (CMT), immediatamente dopo il trattamento HPH, espresse come $\Delta \log \text{ufc/mL}$ in base al trattamento omogeneizzante applicato.

Pressione (Mpa)	N° cicli	T° ingresso (°C)	CMT pre tratt	CMT post tratt
			log ufc/mL	$\Delta \log \text{ufc/mL}$
0.1	1	25	5,60±0,10	0,03±0,29
150	1	25	5,60±0,10	1,04±0,29
150	3	25	5,60±0,10	1,95±0,07
150	5	25	5,60±0,10	2,21±0,77
0.1	1	50	5,60±0,10	0,50±0,15
150	1	50	5,60±0,10	1,67±0,16
150	3	50	5,60±0,10	2,08±0,64
150	5	50	5,60±0,10	2,38±0,85

Tabella 12 - Carico microbico iniziale e sua riduzione, espressa come $\Delta \log \text{ufc/mL}$ in funzione dei diversi trattamenti HPH impiegati (pressione, numero di cicli, temperatura di ingresso)

Da ciò che si evince dai dati, l'effetto della temperatura di ingresso è risultato veramente limitato, di fatto per le stesse pressioni applicate l'effetto della differente temperatura non è risultato significativo indipendentemente dal numero di cicli considerato, per cui la temperatura di ingresso pari a 50°C non ha portato ad un significativo incremento di disattivazione microbica rispetto alla temperatura di 25°C.

Come atteso, l'applicazione di una pressione pari a 0,1 MPa (pressione atmosferica) che rappresentava il nostro controllo, non ha permesso alcuna riduzione del carico microbico. Al contrario, è stata osservata una riduzione superiore ad un ciclo logaritmico del carico mesofilo totale a seguito di 1 passaggio a 150 MPa, indipendente dalla temperatura di ingresso utilizzata.

L'aumento del numero di passaggi a 150 MPa ha generato un effetto additivo sull'abbattimento microbico rilevato. In particolare, 3 passaggi a 150 MPa hanno portato ad un abbattimento compreso tra 1,95 e 2,08 log ufc/mL, quindi un abbattimento di un ciclo logaritmico superiore a quanto osservato con un unico passaggio. Un incremento dell'abbattimento è stato osservato anche con l'applicazione di 5 passaggi a 150 MPa, tuttavia questo incremento della riduzione del carico microbico rispetto a 3 passaggi è risultato piuttosto limitato e compreso tra 0,26 e 0,30 cicli logaritmici indipendentemente dalla temperatura di ingresso considerata.

I risultati di disattivazione microbica rilevati, hanno mostrato un effetto additivo di ogni ciclo di pressione applicato ma senza osservare una linearità in termini di riduzione del carico microbico. D'altra parte, i dati di letteratura riguardo l'effetto additivo del numero di cicli HPH sulla disattivazione microbica sono contraddittori. Alcuni autori hanno riportato un effetto non additivo di cicli multipli HPH sulla popolazione microbica ed hanno attribuito questo trend alla fisiologica diversità delle popolazioni microbiche e alla presenza di cellule resistenti derivanti dal microbiota originale della matrice e capaci di sopravvivere alla pressione ed al numero di cicli applicati (Donsì, et al., 2009).

Inoltre, l'efficacia e la linearità dell'inattivazione microbica in relazione all'applicazione di passaggi multipli alla pressione considerata sono strettamente correlati alla quantità e composizione della popolazione microbica iniziale ed ovviamente anche in funzione della tipologia di succo considerata (Patriganì & Lanciotti, 2016; Patrignani, et al., 2019).

Sulla base dei risultati ottenuti e dal momento che l'effetto additivo di riduzione del carico microbico passando da 3 a 5 passaggi a 150MPa è risultato piuttosto limitato; le condizioni di trattamento HPH selezionate per le successive prove sono state una temperatura di ingresso del succo pari a 25°C, pressione pari a 150MPa ed il numero di passaggi a questa pressione pari a 3.

7.2 DEFINIZIONE DELL'ANTIMICROBICO NATURALE DA UTILIZZARE IN SUCCO DI CAROTA

Studi eseguiti precedentemente indicano l'olio essenziale di timo come particolarmente compatibile a livello organolettico con succo di carota. Inoltre, Irkin e Korukluoglu (2009) hanno dimostrato come l'olio essenziale di timo era, rispetto a tanti altri testati (origano, cedro, chiodi di garofano, aglio, pepe nero, menta e cumino), il più efficace ad inibire microrganismi patogeni come *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans* in succo di carota miscelato con succo di mela. Per queste ragioni ci siamo indirizzati verso l'utilizzo dell'olio essenziale di timo rosso. La

caratterizzazione gascromatografica dell'olio essenziale utilizzato in questa sperimentazione era stata eseguita precedentemente ed è riportata in Tabella 13.

Molecole identificate	Area totale	Area %
α -pinene	64161013	4,83
camphene	25751016	1,94
β -pinene	8433414	0,63
β -phellandrene	91377	0,01
3-carene	2933646	0,22
β -myrcene	35761675	2,69
α -phellandrene	4773632	0,36
α -terpinene	51235593	3,85
limonene	13389082	1,01
β -thujene	14346138	1,08
γ -terpinene	203560670	15,31
<i>p</i> -cymene	374581749	28,17
terpinolene	4470401	0,34
cis- β -terpineolo	3278286	0,25
α -cubebene	1572027	0,12
β -bourbonene	899816	0,07
linalolo	27058205	2,04
bornyl acetato	796292	0,06
timolo metil etere	6150134	0,46
caryophyllene	90878013	6,84
(+)-aromadendrene	846134	0,06
allo-Aromadendrene	403729	0,03
β -farnesene	390745	0,03
β -gurjunene	339524	0,03
nerolo acetato	274055	0,02
α -caryophyllene	1874589	0,14
γ -Muurolene	1271159	0,10
α -terpineolo	592502	0,04
borneolo	6007370	0,45
γ -Terpinene	464250	0,03
copaene	152918	0,01
α -Muurolene	471346	0,04
(+)-carvone	159069	0,01
δ -Cadinene	2369546	0,18
γ -cadinene	1201383	0,09
Calamenene	602444	0,05
<i>p</i> -Cymen-8-olo	388408	0,03
timolo acetato	163468	0,01
<i>p</i> -timolo	2137097	0,16
timolo	154571998	11,63
carvacrolo	220709539	16,60

Tabella 13 - Composti identificati dall'analisi GC-MS-SPME dell'olio essenziale di timo rosso utilizzato nella sperimentazione espressi come aree totali e percentuali relative

Come possibile osservare dalla Tabella 13 i componenti maggiormente presenti nell'olio essenziale utilizzato risultavano essere γ -terpinene (15,3%), *p*-cimene (28,2%), timolo (11,6%) e carvacrolo (16,6%). La composizione dell'olio essenziale testata è risultata del tutto simile a quella riportata da Siroli et al. (2015). Inoltre, l'elevata presenza di molecole con spiccata attività antimicrobica quali carvacrolo e timolo è indice di una potenziale elevata attività antimicrobica

nei confronti di diversi microrganismi sia degradativi che patogeni potenzialmente presenti in succo di carota.

Quest'olio essenziale di timo era stato precedentemente caratterizzato anche per le concentrazioni minime inibenti (MIC) e battericide (MBC) nei confronti di diversi microrganismi patogeni e degradativi in sistemi modello (brodo di coltura). In Tabella 14 sono riportati i valori di MIC e MBC di olio essenziale di timo nei confronti di *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e *Saccharomyces cerevisiae* per diversi livelli di inoculo (6, 4 e 2 log UFC/ml) e per diversi tempi (24 e 48h).

	UFC/mL								
	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴	10 ²	10 ²	10 ²
	MIC 24h (ppm)	MIC 48h (ppm)	MBC (ppm)	MIC 24h (ppm)	MIC 48h (ppm)	MBC (ppm)	MIC 24h (ppm)	MIC 48h (ppm)	MBC (ppm)
<i>P. aeruginosa</i>	800	1000	1600	700	1000	1200	600	600	1000
<i>S. aureus</i>	325	350	350	300	300	300	275	300	300
<i>B. cereus</i>	500	550	550	300	600	600	275	450	500
<i>L. monocytogenes</i>	325	475	500	275	350	400	200	225	225
<i>S. cerevisiae</i>	250	300	350	200	250	300	150	200	250

Tabella 14 - Concentrazioni minime inibenti e battericide dell'olio essenziale di timo utilizzato in questa sperimentazione nei confronti dei microrganismi Gram-negativi (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-positivi (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*), e lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*)

In generale l'olio essenziale di timo è risultato particolarmente efficace nei confronti di *S. cerevisiae*, *L. monocytogenes*, *B. cereus* e *S. aureus*. Infatti, in questo caso le MIC per inoculo pari a 2 log ufc/ml a 24h sono risultate in tutti i casi inferiori a 300 ppm. Solo *P. aeruginosa* è risultato particolarmente resistente all'olio essenziale di timo mostrando una MIC pari a 600 ppm per inoculo pari a 2 log ufc/ml dopo 24h.

Successivamente sono state eseguite delle prove di compatibilità organolettica dell'olio essenziale di timo in succo di carota. In particolare, sono state testate diverse concentrazioni di olio essenziale di timo comprese tra 10 e 150 ppm. Sulla base di valutazioni organolettiche da parte di un numero di 20 panelisti è stata stabilita la concentrazione di olio di timo pari a 60 ppm come quella più idonea ad essere utilizzata in succo di carota in combinazione con le altre tecnologie non termiche previste in questa sperimentazione.

7.3 DEFINIZIONE DELLE CONDIZIONI DI FERMENTAZIONE OTTIMALI IN SUCCO DI CAROTA CON IL CEPPPO DI *L. lactis* LBG2

I dati relativi ad un precedente lavoro riguardatane l'ottimizzazione della fermentazione di succo di carota con diversi ceppi appartenenti alla specie *L. lactis* e produttori di nisina, avevano indicato le ottime potenzialità del ceppo LBG2 per la fermentazione di succo di carota A 30°C (Figura 14).

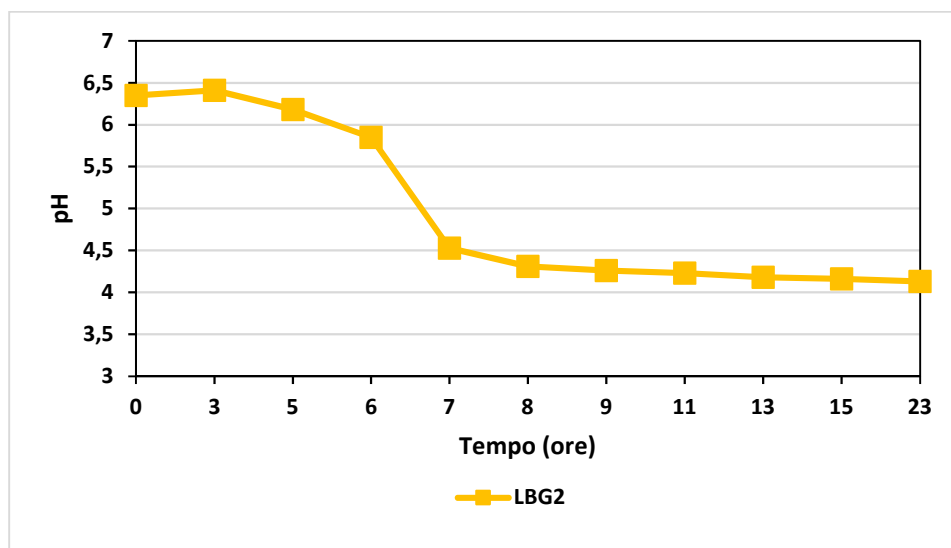


Figura 14 - Cinetica di acidificazione di succo di carota espresso come diminuzione di pH nel tempo su campione inoculato con il ceppo di *L. lactis* LBG2 ad un livello pari a 6 log ufc/ml e fermentato a 30 °C

Come evidenziato in figura il ceppo LBG2 ha mostrato una cinetica di acidificazione estremamente rapida rispetto a qualunque altro ceppo testato (dati non mostrati). Infatti, già dopo 7h il pH aveva raggiunto valori prossimi a 4,5. I dati ottenuti hanno anche mostrato come il ceppo LBG2 era in grado di produrre nisina nelle condizioni di fermentazione adottata e che questa quantità era pari a 12 mg/l dopo 9h di fermentazione, quantità superiore a quelle fatte registrare dagli altri ceppi nisina-produttori testati. Questi dati e informazioni relative a precedenti lavori ci hanno permesso di selezionare il lattococco LBG2 come agente fermentante di succo di carota. Inoltre, per quel che riguarda le condizioni di fermentazione, queste sono state svolte a 30 °C per 7 ore.

7.4 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO COMBINATO DELLE TECNOLOGIE NON TERMICHE SULLA SICUREZZA DI SUCCO DI CAROTA

Per valutare l'effetto del trattamento omogeneizzante (150 MPa per 3 cicli), di quello fermentativo (ceppo LBG2) e dell'uso di olio di timo (60 ppm) sulla sicurezza microbiologica di succo di carota, è stato effettuato un Challenge Test nei confronti di tre microrganismi patogeni, ovvero *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* volutamente inoculati nel prodotto. Essi sono stati inoculati ad un livello compreso tra 3 e 4 log ufc/mL in tutti i campioni di succo di carota; successivamente alcuni campioni sono stati sottoposti o meno al trattamento HPH (150 MPa per 3 passaggi) e, ove previsto, a fermentazione in presenza di *L. lactis* LBG2 (inoculato a livello di circa 6 log ufc/ml) e/o aggiunta di olio essenziale di timo (60ppm). I differenti trattamenti eseguiti hanno portato all'ottenimento di 8 diversi campioni (Tabella 15). Gli 8 campioni sono stati poi conservati a 30°C ed il carico microbico sia dei patogeni che del lattococco (ove inoculato) addizionato è stato rilevato dopo 4, 8 e 24 ore di conservazione. Trascorse le 24h a 30°C, tutti i campioni sono stati posti ad una temperatura di 4°C ed il carico microbico è stato rilevato dopo ulteriori 24 ore di conservazione a quest'ultima temperatura (ovvero T48 ore).

CAMPIONE	TRATTAMENTO EFFETTUATO
Campione 1 - controllo	Patogeni
Campione 2	HPH + patogeni
Campione 3	HPH + patogeni + LBG2 + timo
Campione 4	HPH + patogeni + timo
Campione 5	HPH + patogeni + LBG2
Campione 6	LBG2 + patogeni + timo
Campione 7	LBG2 + patogeni
Campione 8	Timo + patogeni

Tabella 15 - Campioni del Challenge Test

I carichi cellulari di *E. coli* nei diversi campioni di succo di carota e per i diversi tempi considerati, sono riportati in Tabella 16 e Figura 15 ed espressi come log ufc/mL.

<i>Escherichia coli</i> log ufc/mL					
	FERMENTAZIONE 30 °C				CONSERVAZIONE REFRIGERATA 4 °C
	T0h	T4h	T8h	T24h	T48h
NT	3,70±0,11	5,88±0,07	7,52±0,30	8,87±0,30	8,71±0,28
HPH	0,48±0,12	3,73±0,04	4,15±0,21	7,10±0,20	7,11±0,35
HPH+LBG2+Timo	0,48±0,12	3,19±0,20	2,24±0,20	Nd	nd
HPH+Timo	0,48±0,12	3,72±0,30	4,97±0,30	7,40±0,00	7,3±0,00
HPH+LBG2	0,48±0,12	3,80±0,09	2,54±0,09	Nd	nd
LBG2+Timo	3,45±0,15	5,08±0,08	4,49±0,08	1,87±0,18	nd
LBG2	3,70±0,11	5,48±0,15	4,88±0,15	2,34±0,20	nd
Timo	3,45±0,15	5,58±0,05	6,02±0,05	8,48±0,32	8,23±0,23

Nd: al di sotto del limite di rilevabilità

Tabella 16 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di *E. coli* negli 8 campioni di succo di carota, conservato a 30°C e poi 4°C, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH

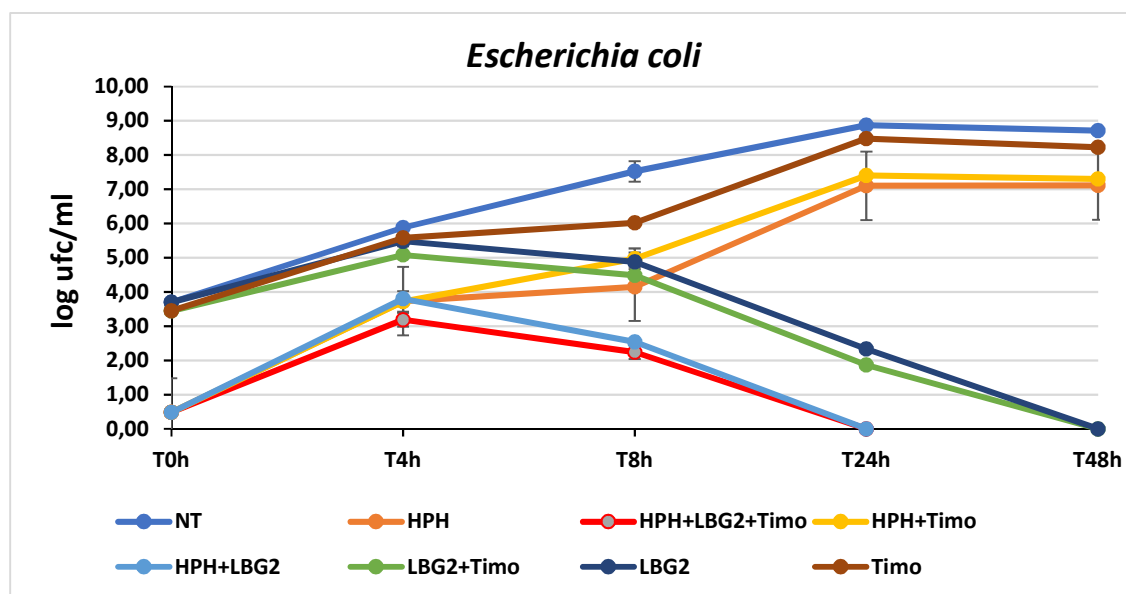


Figura 15 - Cinetiche di sviluppo/disattivazione di *E. coli* negli 8 campioni di succo di carota, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH

Come osservabile da Tabella e Figura, il trattamento di omogeneizzazione ha causato una riduzione iniziale di *E. coli* di circa 4 cicli logaritmici, infatti i campioni non sottoposti al trattamento di omogeneizzazione hanno registrato un carico compreso tra 3,7 - 4,5 log ufc/mL, mentre a seguito del trattamento HPH il carico è risultato pari a 0,48 log ufc/mL; dopo 4 ore il carico dei campioni non trattati HPH ha subito un aumento di quasi 2 cicli logaritmici, mentre

quelli trattati HPH hanno fatto registrare un aumento di 3 cicli log indipendentemente dall'aggiunta del ceppo LBG2 o dell'olio di timo. Dopo 8 ore, invece, sono stati definiti due diversi comportamenti dei campioni, poiché: i campioni NT, Timo, HPH e HPH+Timo hanno continuato a far registrare un più o meno accentuato incremento del carico microbico fino a oltre 8 log ufc/mL alle 24 ore di conservazione nei campioni NT e timo e oltre 7 log ufc/mL nei campioni HPH e HPH+timo, per poi rimanere stabile nelle ulteriori 24 ore in refrigerazione.

In tutti i campioni addizionati del ceppo LBG2, indipendentemente dal trattamento iperbarico e dall'aggiunta di olio essenziale di timo, a partire dalle 4h si è osservata una forte riduzione del carico microbico di *E. coli*, con una simile cinetica, che ha portato il carico del patogeno al di sotto del limite di rilevabilità dopo 24h per i campioni HPH+LBG2 e HPH+LBG2+timo, e dopo 48h nel caso dei campioni LBG2 e LBG2+timo.

Per quanto riguarda invece l'effetto dei diversi trattamenti sul carico cellulare di *S. aureus* in succo di carota e nei diversi tempi di campionamento, i risultati sono riportati in Tabella 17 e Figura 16 e i valori sono espressi come log ufc/mL.

<i>Staphylococcus aureus</i> log ufc/mL					
	FERMENTAZIONE 30 °C				CONSERVAZIONE REFRIGERATA 4 °C
	T0h	T4h	T8h	T24h	T48h
NT	4,45±0,07	5,86±0,15	7,39±0,01	8,13±0,18	8,36±0,28
HPH	4,33±0,08	5,61±0,20	7,84±0,09	8,81±0,12	8,64±0,11
HPH+LBG2+Timo	4,36±0,09	5,55±0,20	6,19±0,01	5,16±0,45	3,90±0,25
HPH+Timo	4,36±0,09	5,40±0,09	6,68±0,01	7,95±0,24	6,56±0,20
HPH+LBG2	4,33±0,09	5,72±0,13	6,31±0,13	5,25±0,04	4,02±0,59
LBG2+Timo	4,15±0,12	5,14±0,20	6,20±0,24	4,74±0,04	4,21±0,32
LBG2	4,45±0,12	6,14±0,27	6,16±0,15	4,63±0,21	3,57±0,24
Timo	4,15±0,12	5,85±0,16	6,57±0,07	7,77±0,18	6,66±0,38

Tabella 17 - Carico cellulare (log ufc/mL) a diversi tempi di conservazione di *S. aureus* negli 8 campioni di succo di carota, conservato a 30°C per 24h e poi a 4°C per ulteriori 24h, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH

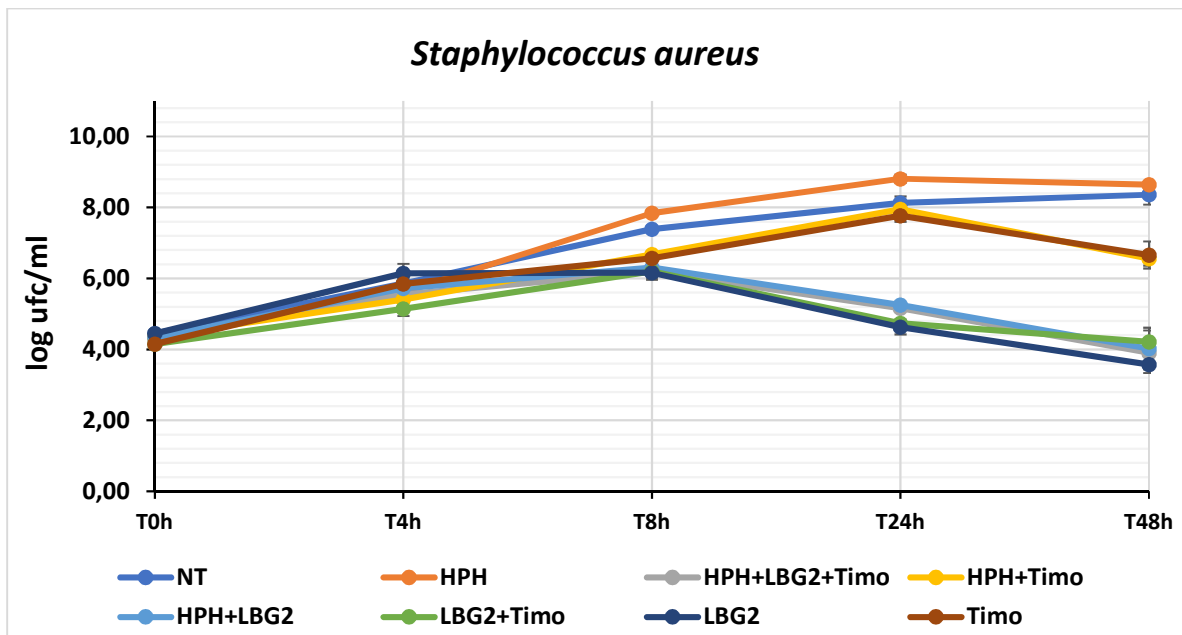


Figura 16 - Cinetiche di sviluppo/disattivazione di *S. aureus* negli 8 campioni di succo di carota, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH

Come osservabile in Tabella e Figura, nel caso di *S. aureus* tutti i campioni avevano un carico iniziale di circa 4,5 log ufc/mL, il trattamento HPH iniziale non ha causato un elevato decremento del carico microbico di questo patogeno (circa 0,5 log ufc/ml). In tutti i campioni è stato osservato un incremento del carico di *S. aureus* dopo 4h e compreso tra 0,7 e 1,7 log ufc/ml.

Un ulteriore incremento del carico cellulare del patogeno alle 8 ore di conservazione è stato osservato per i campioni NT e HPH dove superava i 7,0 log ufc/ml. Tuttavia, anche per i campioni timo e HPH+timo, anche se più lentamente rispetto ai campioni precedenti, si osservava un incremento del carico del patogeno che raggiungeva valori di circa 6,5 log ufc/ml. Per questi campioni è stato osservato un ulteriore incremento del carico di *S.aureus* dopo 24h e una successiva riduzione di circa 1,5 cicli logaritmici dopo le ulteriori 24h di conservazione refrigerata ma solo nei campioni contenenti timo. Al contrario, nei campioni contenenti il ceppo LBG2, indipendentemente dal trattamento HPH e dall'aggiunta dell'olio essenziale di timo, si è osservato un mantenimento del carico di *S. aureus* dopo 8h, rispetto a quanto osservato alle 4h; mentre dopo 24 e 48h è stato registrato un decremento del carico del patogeno compreso tra 1,0 e 1,5 log ufc/ml alle 24h e di un ulteriore ciclo logaritmico dopo 48h, e con una simile cinetica.

Infine, l'effetto dei vari trattamenti alternativi al trattamento termico è stato valutato anche su *L. monocytogenes* nei diversi campioni di succo di carota e nei diversi tempi di analisi (Tabella 18 e Figura 17), le cinetiche di disattivazione rilevate sono riportate come log ufc/mL.

<i>Listeria monocytogenes</i> log ufc/mL					
	FERMENTAZIONE 30 °C				CONSERVAZIONE REFRIGERATA 4 °C
	T0h	T4h	T8h	T24h	T48h
NT	4,38±0,07	4,46±0,45	6,04±0,07	7,49±0,24	7,41±0,14
HPH	3,00±0,21	2,86±0,11	4,28±0,30	5,40±0,11	4,08±0,15
HPH+LBG2+Timo	2,73±0,07	2,97±0,13	0,95±0,20	nd	nd
HPH+Timo	2,73±0,09	2,77±0,15	4,36±0,19	5,68±0,1	4,92±0,79
HPH+LBG2	3,00±0,08	3,57±0,12	1,18±0,19	nd	nd
LBG2+Timo	3,97±0,27	4,78±0,20	1,54±0,24	nd	nd
LBG2	4,38±0,20	5,07±0,03	1,79±0,14	nd	nd
Timo	3,97±0,30	4,41±0,13	6,23±0,20	7,66±0,07	7,75±0,07

Nd: al di sotto del limite di rilevabilità

Tabella 18 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di *L. monocytogenes* negli 8 campioni di succo di carota, conservato a 30°C e poi 4°C, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH

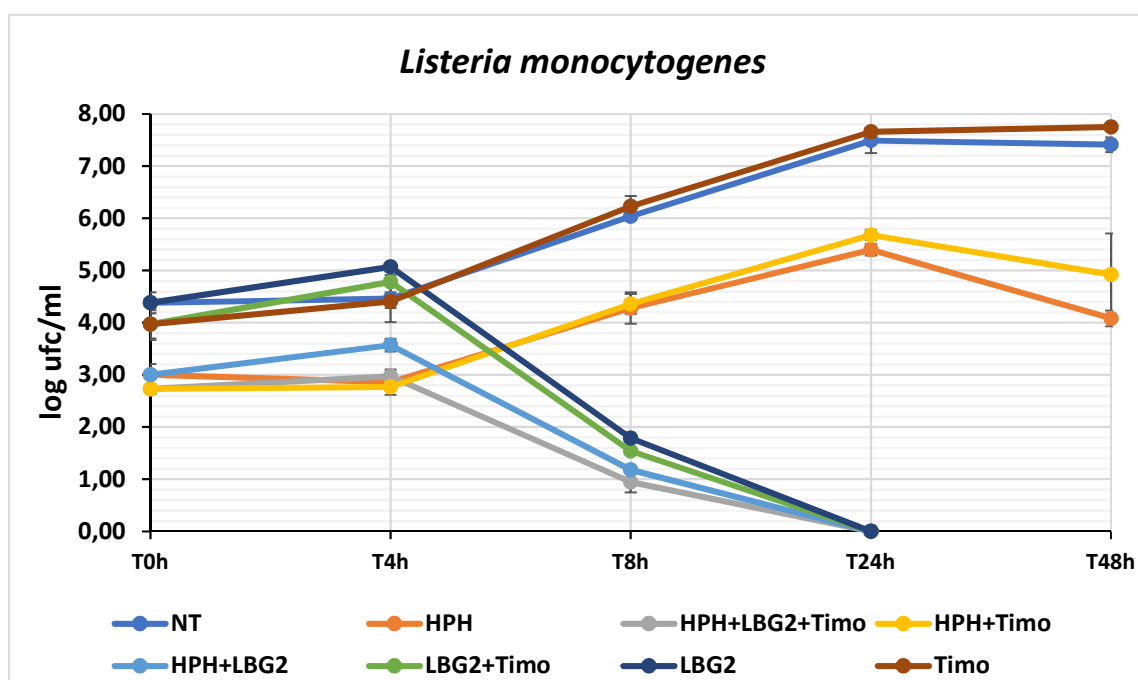


Figura 17 - Cinetiche di sviluppo/disattivazione di *L. monocytogenes* negli 8 campioni di succo di carota, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH conservati a 30°C per 24h e successive 24h a 4°C

In questo caso il carico microbico di partenza dei campioni trattati con le HPH era compreso tra 2,73 e 3,0 log ufc/mL; mentre per i campioni non trattati HPH il carico al tempo iniziale era compreso tra 3,97 e 4,38 log ufc/mL. Per cui il trattamento iperbarico ha causato una riduzione del carico di *Listeria* compreso tra 1,4 e 1,7 log ufc/ml. Dopo 4 ore di conservazione il carico del patogeno in tutti i campioni non subiva particolari incrementi rispetto al carico iniziale. Successivamente, per alcuni campioni è stata osservata una elevata inibizione nei confronti di

Listeria. Infatti, i campioni LBG2, LBG2+Timo, HPH+LBG2+timo e HPH+LBG2 dopo 8 ore hanno fatto registrare un carico del patogeno compreso tra 1,0 e 1,2 log ufc/ml nei campioni HPH+LBG2+timo e HPH+LBG2 e compreso tra 1,5 e 1,8 log ufc/ml nei campioni LBG2 e LBG2+timo. In tutti i campioni contenenti il ceppo LBG2 il carico di *Listeria* scendeva al di sotto del limite di rilevabilità dopo 24h.

I campioni HPH e NT non hanno fatto registrare alcuna attività anti-*Listeria*, infatti il carico del patogeno in questi campioni aumentava velocemente sino a raggiungere la fase stazionaria di crescita dopo 24h. Al contrario, i campioni HPH+timo e Timo hanno permesso rallentare la cinetica di crescita di *Listeria* senza tuttavia inibirne completamente lo sviluppo.

Nei campioni in cui era prevista la presenza del ceppo LBG2 ne è stata valutata la cinetica di crescita nel tempo come osservabile da Tabella 19 e Figura 18.

	LBG2 log ufc/mL				
	FERMENTAZIONE 30 °C				CONSERVAZIONE REFRIGERATA 4 °C
	T0h	T4h	T8h	T24h	T24h
HPH+LBG2+Timo	5,96±0,01	8,19±0,06	9,11±0,25	9,98±0,31	9,81±0,24
HPH+LBG2	6,01±0,01	8,36±0,18	9,61±0,32	10,00±0,01	10,04±0,34
LBG2+Timo	5,86±0,12	8,36±0,07	9,13±0,27	10,00±0,21	9,97±0,28
LBG2	5,95±0,12	8,67±0,23	9,49±0,15	10,15±0,28	10,06±0,27

Tabella 19 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di LBG2 nei campioni di succo di carota, conservato a 30°C e poi 4°C

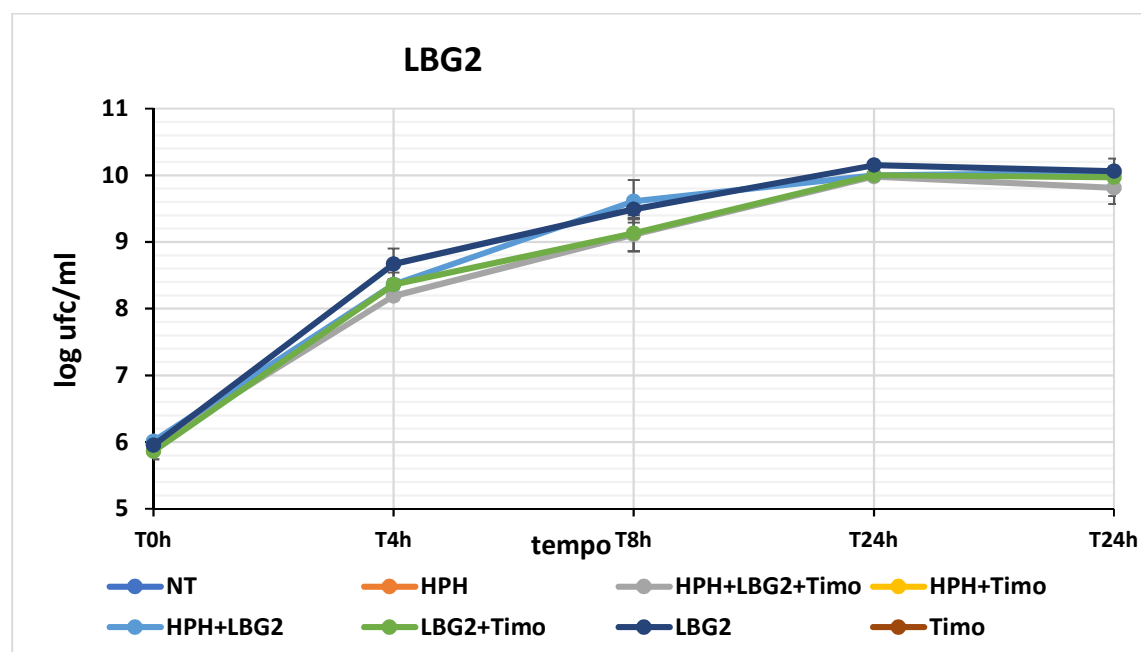


Figura 18 - Cinetiche di sviluppo di LBG2 nei campioni di succo di carota

Come osservabile in Tabella e Figura, il carico cellulare iniziale del ceppo LBG2 nei campioni di succo di carota contenenti i patogeni era compreso tra valori di 5,86 log ufc/mL e 6,01 log ufc/mL. Dopo 4 ore di fermentazione a 30°C il carico è aumentato di 3 cicli logaritmici fino ad arrivare, dopo 24 ore, a valori compresi tra 9,98 e 10,15 log ufc/mL, indipendentemente dal trattamento subletale con cui era combinato. Nelle successive 24 ore in refrigerazione il carico di LBG2 è rimasto pressoché identico.

I dati ottenuti indicano come la fermentazione da parte del ceppo LBG2 sia stato il trattamento non termico ad avere il maggior effetto di inibizione nei confronti dei microrganismi patogeni utilizzati nel challenge test. Infatti, nel caso di *S. aureus* tutti i campioni contenenti il lattococco, indipendentemente dalla combinazione con gli altri trattamenti impiegati (HPH e olio essenziale di timo), hanno mostrato i maggiori effetti di inibizione non consentendo lo sviluppo del patogeno durante le 24h di conservazione a 30°C e le successive 24h a 4°C. Anche nel caso di *L. monocytogenes*, nonostante il trattamento HPH abbia consentito di ridurre il carico di circa 1 ciclo logaritmico, l'effetto di inibizione principale è dovuto alla fermentazione da parte del ceppo LBG2 che ha consentito per tutti i campioni che lo contenevano la disattivazione del patogeno entro le 24 ore. Anche nel caso di *E. coli* l'effetto principale è stato quello della fermentazione del ceppo LBG2 che ha consentito di ridurre il carico entro le 24h quando combinato con HPH e 48h quando non combinato con il trattamento iperbarico. In generale i risultati indicano come l'acidificazione indotta dal ceppo LBG2, che in 7h è stato in grado di portare il pH del campione a valori vicini a 4,5, sia stato il fattore maggiormente inibente per tutti i patogeni testati. D'altra parte, ceppi come *L. monocytogenes* e *E. coli* sono riportati come estremamente sensibili a bassi valori di pH sia in sistemi modello che in sistemi alimentari (Gut et al., 2006).

Inoltre, dati precedenti indicano come nelle condizioni adottate in questa sperimentazione il ceppo LBG2 sia in grado di produrre elevate quantità di nisina la quale incrementa la sua efficacia e stabilità quando si trova in ambienti con pH acido (Gharsallaoui et al., 2016). Nonostante sia stata osservata una inibizione della crescita di *S. aureus* in presenza del ceppo LBG2 non è stata comunque osservata in nessun caso una disattivazione completa di questo patogeno. D'altra parte, *S. aureus* è un microrganismo molto resistente a diverse condizioni di stress come irradiazione, shock osmotico, pressione, NaCl e trattamenti termici (Ma et al., 2019).

Il trattamento con le alte pressioni di omogeneizzazione non ha avuto un effetto significativo di riduzione del carico di *S. aureus*, che d'altra parte è riportato come molto resistente alla tecnologia. Al contrario, il trattamento HPH è risultato estremamente efficace nei confronti di *E. coli* mentre ha avuto un effetto intermedio su *L. monocytogenes*.

Come riportato in letteratura l'efficacia dei trattamenti iperbarici risulta maggiore nei confronti di microrganismi Gram negativi infatti la conformazione della loro parete cellulare priva di peptidoglicano fa sì che risultino estremamente sensibili alle alte pressioni di omogeneizzazione le quali sono in grado di inattivare le cellule vegetative principalmente attraverso la distruzione meccanica della parete cellulare causata dalla pressione e dai gradienti di velocità, turbolenza e cavitazione che si riscontrano in un liquido sottoposto a questo tipo di trattamento (Wuytack et al., 2002).

Escherichia coli è stato comunque parzialmente in grado di recuperare dal danno subito con il trattamento di omogeneizzazione che d'altra parte, se le condizioni del mezzo sono molto ricche in nutrienti, può risultare in un danno subletale consentendo il recupero delle cellule nel tempo (Patrignani & Lanciotti, 2016). Tuttavia, la successiva acidificazione con il ceppo LBG2 ha portato alla completa disattivazione del patogeno. Al contrario l'aggiunta di olio essenziale di timo non ha portato ad effetti antimicrobici additivi sulle cinetiche di disattivazione dei patogeni testati. Nei campioni in cui era addizionato solo o in combinazione con HPH non ha mai consentito di disattivare i patogeni testati ma ha solo consentito di ridurre, senza inibirla, la cinetica di crescita di questi microrganismi. In particolare, il maggior effetto inibitorio è stato osservato nel caso di *L. monocytogenes*. D'altra parte, per una questione di accettabilità organolettica del prodotto, la concentrazione di olio di timo utilizzata in questa sperimentazione era piuttosto bassa ed inferiore anche ai valori di MIC registrate nei confronti dei microrganismi patogeni utilizzati in questo Challenge Test.

7.5 VALUTAZIONE DELL'EFFETTO COMBINATO DELLE TECNOLOGIE NON TERMICHE SULLA SHELF-LIFE DI SUCCO DI CAROTA

Per studiare l'effetto combinato o meno di fermentazione, trattamento HPH e aggiunta di olio essenziale di timo sulla shelf-life microbiologica di succo di carota è stato messo a punto un piano sperimentale.

I campioni previsti dal piano sperimentale sono quelli riportati in Tabella 20.

CAMPIONE	TRATTAMENTO EFFETTUATO
Campione 1 - controllo	NON TRATTATO
Campione 2	HPH
Campione 3	HPH+timo
Campione 4	HPH+LBG2+timo
Campione 5	HPH+LBG2

Tabella 20 - Distinzione dei campioni in base ai trattamenti effettuati

Per i campioni NT (controllo), HPH e HPH+Timo, ove non era prevista fermentazione, i campioni sono stati suddivisi e posti a 2 differenti temperature di conservazione pari a 4 e 10°C. Nel caso dei campioni HPH+LBG2+Timo e HPH+LBG2, ove era prevista fermentazione da parte del ceppo LBG2, tutti i campioni sono stati posti a 30°C per il processo fermentativo della durata di 7h e successivamente suddivisi e posti alle due temperature di conservazione previste pari a 4 e 10°C.

Per quel che riguarda i campioni 4 e 5 in cui era prevista la fermentazione da parte del ceppo LBG2 è stata monitorata la cinetica di acidificazione per verificare che fossero confermate le cinetiche relative a precedenti sperimentazioni e per valutare che non ci fosse un effetto inibente da parte dell'olio essenziale di timo sul ceppo LBG2 (Figura 19).

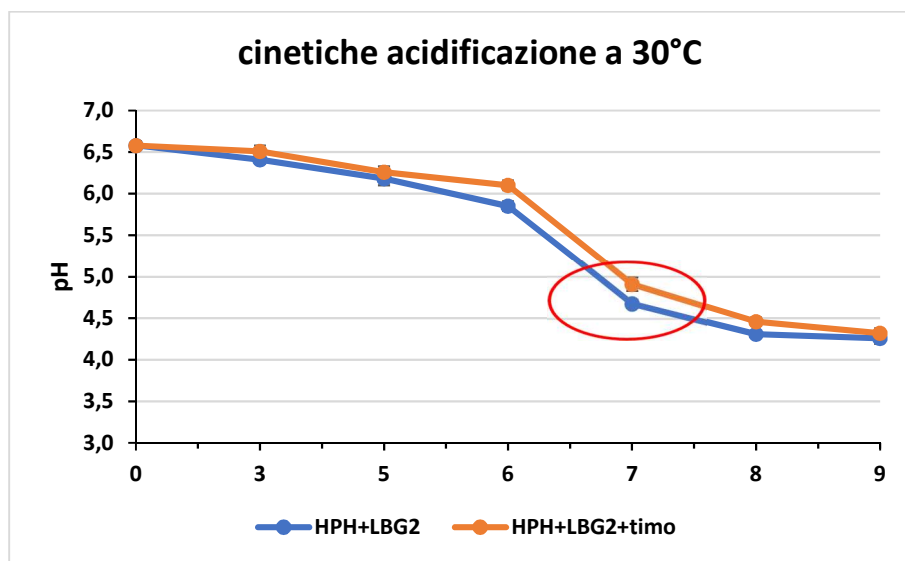


Figura 19 - Cinetica di acidificazione di LBG2 a 30°C nei campioni HPH+LBG2 e HPH+LBG2+Timo

Com'è osservabile dalla Figura 19 le cinetiche di acidificazione da parte del ceppo LBG2 hanno confermato quanto era stato osservato in precedenti sperimentazioni in cui era riportato come questo ceppo fosse in grado di acidificare al di sotto di valori di pH di 5 entro 7 ore a 30°C. Nel caso dell'aggiunta combinata dell'olio essenziale di timo l'effetto sulla cinetica di acidificazione è risultato trascurabile e anche in questo caso dopo 7 ore il pH risultava al di sotto di 5. I campioni sono stati raccolti dopo 7 ore di fermentazione e posti a 10 e 4°C per le simulazioni di shelf-life. I valori di pH raggiunti rispettivamente dal campione HPH+LBG2 e HPH+LBG2+Timo erano 4,68 e 4,89.

CAMPIONI CONSERVATI A 10°C:

Per quanto riguarda i campioni conservati a 10°C, la carica mesofila totale (CMT), nei diversi campioni di succo di carota e nei diversi tempi di analisi, è riportata in Tabella 21 e Figura 20 ed espressa come log ufc/mL.

Carica mesofila totale log ufc/mL - campioni a 10°C					
	T0	T1	T2	T5	T7
NT	5,15±0,19	5,69±0,37	6,35±0,21	9,00±0,19	-
HPH	4,17±0,19	4,31±0,23	4,71±0,18	6,40±0,80	9,08±0,48
HPH+timo	4,17±0,19	4,00±0,43	4,32±0,21	6,08±1,00	9,08±0,39
HPH+LBG2+timo	4,47±0,18	3,80±0,28	4,11±0,14	4,08±0,30	4,00±0,43
HPH+LBG2	4,09±0,12	3,89±0,16	3,30±0,23	3,78±0,40	3,92±0,11

- : assenza di dato per raggiungimento di spoilage microbico

Tabella 21 – Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo della CMT nei campioni di succo di carota conservati a 10°C

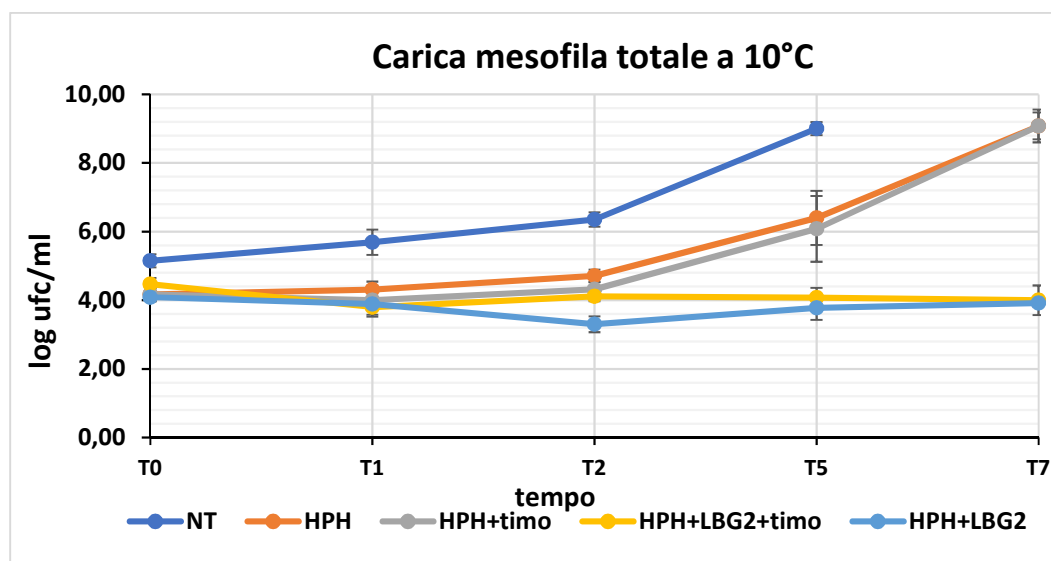


Figura 20 – Cinetiche di sviluppo della CMT nei campioni conservati a 10°C

Per quel che riguarda la CMT iniziale, i campioni di controllo non sottoposti a trattamento HPH presentavano un carico di 5,15 log ufc/mL; tutti i campioni trattati HPH hanno mostrato un carico iniziale simile tra loro e compreso tra 4,09 e 4,4 log ufc/mL, quindi circa un ciclo logaritmico inferiore rispetto al controllo. Ovviamente nei campioni fermentati con il ceppo LBG2 non è stata considerata nella CMT il carico dei lattococchi inoculati nel prodotto. Il campione di controllo ha mostrato un rapido incremento della CMT che superava i 6 log ufc/mL dopo 2 giorni di stoccaggio e 9 log ufc/mL dopo 5 giorni, superando dunque ampiamente i limiti di spoilage per questa categoria microbica e questi prodotti, ragione per cui non è stato considerato nei tempi di campionamento successivi. I campioni HPH e HPH+Timo hanno mostrato una simile cinetica per quel che riguarda la CMT, infatti sino a 2 giorni di conservazione il carico risultava compreso tra 4,3 e 4,7 log ufc/mL e superava valori di 6 log ufc/mL dopo 5 giorni. Al 7° giorno erano raggiunti i 9 log ufc/mL in entrambi i campioni. Nei campioni in cui era presente il ceppo LBG2, la CMT non ha mostrato significativi incrementi rispetto al carico iniziale di 4 log ufc/mL sino al 7° giorno di conservazione.

Per quel che riguarda i coliformi totali, nei campioni sottoposti a trattamento di omogeneizzazione il carico risultava pari a 0,9 log ufc/mL di circa 2,5 cicli logaritmici inferiore rispetto al controllo non sottoposto a trattamento HPH. Nei campioni trattati HPH e sottoposti a successiva fermentazione si è osservato un incremento della presenza di coliformi che risultavano compresi tra 1,59 e 1,78 log ufc/mL indipendentemente dalla presenza di timo. Durante 5 giorni di conservazione a 10°C nei campioni trattati HPH ma non fermentati è stato riscontrato un leggero aumento del carico dei coliformi che tuttavia non superavano il carico di 2,05 log ufc/mL per il campione HPH e 1,64 log ufc/mL per il campione HPH+Timo; al contrario, nei campioni fermentati con il ceppo LBG2 è stata osservata una diminuzione del carico di coliformi che risultavano al di sotto di 1 log ufc/mL già dopo 2 giorni di conservazione. Nel controllo il carico di coliformi è rimasto più alto rispetto agli altri campioni per tutto il periodo di stoccaggio e pari a circa 4 log ufc/mL.

Coliformi log ufc/mL - campioni a 10°C

	T0	T1	T2	T5
NT	3,38±0,14	4,15±0,09	3,40±0,12	3,70±0,12
HPH	0,90±0,08	1,77±0,24	1,95±0,08	2,05±0,14
HPH+timo	0,90±0,10	1,43±0,18	1,59±0,01	1,64±0,19
HPH+LBG2+timo	1,59±0,09	1,08±0,14	0,90±0,09	0,95±0,08
HPH+LBG2	1,78±0,12	0,95±0,18	0,85±0,10	0,99±0,09

Tabella 22 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo dei coliformi nei campioni di succo di carota conservati a 10°C

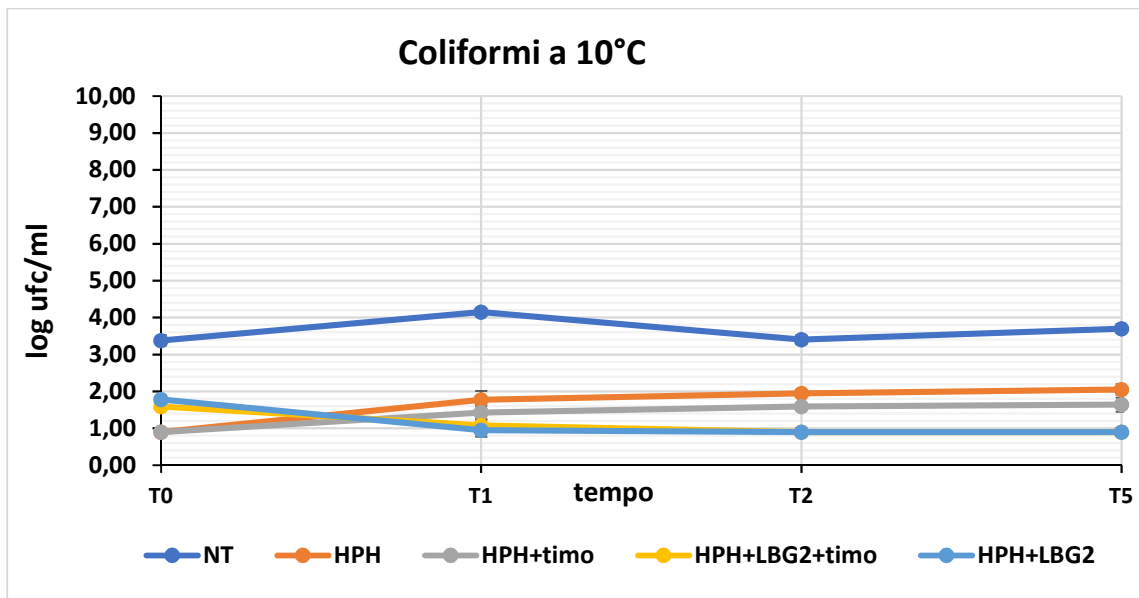


Figura 21 - Cinetiche di sviluppo dei coliformi nei campioni conservati a 10°C

In Tabella 23 e Figura 22 è invece riportato il carico di lieviti osservato durante la conservazione a 10°C.

Nel campione di controllo il carico di lieviti risultava superiore a 4 log ufc/mL già al secondo giorno di conservazione e al 5° giorni veniva superato il livello di 6 log ufc/mL. In tutti i campioni trattati HPH il carico di lieviti è risultato inferiore a 5 log ufc/mL per tutto il periodo di conservazione, non risultando dunque il principale agente di spoilage per questi campioni.

Lieviti log ufc/mL - campioni a 10°C

	T2	T5	T7
NT	4,45±0,04	6,14±0,09	-
HPH	3,72±0,03	4,72±0,34	3,00±0,19
HPH+timo	3,81±0,13	4,09±0,20	3,78±0,14
HPH+LBG2+timo	3,53±0,12	3,37±0,12	3,42±0,54
HPH+LBG2	3,54±0,11	3,67±0,20	3,63±0,19

Tabella 23 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo dei lieviti nei campioni di succo di carota conservati a 10°C

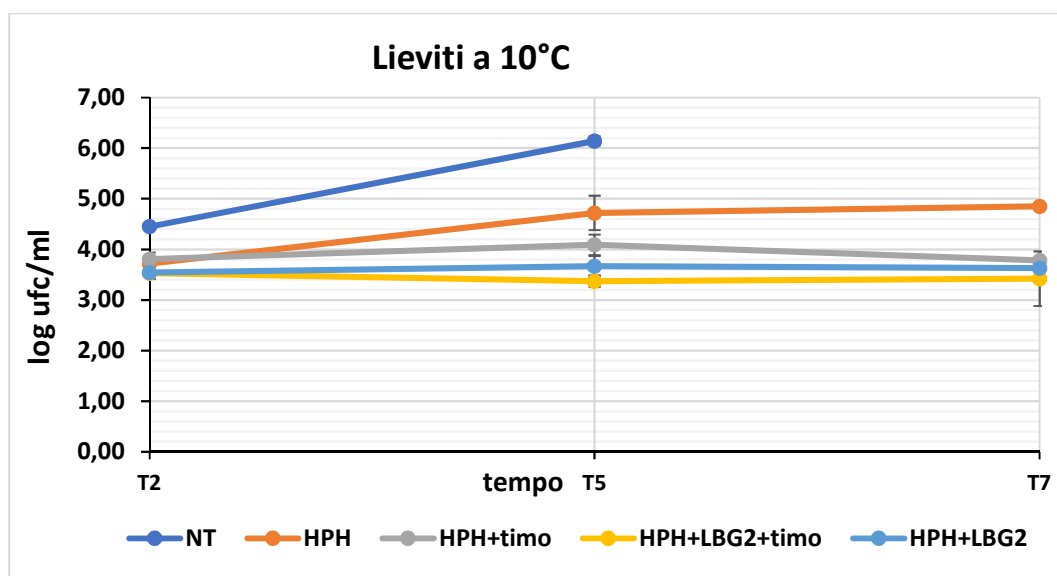


Figura 22 - Cinetiche di sviluppo dei lieviti nei campioni conservati a 10°C

Per quel che riguarda il lattococco LBG2 utilizzato come agente fermentante nei campioni HPH+LBG2+Timo e HPH+LBG2, il carico cellulare rilevato durante la conservazione a 10°C è riportato in Tabella 24 e Figura 23.

LBG2 log ufc/mL - campioni a 10°C					
	T0	T1	T2	T5	T7
HPH+LBG2+timo	10,00±0,20	8,90±0,25	9,37±0,83	9,37±0,46	8,89±0,15
HPH+LBG2	9,90±0,30	9,30±0,37	9,39±0,12	9,91±0,01	9,07±0,01

Tabella 24 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di LBG2 nei campioni di succo di carota conservati a 10°C

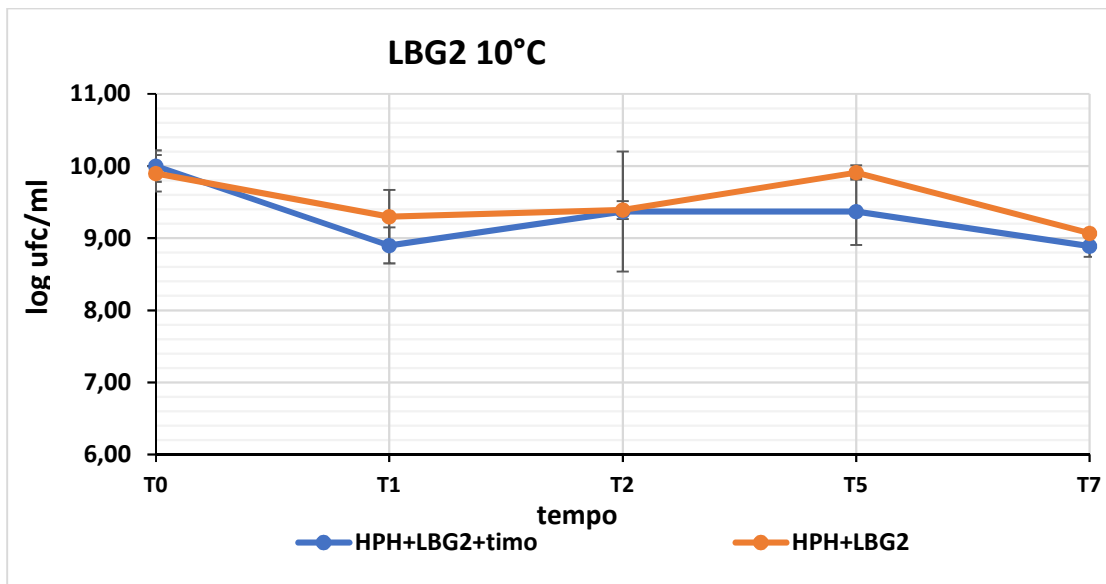


Figura 23 - Cinetiche di sviluppo di LBG2 nei campioni conservati a 10°C

Come osservabile in Tabella e Figura, il carico iniziale, indipendentemente dal campione, risultava vicino a 10 log ufc/mL. Durante la conservazione è stata riscontrata una leggera diminuzione del carico del lattococco che in entrambi i campioni risultava pari a circa 9 log ufc/mL dopo 7 giorni di conservazione.

I dati relativi al pH dei campioni conservati a 10°C sono riportati in Figura 24.

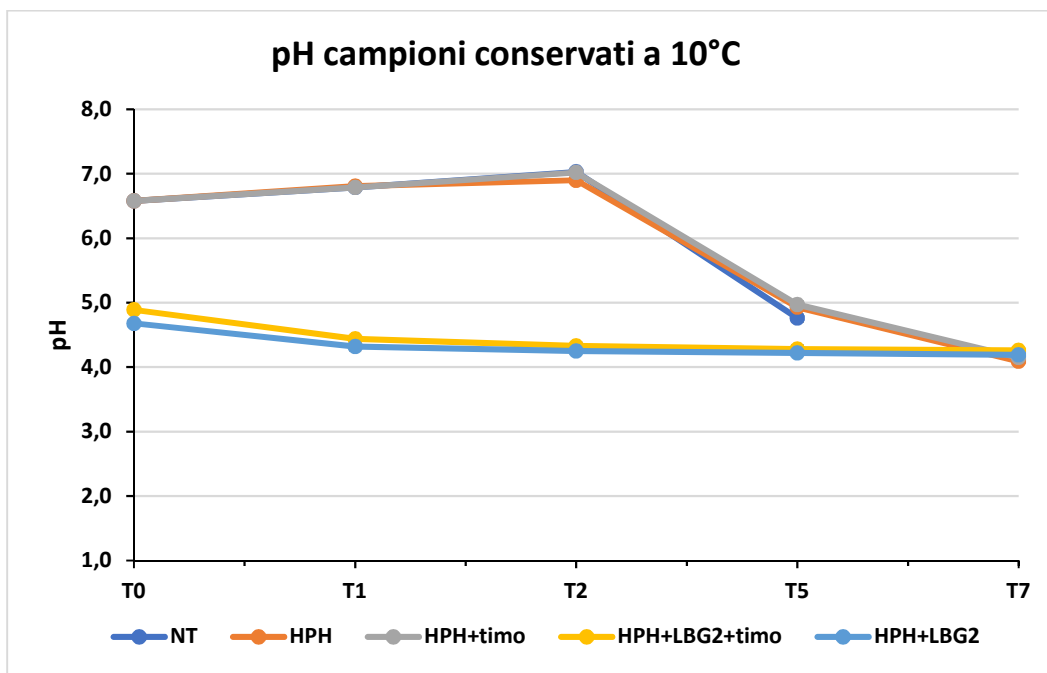


Figura 24 - pH dei campioni conservati a 10°C

Come osservabile in Figura, i campioni fermentati con il ceppo LBG2 presentavano valori iniziali di pH compresi tra 4,7 e 4,9. Questi valori sono rimasti più o meno stabili durante tutto il periodo di conservazione e dopo 7 giorni risultavano compresi tra 4,2 e 4,3. Al contrario, nei campioni non fermentati è stata osservata una acidificazione del prodotto, rispetto ai pH iniziali pari a 6,6, a partire dal 5° giorno di conservazione quando il pH risultava inferiore a 5 e scendeva ulteriormente dopo 7 giorni. Questa acidificazione è imputabile allo sviluppo microbico osservato nei campioni a partire dal 5° giorno di conservazione.

I dati microbiologici dei campioni conservati a 10°C evidenziano le ottime potenzialità del ceppo LBG2 combinato con le HPH per stabilizzare il succo di carota, infatti il carico mesofilo totale, che ha rappresentato la principale categoria microbica di spoilage per il prodotto considerato, non ha subito incrementi nei campioni fermentati sino al 7° giorno di conservazione. Per quel che riguarda i limiti guida di spoilage della CMT in succhi di frutta non pastorizzati, questi risultano essere pari a 6 log ufc/mL (Linee guida, 2013). Nei campioni fermentati non veniva mai superato questo limite per tutti i 7 giorni di stoccaggio considerati. Al contrario, il campione di controllo superava questo limite già dopo 2 giorni, mentre i campioni HPH e HPH+Timo superavano il limite di 6 log ufc/mL dopo 5 giorni di conservazione. L'effetto positivo sulla shelf-life da parte della fermentazione con il ceppo LBG2 è principalmente ascrivibile al pH iniziale di questi campioni che risultava al di sotto di 5. Ciò ha rappresentato, assieme alla produzione di nisina da parte dei lattococchi, il principale fattore limitante della crescita dei microrganismi degradativi. L'effetto dell'aggiunta dell'olio di timo non ha portato a significativi incrementi di shelf-life rispetto agli altri trattamenti stabilizzanti utilizzati.

Per quel che riguarda i coliformi, il trattamento di omogeneizzazione ha consentito una riduzione elevata del carico di questa categoria ascrivibile al fatto che essendo microrganismi Gram negativi sono risultati estremamente sensibili ai trattamenti iperbarici (Wuytack et al., 2002). Inoltre, nei campioni trattati non sono stati osservati incrementi significativi del carico di coliformi e anzi nei campioni fermentati è stata osservata una ulteriore riduzione legata soprattutto ai bassi valori di pH e alla temperatura di conservazione non ottimale per questi microrganismi.

Nel caso dei lieviti solo il campione non trattato superava il limite di 6 log ufc/mL, considerato di spoilage per questa categoria di prodotti (Linee Guida, 2013).

Nelle figure 25, 26 e 27 sono riportati i parametri di colore L*, a* e b* dei campioni di succo di carota, sottoposti ai diversi trattamenti e conservati a 10°C.

Il colore è uno dei parametri di qualità per determinare la freschezza di questi prodotti. Il valore ΔE indica l'entità della differenza di colore e viene calcolato utilizzando l'equazione

$$\Delta E = [(L^* - L^*0)^2 + (a^* - a^*0)^2 + (b^* - b^*0)^2]^{1/2}$$

dove L^*0 , a^*0 e b^*0 sono i valori $L^*a^*b^*$ all'inizio della conservazione (Liu et al., 2019).

I risultati sono stati espressi con le coordinate CIELab, ovvero uno spazio tridimensionale dove L^* è la luminosità che va dal valore 0 (nero) al valore 100 (bianco), a^* che rappresenta valori dal verde (-) al rosso (+), e b^* che rappresenta valori dal blu (-) al giallo (+).

Sono state calcolate la media e la deviazione standard di tali valori numerici per ogni campione e per ogni tempo di analisi, al fine di ottenere una panoramica riguardante la variazione di colore in base al trattamento subito.

Per quel che riguarda la luminosità (Figura 25) dei campioni quelli trattati HPH presentavano dei valori inferiori rispetto al campione non trattato, successivamente durante la conservazione non sono state riscontrate particolari differenze rispetto al valore iniziale per tutti i campioni considerati.

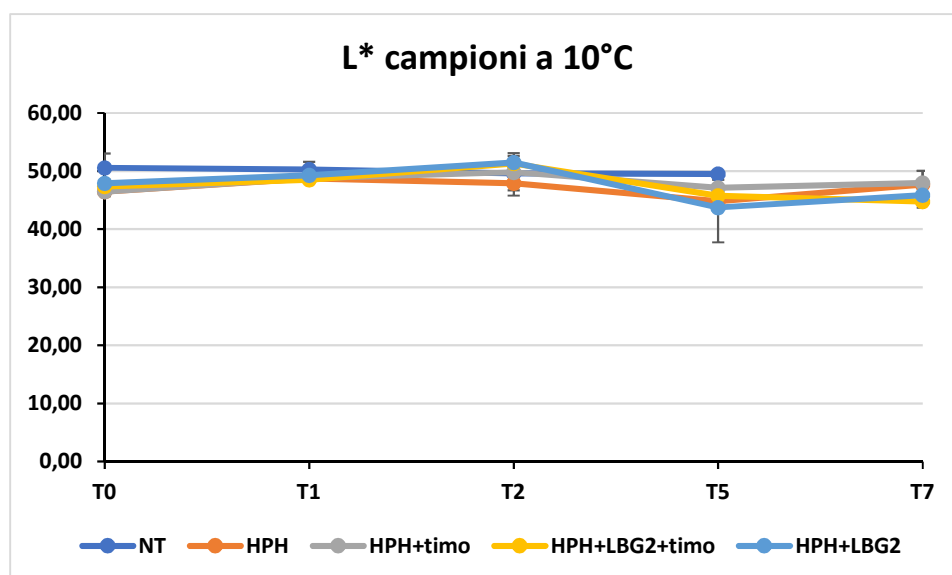


Figura 25 - Andamento, nel tempo, del parametro L^* nei campioni conservati a 10°C

Per quanto riguarda il parametro a^* (Figura 26), è risultato positivo per tutti i campioni quindi si deduce che la componente maggiore è quella del colore rosso, data l'elevata presenza di carotenoidi contenuti nel succo di carota.

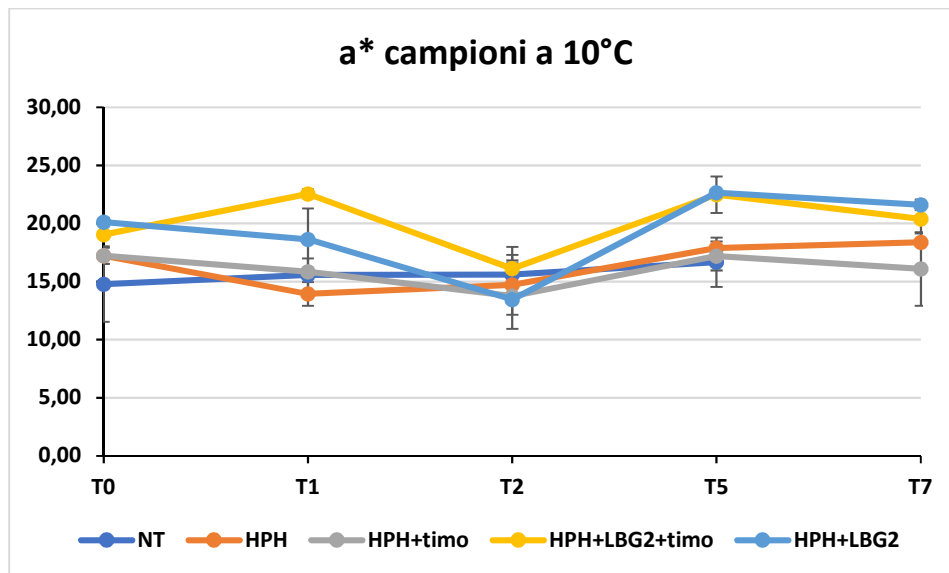


Figura 26 - Andamento, nel tempo, del parametro a* nei campioni conservati a 10°C

I valori di a* al tempo iniziale sono apparsi maggiori nei campioni trattati con le HPH rispetto a quello non trattato. Nei tempi successivi non è stata osservata una significativa variazione della componente di colore a* indipendentemente dal campione considerato. Per cui si può dire che con la conservazione a 10°C la componente rossa non subisce alterazioni.

Anche nel caso della componente b* (Figura 27) sono state riscontrate delle differenze tra i campioni al tempo iniziale, in particolare il campione di controllo mostrava i valori più bassi di questa componente, i campioni HPH e HPH+Timo i valori intermedi, mentre i campioni fermentati i valori più alti in assoluto. Essendo b* la componente del colore giallo, si può dedurre che i campioni fermentati hanno presentato una colorazione gialla più spiccata rispetto agli altri campioni. Nel corso della conservazione, come prevedibile, è stata osservata una diminuzione di b* per tutti i campioni.

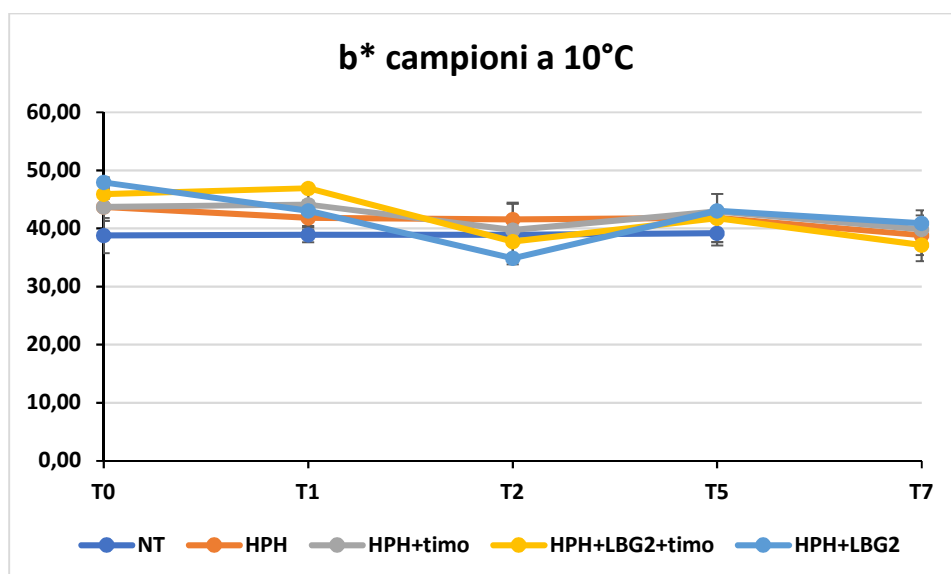


Figura 27 - Andamento, nel tempo, del parametro b* nei campioni conservati a 10°C

Anche nel caso della componente b* (Figura 27) sono state riscontrate delle differenze tra i campioni al tempo iniziale, in particolare il campione di controllo mostrava i valori più bassi di questa componente, i campioni HPH e HPH+Timo i valori intermedi, mentre i campioni fermentati i valori più alti in assoluto. Essendo b* la componente del colore giallo, si può dedurre che i campioni fermentati hanno presentato una colorazione gialla più spiccata rispetto agli altri campioni. Nel corso della conservazione, come prevedibile, è stata osservata una diminuzione di b* per tutti i campioni.

CAMPIONI CONSERVATI A 4°C:

Nel caso della prova di shelf-life in cui i campioni erano conservati a 4°C, questi sono stati monitorati fino al 9° giorno di conservazione.

In Tabella 25 e Figura 28 è riportata la CMT, espressa come log ufc/mL.

Carica mesofila totale log ufc/mL - campioni a 4°C				
	T0	T2	T6	T9
NT	5,15±0,19	4,62±0,02	6,71±0,42	7,66±0,22
HPH	4,17±0,19	3,86±0,13	3,52±0,06	5,65±0,30
HPH+timo	4,17±0,19	3,64±0,23	3,91±0,01	5,41±0,05
HPH+LBG2+timo	4,47±0,18	3,57±0,13	3,66±0,17	3,90±0,21
HPH+LBG2	4,09±0,12	3,68±0,03	3,76±0,03	3,70±0,12

Tabella 25 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo della CMT nei campioni di succo di carota conservati a 4°C

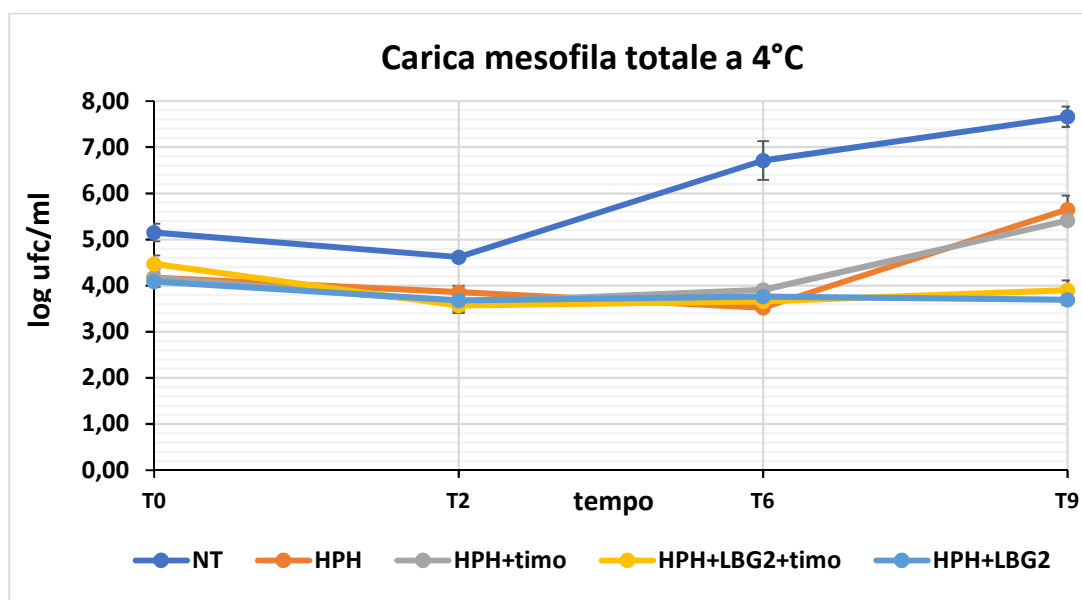


Figura 28 - Cinetiche di sviluppo della CMT nei campioni conservati a 4°C

La CMT iniziale è risultata ovviamente pari a quella registrata nei campioni a 10°C e quindi l'effetto del trattamento HPH ha portato alla riduzione della CMT di un ciclo logaritmico rispetto al controllo. In questo caso, il campione di controllo superava il limite di spoilage per la CMT pari a 6 log ufc/mL dopo 6 giorni di conservazione, al contrario negli altri campioni questo limite non era mai superato fino ai 9 giorni. Tuttavia, se nei campioni HPH e HPH+timo si osservava un incremento della CMT sino a valori di 5,4 e 5,6 log ufc/mL al T9, mentre nei campioni fermentati non mostrava particolari discrepanze dal valore iniziale per tutto il periodo di conservazione.

Per quel che riguarda i coliformi, sin dai primi giorni di conservazione sono scesi al di sotto del limite di rilevabilità, ad eccezione del controllo, sia per via dell'acidità di alcuni campioni che per la temperatura di conservazione che hanno rappresentato un ostacolo insormontabile per questa categoria microbica (dati non mostrati).

Il carico dei lieviti, nei campioni conservati a 4°C è riportato in Tabella 26 e Figura 29.

Lieviti log ufc/mL - campioni a 4°C			
	T2	T6	T9
NT	4,37±0,16	4,33±0,46	4,49±0,02
HPH	3,84±0,17	2,90±0,19	4,13±0,24
HPH+timo	3,62±0,20	3,86±0,39	3,72±0,02
HPH+LBG2+timo	3,58±0,17	3,57±0,13	3,76±0,12
HPH+LBG2	3,54±0,13	3,76±0,12	3,68±0,10

Tabella 26 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo dei lieviti nei campioni di succo di carota conservati a 4°C

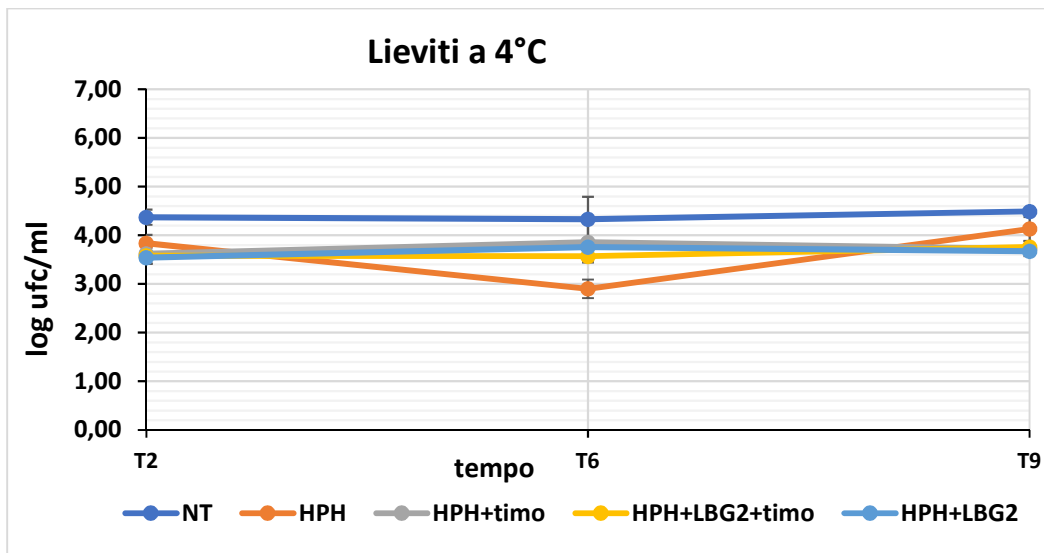


Figura 29 - Cinetiche di sviluppo dei lieviti nei campioni conservati a 4°C

In tutti i campioni trattati HPH il carico dei lieviti è risultato di circa 1 ciclo logaritmico inferiore rispetto al campione di controllo (3,5 log ufc/mL nei campioni trattati HPH e 4,4 nei campioni di controllo). Non sono state osservate variazioni dei livelli dei lieviti durante la shelf-life in tutti i campioni considerati.

Per quel che riguarda il carico di LBG2, utilizzato come agente fermentante in alcuni campioni, questo era pari a circa 10 log ufc/mL. Dopo 9 giorni di stoccaggio il carico del lattococco risultava superiore, indipendentemente dalla presenza di timo, a 8 log ufc/mL.

I dati relativi al pH dei campioni conservati a 4°C sono riportati in Figura 30.

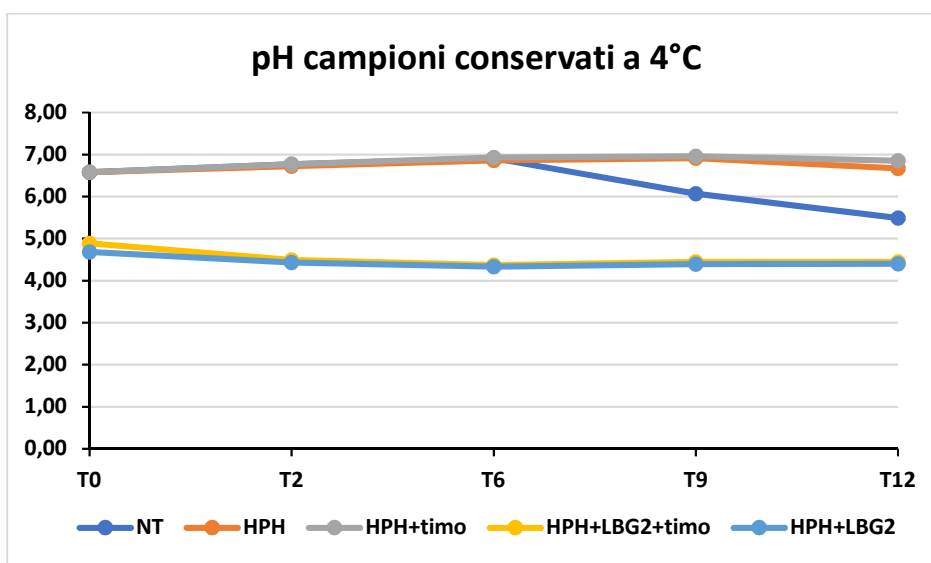


Figura 30 - pH dei campioni conservati a 4°C

Nel caso dei campioni fermentati il pH iniziale inferiore a 5 è rimasto pressoché costante per tutto il periodo di stoccaggio. Nel caso dei campioni trattati HPH, ma non fermentati, il pH iniziale di circa 6,6 non ha subito variazioni rispetto a questo valore per tutto il periodo di conservazione refrigerata. L'unico campione che ha mostrato una riduzione del valore iniziale di pH è il campione di controllo che a partire dal 9° giorno di conservazione ha mostrato una acidificazione associabile anche in questo caso allo sviluppo microbico dal momento che questo campione è stato l'unico a raggiungere livello di spoilage durante i 9 giorni di stoccaggio considerati.

Per quanto riguarda invece i valori di L^* , a^* e b^* dei campioni conservati a 4°C, sono mostrati nelle Figure successive (Figure 31, 32 e 33).

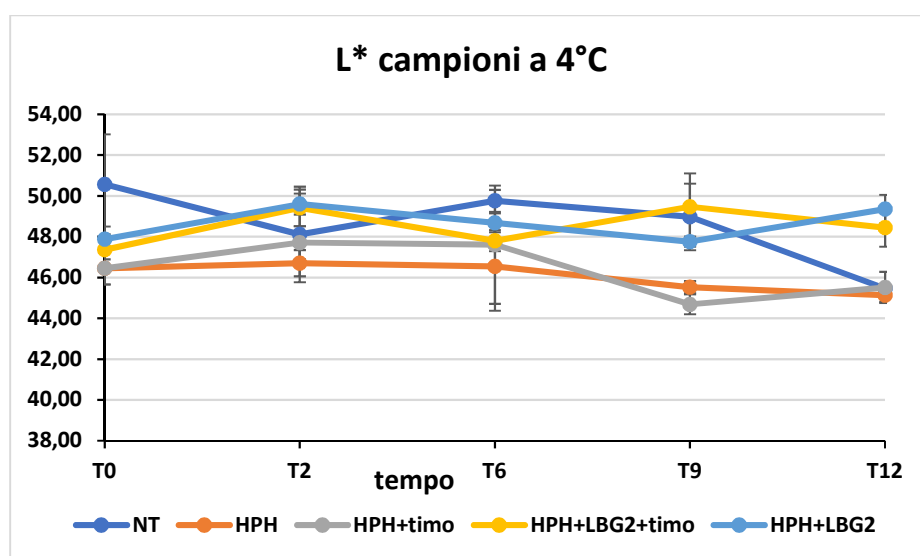


Figura 31 - Andamento, nel tempo, del parametro L^* nei campioni conservati a 4°C

Per quel che riguarda la luminosità dei campioni (Figura 31), così come per quelli conservati a 10°C, i trattati HPH hanno mostrato dei valori inferiori rispetto al campione di controllo, successivamente durante la conservazione i campioni HPH+LBG2+Timo e HPH+LBG2 hanno presentato dei valori di L^* maggiori rispetto al controllo e ai campioni HPH e HPH+Timo.

Per quanto riguarda il parametro a^* (Figura 32), così come per i campioni conservati a 10°C, al tempo iniziale i valori sono apparsi maggiori nei campioni trattati con le HPH rispetto a quello non trattato. Nei tempi successivi i campioni HPH+LBG2+Timo e HPH+LBG2 hanno presentato dei valori di a^* maggiori rispetto al controllo e ai campioni HPH e HPH+Timo.

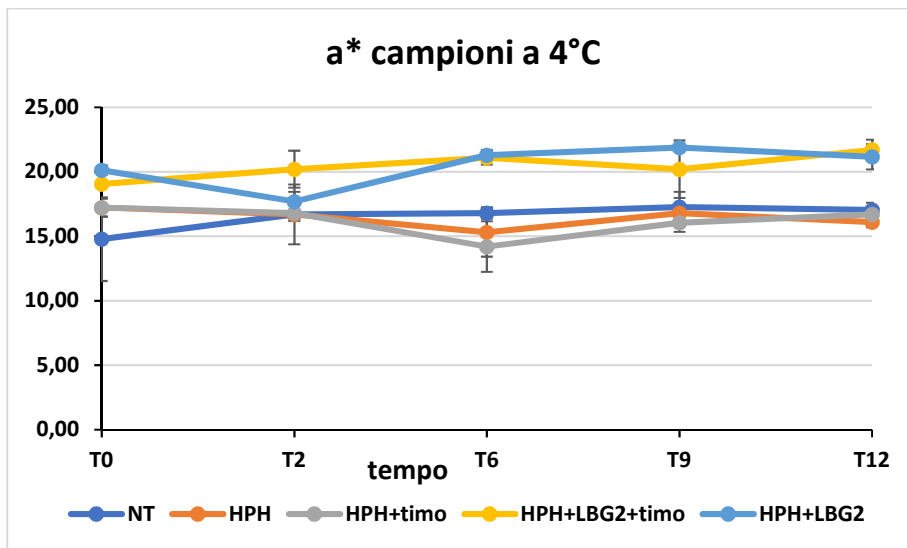


Figura 32 - Andamento, nel tempo, del parametro a* nei campioni conservati a 4°C

Infine, nel caso della componente b* (Figura 33) al tempo iniziale i campioni trattati HPH presentavano valori di b* maggiori rispetto al controllo. Al 12° giorno di conservazione i valori di b* sono risultati lievemente più bassi per tutti i campioni, in particolare per quello di controllo. Essendo b* la componente del colore giallo, si può dedurre che i campioni fermentati hanno presentato una colorazione gialla più spiccata rispetto agli altri campioni.

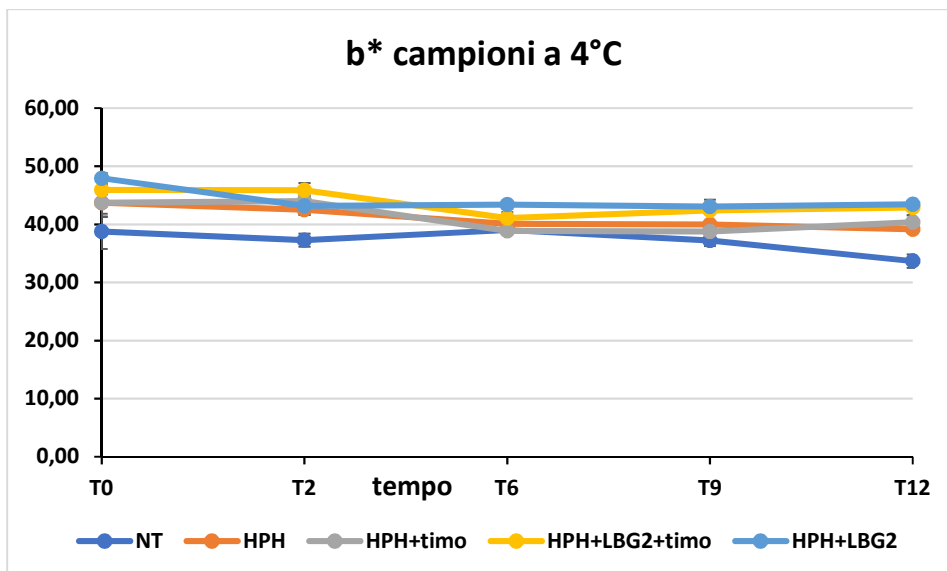


Figura 33 - Andamento, nel tempo, del parametro b* nei campioni conservati a 4°C

8. CONCLUSIONI

Come detto in precedenza, i succhi di frutta e le bevande vegetali a base di frutta e verdura, a causa degli alti valori di pH dovuti alla materia prima dalla quale provengono, possono consentire lo sviluppo di molti microrganismi patogeni e degradativi. Proprio per questo motivo, attualmente, la loro stabilità nel tempo e la loro sicurezza microbiologica vengono ottenute con dei trattamenti termici come la sterilizzazione o la pastorizzazione HTST (High Temperature Short Time) che determinano effetti positivi per quanto riguarda la riduzione più o meno significativa del carico microbico, ma negativi sulle caratteristiche nutrizionali e organolettiche di tali prodotti.

Dato che la richiesta dei consumatori è orientata verso alimenti più salutistici, più simili ai prodotti freschi e con un ridotto utilizzo di additivi chimici, la ricerca si è concentrata verso l'uso di tecnologie alternative in grado di stabilizzare il prodotto da un punto di vista microbiologico, chimico-fisico e organolettico. La letteratura infatti definisce l'uso di trattamenti ad alta pressione (HPH o HHP), di antimicrobici naturali e di fermentazioni da parte di batteri lattici come possibili strategie alternative a quei trattamenti invasivi sopra citati, in modo tale da ridurre il carico di microrganismi alterativi naturalmente presenti e di patogeni, ma anche per preservare le caratteristiche nutrizionali e organolettiche.

Nella presente tesi sono state valutate le potenzialità del trattamento con le alte pressioni di omogeneizzazione (HPH) in combinazione con fermentazione da parte del ceppo nisina produttore *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LBG2 e con l'utilizzo di un antimicrobico naturale come l'olio essenziale di timo, per migliorare la shelf-life e la sicurezza microbiologica di succo di carota, come alternativa ai trattamenti termici.

Sulla base di risultati preliminari sono state definite le condizioni ottimali per ciascuno dei trattamenti non termici precedentemente riportati. In particolare, l'applicazione del trattamento HPH con una temperatura di ingresso del succo di carota pari a quella ambientale e l'utilizzo di 3 cicli alla pressione di 150 MPa, ha portato ad un significativo decremento della popolazione microbica naturalmente presente su succo di carota non sottoposto a trattamenti termici preventivi. Allo stesso tempo, dati di letteratura riguardanti l'attività antimicrobica e la compatibilità organolettica di diversi oli essenziali in succhi vegetali hanno permesso di definire l'olio essenziale di timo come quello più adatto ad essere addizionato a succo di carota e ad una concentrazione pari a 60ppm. Per quel che riguarda la fermentazione con il lattococco LBG2, dati di precedenti sperimentazioni ci hanno permesso di individuare come condizioni ottimali di fermentazione e produzione di nisina da parte di questo ceppo quelle di una temperatura pari a 30 °C per una durata del processo fermentativo di 7 ore.

I risultati del Challenge Test, in presenza dei microrganismi patogeni *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, ha indicato come il fattore principale che ha permesso l'inibizione di questi microrganismi sia stata la fermentazione da parte del ceppo LBG2. Infatti, tutti i campioni fermentati con questo ceppo hanno mostrato le più rapide cinetiche di disattivazione dei patogeni. La combinazione con il trattamento HPH ha permesso di incrementare tali cinetiche soprattutto per *E. coli* e *L. monocytogenes*, al contrario l'aggiunta di olio essenziale di timo non ha portato ad effetti antimicrobici additivi rispetto all'attività mostrata dagli altri due trattamenti non termici considerati. La maggiore attività antimicrobica relativa alla fermentazione con il ceppo LBG2 è di certo attribuibile alla rapida ed intensa acidificazione dovuta a questo ceppo, inoltre l'acidificazione del prodotto permette alla nisina prodotta dal lattococco di avere una maggiore efficacia antimicrobica e stabilità.

Prove di Shelf-life svolte in condizioni di abuso termico a 10°C hanno evidenziato le ottime potenzialità del ceppo LBG2 combinato con HPH per stabilizzare microbiologicamente il succo di carota, infatti i campioni fermentati, indipendentemente dalla presenza di olio essenziale di timo, sono stati gli unici che non hanno superato i limiti di spoilage per il carico mesofilo totale e i lieviti durante tutti i 7 giorni di conservazione considerati. Inoltre, i campioni fermentati hanno mostrato una elevata stabilità per tutto il periodo di conservazione dei valori di pH e colore rispetto ai campioni non fermentati.

Anche le prove svolte a 4°C hanno confermato come la fermentazione da parte del ceppo LBG2 combinata con le HPH permettesse di non superare i limiti microbiologici di spoilage per succo di carota per oltre 9 giorni a 4°C. Per queste condizioni di conservazione solamente il campione di controllo non trattato HPH superava i limiti di spoilage microbiologico. Anche in questo caso non sono state osservate modifiche significative dei valori di pH e colore dei campioni trattati.

In generale, i dati ottenuti indicano come l'utilizzo della fermentazione lattica, combinata con un pre-trattamento HPH per ridurre la microflora iniziale, rappresenti un'ottima strategia alternativa al trattamento termico. Infatti le prove di Shelf-life hanno evidenziato come il succo di carota mantenesse delle buone caratteristiche microbiologiche per oltre 9 giorni a 4°C e fino a 7 giorni in condizioni di abuso termico a 10°C. L'aggiunta dell'olio essenziale di timo non si è dimostrata una strategia efficace e non ha portato ad incrementi di Shelf-life del prodotto.

Infine, la combinazione con la fermentazione da parte del ceppo LBG2 con un trattamento iperbarico ha permesso di incrementare significativamente la sicurezza del succo di carota portando a completa disattivazione di microrganismi patogeni come *L. monocytogenes* e *E. coli*

entro le 24h e consentendo allo stesso tempo di inibire lo sviluppo di un microrganismo patogeno particolarmente resistente in condizioni di stress quale *S. aureus*.

Premesso che questa sperimentazione ha permesso di stabilire come la combinazione tra un trattamento HPH a 150 MPa seguito da una fermentazione da parte del ceppo LBG2 consenta di incrementare la Shelf-life e la sicurezza di succo di carota, sarebbero necessarie ulteriori sperimentazioni per stabilire l'accettabilità da parte del consumatore di questo prodotto fermentato ed inoltre, sarebbe auspicabile prevedere uno scaling-up del processo fermentativo messo a punto per validare i dati ottenuti in laboratorio su scala maggiore e in condizioni più vicine a quelle di una realtà industriale.

9. BIBLIOGRAFIA

- Akdemir Evrendilek, G. & Ozdemira, P. (2019). “*Effect of various forms of non-thermal treatment of the quality and safety in carrots*”. LWT - Food Science and Technology, Elsevier, 105, 344–354.
- Alasalvar, C., Grigor, J.M., Zhang, D., Quantick, P.C. & Shahidi, F. (2001). “*Comparison of Volatiles, Phenolics, Sugars, Antioxidant Vitamins, and Sensory Quality of Different Colored Carrot Varieties*”. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49, 1410-1416.
- Aneja, K.R., Dhiman, R., Aggarwal, N.K., Kumar, V. & Kaur, M. (2014). “*Microbes Associated with Freshly Prepared Juices of Citrus and Carrots*”. Hindawi Publishing Corporation, International Journal of Food Science.
- ANSA (2019). “*Succhi di frutta, in Italia se ne consumano 765 milioni di litri l'anno*”.
- Ashurst, P.R. (2007). “*Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices: Second Edition*”. Wiley Blackwell Publishing.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. (2008). “*Biological effects of essential oils - A review*”. Food and Chemical Toxicology, 46, 446-475.
- Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A. & Viuda-Martos, M. (2013). “*Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four Thymus species from organic growth*”. Industrial Crops and Products, Elsevier, 50, 304– 311.
- Barba, F.J., Mariutti, L.R.B., Bragagnolo, N., Mercadante, A.Z., Barbosa-Canovas, G.V. & Orlie, V. (2017). “*Bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables after thermal and nonthermal processing*”. Trends in Food Science & Technology, Elsevier, 67, 195-206.
- Barba, F.J., Esteve, M.J. & Frigola, A. (2012). “*High Pressure Treatment Effect on Physicochemical and Nutritional Properties of Fluid Foods During Storage: A Review*”. Food Science and Food Safety Journal, 11, 307-322.
- Barzee, T.J., El- Mashad, H.M., Zhang, R. & Pan, Z. (2019). “*Chapter 12 – Carrots*”. Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products, Academic Press, 297-330.
- Beresford, T.P., Fitzsimons, N.A., Brennan, N.L. & Cogan, T.M. (2001). “*Recent advances in cheese microbiology*”. International Dairy Journal, 11, 259-274.
- Bevilacqua, A., Petrucci, L., Perricone, M., Speranza, B., Campaniello, D., Sinigaglia, M. & Corbo, M.R. (2018). “*Nonthermal Technologies for Fruit and Vegetable Juices and*

Beverages: Overview and Advances". Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 17.

- Braschi, G., Serrazanetti, D.I., Siroli, L., Patrignani, F., De Angelis, M. & Lanciotti, R. (2018). "*Gene expression responses of Listeria monocytogenes Scott A exposed to sublethal concentrations of natural antimicrobials*". International Journal of Food Microbiology, Elsevier, 286, 170–178.
- Bowles, E.J. (2003). "*The chemistry of aromatherapeutic oils*".
- Burt, S. (2004). "*Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review*". International Journal of Food Microbiology, Elsevier, 94- 223-253.
- Demir, N., Bahceci, K.S. & Acar, J. (2006). "*The effects of different initial Lactobacillus plantarum concentrations on some properties of fermenter carrot juice*". Journal of Food Processing and Preservation, 30, 352–363.
- Dewanti-Hariyadi, R. (2014). "*Microbiological Quality and Safety of Fruit Juices*". Foodreview International, 1, 1.
- Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. & Gobetti, M. (2013). "*Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation*". Food Microbiology, 33, 1-10, Elsevier.
- Diels, A.M.J. & Michiels, C.W. (2006). "*High-Pressure Homogenization as a Non-Thermal Technique for the Inactivation of Microorganisms*". Critical Reviews in Microbiology, 32, 201–216.
- DIRETTIVA 2012/12/UE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO che modifica la direttiva 2001/112/CE del Consiglio concernente i succhi di frutta e altri prodotti analoghi destinati all'alimentazione umana. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, Aprile 19, 2012.
- Donsì, F., Ferrari, G. & Maresca, P. (2006). "*High-Pressure Homogenisation for Food Sanitisation*". IUFoST World Congress, 13th World Congress of Food Science & Technology.
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., Blayo, C. (2012). "*Technological aspects and potential applications of (ultra) highpressure homogenisation*". Trends in Food Science and Technology.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2018.
- Gardini, F., Lanciotti, R. & Guerzoni, M.E. (2001). "*Effect of trans-2-hexenal on the growth of Aspergillus flavus in relation to its concentration, temperature and water activity*". Letters in Applied Microbiology, 33, 50-55.

- Gharsallaoui, A., Oulahal, N., Joly, C. & Degraeve, P. (2016). "*Nisin as a food preservative: Part 1: Physicochemical properties, antimicrobial activity, and main uses*".
- Gironés-Vilaplana, A., Huertas, J.P., Moreno, D.A., Periago, P.M. & García-Viguera, C. (2016). "*Quality and microbial safety evaluation of new isotonic beverages upon thermal treatments*". Food Chemistry, 194, 455-462.
- Guerzoni, M.E., Vannini, L., Chaves-Lopez, C., Lanciotti, R., Suzzi, G. & Gianotti, A. (1999). "*Effect of High Pressure Homogenization on Microbial and Chemico-Physical Characteristics of Goat Cheeses*". Dairy Foods, 82, 851-862.
- Gut, H., Pennacchietti, E., John, R.A., Bossa, F., Capitani, G., De Biase, D. & Grütter, M.G. (2006). "*Escherichia coli acid resistance: pH-sensing, activation by chloride and autoinhibition in GadB*". The EMBO Journal, 25, 2643-2651.
- Héchard, Y. & Sahl, H.G. (2002). "*Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria*". Biochimie, Elsevier, 84, 545–557.
- Ho, V. T. T., Lo, T., Bansal, N. & Turner, M. S., 2018. "*Characterisation of Lactococcus lactis isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against Listeria monocytogenes in cheese*". Food Control, 85, 472-483.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. & Monfort, J.M. (1995). "*Inhibition of Listeria in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic Lactobacillus sake CTC494*". Journal of Applied Bacteriology, 79, 322-330.
- IRI - Information Resources, Inc. (2018). "*Il mercato dei Succhi di Frutta nel canale moderno*".
- Irkin, R. & Korukluoglu, M. (2009). "Growth inhibition of pathogenic bacteria and some yeasts by selected essential oils and survival of *L. monocytogenes* and *C. albicans* in apple-carrot juice".
- Jiménez-Sánchez, C., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. & Fernández-Gutiérrez, A. (2017). "*Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice*". Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57, 501-523.
- Jones, E., Salin, V. & Williams, G. W., (2005). "*Nisin and the Market For Commercial Bacteriocins*". Horticultural Science, 30, 152-158.
- Karovičová, J. & Kohajdová, Z. (2003). "Lactic acid fermented vegetable juices".
- Kelemen, M.V. & Sharpe, J.E. (1979). "*Controlled cell disruption: a comparison of the forces required to disrupt different micro-organisms*". Journal of Cell Science, 35, 431-441.

- Kim, W. (2014). “*The genus Lactococcus – Chapter 26*”. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy, First Edition. Edited by Wilhelm H. Holzapfel and Brian J.B. Wood, 429-443.
- Klijn, A., Mercenier, A. & Arigoni, F. (2005). “*Lessons from the genomes of bifidobacteria*”. FEMS Microbiology Reviews, 3, 491–509.
- Kongkachuichaia, R., Charoensiri, R., Yakoh, K., Kringkasemsee, A. & Insung, P. (2015). “*Nutrients value and antioxidant content of indigenous vegetables from Southern Thailand*”. Food Chemistry, 173, 838-846.
- Konig, H. & Frohlic, J. (2017). “*Lactic Acid Bacteria – Chapter 1*”. Biology of Microorganism on Grapes, in Must and Wine, Springer.
- Kumar, S., Thippareddi, H., Subbiah, J., Zivanovic, S., Davinson, P.M. & Harte, F. (2009). “*Inactivation of Escherichia coli K-12 in apple juice using combination of high pressure homogenization and chitosan*”. Journal of Food Science 74, 8–14.
- Lanciotti, R., Gianotti, A., Patrignani, Belletti, F.N., Guerzoni, M.E. & Gardini, F. (2004). “*Use of natural aroma compounds to improve shelflife and safety of minimally processed fruits*”. Trends in Food Science & Technology, Elsevier, 15, 201–208.
- Lanciotti, R., Patrignani, F., Iucci, L., Saracino, P. & Guerzoni, M.E. (2007). “*Potential of high pressure homogenization in the control and enhancement of proteolytic and fermentative activities of some Lactobacillus species*”. Food Chemistry, Elsevier, 102, 542–550.
- Lanciotti, R., Vannini, L., Patrignani, F., Iucci, L., Vallicelli, M., Ndagijimana, M. & Guerzoni, M.E. (2005). “*Effect of high pressure homogenisation of milk on cheese yield and microbiology, lipolysis and proteolysis during ripening of Caciotta cheese*”. Journal of Dairy Research, 73, 216–226.
- Lin, L., Wang, X. & Cui, H. (2019). “*Synergistic efficacy of pulsed magnetic fields and Litseacubeba essential oil treatment against Escherichia coli O157:H7 in vegetable juices*”. Food Control, Elsevier, 106, 106686.
- Linee guida , p. l. d. r. n. c. d. a., 2013. s.l.:s.n.
- Liu, X., Liu, J., Bi, J., Cao, F., Ding, Y. & Peng, J. (2019). “*Effects of high pressure homogenization on physical stability and carotenoid degradation kinetics of carrot beverage during storage*”. Journal of Food Engineering, Elsevier, 263, 63–69.
- Liu, X., Liu, J., Bi, J., Yi, J., Peng, J., Ning, C., Wellala, C.K.D. & Zhang, W. (2018). “*Effects of high pressure homogenization on pectin structural characteristics and*

carotenoid bioaccessibility of carrot juice". Carbohydrate Polymers, Elsevier, 203, 176-184.

- Liu, W., Pang, H., Zhang, H. & Cai, Y. (2014). "*Biodiversity of Lactic Acid Bacteria*". Springer, 103-203.
- Ma, Y., Lan, G., Li, C., Cambaza, E.M., Liu, D., Ye, X., Chen, S. & Ding, T. (2019). "*Stress tolerance of Staphylococcus aureus with different antibiotic resistance profiles*". Microbial Pathogenesis, 133, 103549.
- Maresca, P., Donsì, F. & Ferrari G. (2011). "*Application of a multi-pass high-pressure homogenization treatment for the pasteurization of fruit juices*". Journal of Food Engineering, Elsevier, 104, 364–372.
- Middelberg, APJ. (1992). "*A model for the disruption of Escherichia coli by high-pressure homogenization*". Thesis, University of Adelaide, Dept. of Chemical Engineering.
- Mihalev, K., Dinkova, R., Shikov, V. & Mollov, P. (2018). "*CLASSIFICATION OF FRUIT JUICES*". *Fruit Juices - Extraction, Composition, Quality and Analysis*, 3, 33-34. University of Food Technologies, Plovdiv, Bulgaria. Elsevier Inc.
- Mytton, O.T., Nnoaham, K., Eyles, H., Scarborough, P. & Ni Mhurchu, C. (2014). "*Systematic review and meta-analysis of the effect of increased vegetable and fruit consumption on body weight and energy intake*". BMC Public Health, 14, 886.
- Omar, N. B., Abriouel, H., Lucas, R., Martínez-Cañamero, M., Guyot, J.P. & Gálvez, A. (2006). "*Isolation of bacteriocinogenic Lactobacillus plantarum strains from ben saalga, a traditional fermented gruel from Burkina Faso*". International Journal of Food Microbiology, 112 (1), 44-50.
- Patrignani, F. & Lanciotti, R. (2016). "*Applications of High and Ultra High Pressure Homogenization for Food Safety*". Frontiers in Microbiology, 1132.
- Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D.I., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2015). "*Innovative strategies based on the use of essential oils and their components to improve safety, shelf-life and quality of minimally processed fruits and vegetables*". Trends in Food Science & Technology, Elsevier, 46, 311-319.
- Patrignani, F., Tabanelli, G., Siroli, L., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2013). "*Combined effects of high pressure homogenization treatment and citral on microbiological quality of apricot juice*". International Journal of Food Microbiology, Elsevier, 160, 273–281.
- Patrignani, F., Vannini, L., Kamden, S.L.S., Lanciotti, R. & Guerzoni, M.E. (2009). "*Effect of high pressure homogenization on Saccharomyces cerevisiae inactivation and physico-*

- chemical features in apricot and carrot juices*". International Journal of Food Microbiology, Elsevier, 136, 26–31
- Popper L., Knorr D. (1990). "*Applications of high-pressure homogenisation for food preservation*". Food Technology 44, p. 84– 89.
 - Potter, A.S., Foroudi, S., Stamatikos, A., Patil, B.S. & Deyhim, F. (2011). "*Drinking carrot juice increases total antioxidant status and decreases lipid peroxidation in adults*". Nutrition Journal 10, 96.
 - Priyadarshini, A & Priyadarshini, A. (2018). "*Chapter 2 - Market dimensions of the fruit juice industry*". Fruit Juices, Extraction, Composition, Quality and Analysis, Pages Academic Press, 15-32.
 - Rekhy, R. & McConchie, R. (2014). "*Promoting consumption of fruit and vegetables for better health. Have campaigns delivered on the goals?*". Appetite, 79, 113-123.
 - Ross, A.I.V., Griffiths, M.W., Mittal, G.S. & Deeth, H.C. (2003). "*Combining nonthermal technologies to control foodborne microorganisms*". International Journal of Food Microbiology, Elsevier, 89, 125– 138.
 - Ross, R.P., Morgan, S. & Hill, C. (2002). "*Preservation and fermentation: past, present and future*". International Journal of Food Microbiology, Elsevier, 79, 3 – 16.
 - Rtibi, K., Selmi, S., Wannes, D., Jridi, M., Marzoukia, L. & Sebaia, H. (2019). "*The potential of Thymus vulgaris aqueous extract to protect against delayed gastric emptying and colonic constipation in rats*". The Royal Society of Chemistry, 9, 20593–20602.
 - Salama, M.S., Sandine, W.E., Giovannoni, S.J. (1991). "*Development and application of oligonucleotide probes for identification of Lactococcus lactis subsp. cremoris*". Applied and Environmental Microbiololy, 57, 1313–1318.
 - Schultz, S., Wagner, G., Urban, K. & Ulrich, J. (2004). "*High-pressure homogenization as a process for emulsion formation*". Chemical Engineering and Technology, 4, 361– 368.
 - Settani, L. & Corsetti, A. (2008). "*Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation*". Internationa Journal of Food Microbiology, 121, 123-138.
 - Serrazanetti, D.I., Gottardi, D., Montanari, C. & Gianotti, A. (2013). "*Dynamic Stresses of Lactic Acid Bacteria Associated to Fermentation Processes*".
 - Sharma, K.D., Karki, S., Thakur, N.S., Attri, S., 2012. "*Chemical composition, functional properties and processing of carrot—a review*". Journal of Food Science Technologies 49 (1), 22–32.
 - Siroli, L., Braschi, G., de Jong, A., Kok, J., Patrignani, F. & Lanciotti, R. (2018). "*Transcriptomic approach and membrane fatty acid analysis to study the response*

mechanisms of Escherichia coli to thyme essential oil, carvacrol, 2-(E)-hexanal and citral exposure". Journal of Applied Microbiology, 125, 1308-1320.

- Siroli, L., Camprini, L., Pisano, M.B., Patrignani, F. & Lanciotti, R. (2019). "*Volatile Molecule Profiles and Anti-Listeria monocytogenes Activity of Nisin Producers Lactococcus lactis Strains in Vegetable Drinks*". Frontiers in Microbiology, 10, 563.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Tabanelli, G., Montanari, C., Tappi, S., Rocculi, P., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2014). "*Efficacy of natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed apples packaged in modified atmosphere*". Food Control, Elsevier, 46, 403-411.
- Siroli, L., Patrignani, F., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2015b). "*Effects of sub-lethal concentrations of thyme and oregano essential oils, carvacrol, thymol, citral and trans-2-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile molecule profile of Listeria monocytogenes, Escherichia coli and Salmonella enteritidis*". Food Chemistry, Elsevier, 182, 185–192.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Tappi, S., Rocculi, P., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2015a). "*Natural antimicrobials to prolong the shelf-life of minimally processed lamb's lettuce*". Postharvest Biology and Technology, Elsevier, 103, 35–44.
- Siroli, L., Patrignani, F., Serrazanetti, D.I., Vernocchi, P., Del Chierico, F., Russo, A., Torriani, S., Putignani, L., Gardini, F. & Lanciotti, R. (2017). "*Effect of thyme essential oil and Lactococcus lactis CBM21 on the microbiota composition and quality of minimally processed lamb's lettuce*". Food Microbiology, Elsevier, 68, 61-70.
- Siroli, L., Serrazanetti, D.I., Salvetti, E., Gardini, F., Patrignani, F., Vannini, L., Lanciotti, R. & Torriani, S. (2016). "*Use of a nisin-producing Lactococcus lactis strain, combined with natural antimicrobials, to improve the safety and shelf- life of minimally processed sliced apples*". Food Microbiology, 54, 11-19.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H. (1997). "*Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy*". International Journal of Food Microbiology 36, 1-29.
- Stinco, C.M., Szczepańskab, J., Marszałek, K., Pinto, C.A., Inácioc, R.S., Mapelli-Brahma, P., Barba, F.J., Lorenzo, J.M., Saraivac, J.A. & Meléndez-Martínez, A.J. (2019). "*Effect of high-pressure processing on carotenoids profile, colour, microbial and enzymatic stability of cloudy carrot juice*". Food Chemistry, Elsevier, 299, 125112.
- Thiebaud, M., Picart, L., Dumay, E., Picart, L., Guiraud, J.P. & Cheftel, J.C. (2003). "*High-pressure homogenization of raw bovine milk.: Effects on fat globe size distribution and microbial inactivation*". International Dairy Journal, 13, 427-439.

- USDA, USDHHS and, 2015. “2015–2020 Dietary Guidelines for Americans” - eighth edition.
- Vandresen, S., Quadri, M.G.N., de Souza, J.A.R. & Hotza, D. (2008). “Temperature effect on the rheological behavior of carrot juices”. *Journal of Food Engineering*, Elsevier, 92, 269–274.
- Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D., & Guerzoni, M. E. (2004). “Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase”. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 123–135.
- Vannini, L., Lanciotti, R. & Guerzoni, M.E. (2002). “Effect of high pressure homogenisation on microbiological safety and microstructure of egg-based products”. *Ingredienti alimentari*, 2, 10-14.
- Wareing, P. & Davenport, R.R. (2017). “Microbiology of soft drinks and fruit juices”. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices*, Second Edition, 279 – 299.
- Wootton-Beard, P.C. & Ryan, L. (2011). “A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants”. *Journal of Functional Food*, 3,329-334.
- Wuytack, E. Y., Diels, A. M. & Michiels, C. M. (2002). “Bacterial inactivation by high-pressure homogenisation and high hydrostatic pressure”. *International Journal of Food Microbiology*, 77, 205-2012.
- Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C. & Fillmore, S. (2012). “Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts”.
- Yoneyama, F., Fukao, M., Zendo, T., Nakayama, J. & Sonomoto, K. (2008). “Biosynthetic characterization and biochemical features of the third natural nisin variant, nisin Q, produced by *Lactococcus lactis* 61-14”. *Journal of Applied Microbiology* 105, 1982-1990.
- Zamora, A. & Guamis, B. (2014). “Opportunities for Ultra-High-Pressure Homogenisation (UHPH) for the Food Industry”. *Food Engineering*, Springer.
- Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Zhao, F., Sun, Z. & Liao, X. (2015). “Quality comparison of carrot juices processed by high-pressure processing and high-temperature short-time processing”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Elsevier, 33, 135-144.
- Zhao, L., Liu, F., Wang, S. & Dong, P. (2013). “Comparing the effects of high hydrostatic pressure and thermal pasteurization combined with nisin on the quality of cucumber juice drinks”. *Innovative Food Science Emergency Technology*, 17, 27-36.

10. SITOGRAFIA

- https://eippcb.jrc.ec.europa.eu/reference/BREF/FDM/FDM_31-01-2017-D1_b_w.pdf
- <http://health.gov/dietaryguidelines/2015/guidelines/>
- http://www.ansa.it/canale_terraegusto/notizie/in_breve/2019/08/29/succhi-di-frutta765-mln-di-litri-il-consumo-annuo-italiano_03ef5d72-8493-403c-8a53-aab5cfd787aa.html
- <https://www.iriworldwide.com/it-IT>

11. ELENCO TABELLE, FIGURE e IMMAGINI

- Figura 1 – Processo produttivo di succhi di frutta e di vegetali (BAT for Food, Drink and Milk Industries, January 2017)
- Tabella 1 - Composizione biochimica di carote crude (Sharma et al., 2012)
- Figura 2 - Flow chart della produzione standard di succo di carota (Zhang et al. 2015)
- Tabella 2 - Proprietà fisico-chimiche del succo di carota (Vandresen et al., 2008)
- Tabella 3 - Esempi di pH e specie microbiche che alterano succhi di frutta e verdura (Wareing & Davenport, 2017)
- Figura 3 - Tasso di crescita annuale composto (CAGR) nel mercato dei succhi: previsioni fino all'anno 2017 (Priyadarshini et al., 2018)
- Figura 4 - Mercato di frutta e verdura fresca e minimamente trasformata in USA (Patrignani et al., 2015)
- Tabella 4 – Andamento delle vendite dei succhi di frutta (IRI, 2018)
- Tabella 5 - Effetti delle HP sui composti bioattivi e sull'attività antiossidante di alcuni succhi di frutta e verdura (Barba et al., 2012)
- Figura 5 - Omogeneizzatore, modello GEA Niro Soavi (Patrignani & Lanciotti, 2016)
- Figura 6 - Meccanismo d'azione dell'HPH (Patrignani & Lanciotti, 2016)
- Tabella 6 - Differenti caratteristiche fermentative dei LAB (Konig & Frohlic 2017)
- Figura 7 - *Lactococcus lactis*
- Figura 8 - Rappresentazione schematica della modalità di azione della nisina (Ross. et al., 2002)
- Tabella 7 - Batteri lattici coinvolti nella fermentazione di prodotti alimentari (Ross et al., 2002)
- Figura 9 - Meccanismo d'azione degli EO (Burt, 2004)

- Tabella 8 - Uso di oli essenziali in relazione al tipo di prodotto ortofrutticolo (Patrignani et al., 2015)
- Tabella 9 - Maggiori componenti di oli essenziali con attività antibatterica (Burt, 2004)
- Figura 10 – Timolo e carvacrolo (Burt, 2004)
- Immagine 1 - Omogeneizzatore utilizzato
- Immagine 2 - Estratto di carota subito dopo il trattamento HPH (sinistra) e dopo 48 ore dal trattamento (destra) conservati a 4°C
- Immagine 3 - Soluzione finale di olio essenziale di timo 60 ppm
- Tabella 10 - Distinzione dei campioni in base ai trattamenti effettuati
- Figura 11 - Schema della sperimentazione eseguita durante il Challenge Test
- Tabella 11 - Distinzione dei campioni in base ai trattamenti effettuati
- Immagine 4 - Lavaggio carote in acqua contenente 100 ppm di ipoclorito di sodio
- Figura 12 - Schema della sperimentazione eseguita durante la prova di Shelf-life
- Figura 13 - Rappresentazione dello spazio di colore CIELab
- Tabella 12 - Carico microbico iniziale e sua riduzione, espressa come $\Delta \log$ ufc/mL in funzione dei diversi trattamenti HPH impiegati (pressione, numero di cicli, temperatura di ingresso)
- Tabella 13 - Composti identificati dall'analisi GC-MS-SPME dell'olio essenziale di timo rosso utilizzato nella sperimentazione
- Tabella 14 - Concentrazioni minime inibenti e battericide dell'olio essenziale di timo utilizzato in questa sperimentazione nei confronti dei microrganismi Gram-negativi (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), Gram-positivi (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*), e lieviti (*Saccharomyces cerevisiae*)
- Figura 14 - Cinetica di acidificazione di succo di carota espresso come diminuzione di pH nel tempo su campione inoculato con il ceppo di *L. lactis* LBG2 ad un livello pari a 6 log ufc/ml e fermentato a 30 °C.
- Tabella 15 - Campioni del Challenge Test
- Tabella 16 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di *E. coli* negli 8 campioni di succo di carota, conservato a 30°C e poi 4°C, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH
- Figura 15 - Cinetiche di sviluppo/disattivazione di *E. coli* negli 8 campioni di succo di carota, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH

- Tabella 17 - Carico cellulare (log ufc/mL) a diversi tempi di conservazione di *S. aureus* negli 8 campioni di succo di carota, conservato a 30°C per 24h e poi a 4°C per ulteriori 24h, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH
- Figura 16 - Cinetiche di sviluppo/disattivazione di *S. aureus* negli 8 campioni di succo di carota, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH
- Tabella 18 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di *L. monocytogenes* negli 8 campioni di succo di carota, conservato a 30°C e poi 4°C, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH
- Figura 17 - Cinetiche di sviluppo/disattivazione di *L. monocytogenes* negli 8 campioni di succo di carota, in presenza o meno di LBG2, olio essenziale di timo e sottoposti o meno a trattamento HPH conservati a 30°C per 24h e successive 24h a 4°C
- Tabella 19 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di LBG2 nei campioni di succo di carota, conservato a 30°C e poi 4°C
- Figura 18 - Cinetiche di sviluppo di LBG2 nei campioni di succo di carota
- Tabella 20 - Distinzione dei campioni in base ai trattamenti effettuati
- Figura 19 - Cinetica di acidificazione di LBG2 a 30°C nei campioni HPH+LBG2 e HPH+LBG2+Timo
- Tabella 21 – Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo della CMT nei campioni di succo di carota conservati a 10°C
- Figura 20 – Cinetiche di sviluppo della CMT nei campioni conservati a 10°C
- Tabella 32 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo dei coliformi nei campioni di succo di carota conservati a 10°C
- Figura 21 - Cinetiche di sviluppo dei coliformi nei campioni conservati a 10°C
- Tabella 23 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo dei lieviti nei campioni di succo di carota conservati a 10°C
- Figura 22 - Cinetiche di sviluppo dei lieviti nei campioni conservati a 10°C
- Tabella 24 - Carico cellulare (log ufc/mL) nel tempo di LBG2 nei campioni di succo di carota conservati a 10°C
- Figura 23 - Cinetiche di sviluppo di LBG2 nei campioni conservati a 10°C
- Figura 24 - pH dei campioni conservati a 10°C
- Figura 25 - Andamento, nel tempo, del parametro L* nei campioni conservati a 10°C
- Figura 26 - Andamento, nel tempo, del parametro a* nei campioni conservati a 10°C

- Figura 27 - Andamento, nel tempo, del parametro b^* nei campioni conservati a 10°C
- Tabella 25 - Carico cellulare ($\log \text{ ufc/mL}$) nel tempo della CMT nei campioni di succo di carota conservati a 4°C
- Figura 28 - Cinetiche di sviluppo della CMT nei campioni conservati a 4°C
- Tabella 26 - Carico cellulare ($\log \text{ ufc/mL}$) nel tempo dei lieviti nei campioni di succo di carota conservati a 4°C
- Figura 29 - Cinetiche di sviluppo dei lieviti nei campioni conservati a 4°C
- Figura 30 - pH dei campioni conservati a 4°C
- Figura 31 - Andamento, nel tempo, del parametro L^* nei campioni conservati a 4°C
- Figura 32 - Andamento, nel tempo, del parametro a^* nei campioni conservati a 4°C
- Figura 33 - Andamento, nel tempo, del parametro b^* nei campioni conservati a 4°C

Desidero ringraziare la Prof.ssa Rosalba Lanciotti, relatrice di questa tesi, per la sua professionalità, disponibilità e cortesia, e per avermi dato la possibilità di svolgere questa intensa ma meravigliosa esperienza in laboratorio. Grazie al Dott. Lorenzo Siroli che con simpatia, gentilezza e competenza mi ha felicemente accolta e aiutata in questo progetto.

Un ringraziamento va al Dott. Giacomo Braschi, per il supporto datomi nei mesi di tirocinio e per gli insegnamenti attribuitomi con pazienza ed entusiasmo.

Grazie a Mamma e Papà, per avermi concesso questa grande opportunità, per non avermi mai negato nulla, per aver sempre creduto in me e per avermi sempre dato libertà di scelta.

Grazie a mio fratello Amerigo che, con la sua silenziosa presenza, sento sempre accanto a me.

Grazie a tutta la mia famiglia e a Tiziana, che credono costantemente in me, che comprendono e perdonano i miei infiniti silenzi e assenze, ma che sanno di avermi accanto a loro in ogni circostanza.

Grazie a Flavia, amica di avventure e sventure, amica sincera e fedele, per avermi accompagnato in questi anni in salita e per essermi stata sempre accanto.

Grazie a Sara, che con la sua bontà e simpatia ha saputo conquistare la mia amicizia.

Grazie a Sofia, Alessia, Angela e Martina, amiche davvero speciali. Siete state una bellissima scoperta.

Grazie al gruppo di Cecè e a Casa Macrelli, siete una seconda famiglia.

Grazie a Sere, Cri, Fede, Mary, Flavia, Ale e Vane che, pur essendo dalla parte opposta dell'Italia e del mondo, sono sempre state presenti, a casa e nel cuore. Il mio porto sicuro e ancora di salvezza.

Grazie a Franci per la sincerità, gli insegnamenti e il divertimento datomi nell'ultimo anno.

Grazie a Nonno Pietro, per avermi insegnato cos'è l'amore, il rispetto, la sensibilità e l'onestà, che pur essendo infinitamente lontano sento accanto a me ogni giorno.