

Ecofisiologia dei microrganismi negli alimenti

3.1 Introduzione

Un ecosistema è costituito dall'ambiente (*habitat*) e dagli organismi che vivono in esso. Gli alimenti sono quindi ecosistemi particolari¹ con caratteristiche chimiche e chimico-fisiche tali da consentire la sopravvivenza e lo sviluppo di una vasta gamma di microrganismi.

La colonizzazione di un alimento da parte di specie e ceppi di microrganismi, siano essi patogeni o deterioranti, agenti di fermentazioni, probiotici e colture bioprotettive, e il destino dei microrganismi che hanno colonizzato l'alimento dipendono dalle condizioni ecologiche che si realizzano nell'alimento stesso. I fattori ecologici che influenzano il comportamento dei microrganismi negli alimenti, e quindi il destino della comunità microbica inizialmente presente, sono classificati in tre gruppi principali: **fattori intrinseci** (caratteristici del prodotto stesso), **fattori estrinseci** (caratteristici dell'ambiente di produzione e conservazione) e **fattori impliciti** (con riferimento alle relazioni che si instaurano tra i microrganismi nelle condizioni dettate dagli altri fattori).

Le comunità microbiche inizialmente presenti nell'alimento, sotto l'azione selettiva dei determinanti ecologici, subiranno delle modificazioni della loro struttura. L'ecologia microbica studia le interazioni tra i microrganismi e

l'ambiente in cui vivono, valutando in particolare:

- le interazioni fra i microrganismi e il loro ambiente;
- le interazioni tra i microrganismi e gli altri organismi presenti nell'ambiente;
- le interazioni tra i fattori che caratterizzano l'ambiente.

La comprensione e l'applicazione dei principi dell'ecologia microbica ai sistemi alimentari è di fondamentale importanza per il controllo della loro qualità sensoriale e nutrizionale e della loro sicurezza igienica. Infatti tutte le moderne procedure e strategie di assicurazione della qualità, dell'analisi quantitativa del rischio, della microbiologia predittiva, dei metodi di conservazione degli alimenti, così come la microbiologia analitica, si fondano sulle conoscenze del comportamento dei microrganismi negli ecosistemi alimentari.

La distribuzione dei microrganismi negli alimenti è difficilmente prevedibile e nella maggioranza dei casi essi sono distribuiti in maniera casuale, con stratificazioni microscopiche e spaziali. Inoltre le popolazioni microbiche di un alimento presentano un carattere dinamico (Par. 3.3). Gli alimenti sono dunque degli ecosistemi dinamici ed eterogenei.

Negli ultimi anni gli studi di ecologia microbica sono sempre più spesso affiancati da studi di fisiologia microbica. L'integrazione tra

¹ Con rare eccezioni, sono privi delle catene trofiche che caratterizzano altri ecosistemi.

ecologia e fisiologia microbica è nota come **ecofisiologia** (cioè la materia che studia la fisiologia degli organismi rispetto alla loro capacità di adattamento all'ambiente).

Gruppi diversi di microrganismi, come batteri lattici, enterobatteri e altri Gram-negativi, batteri Gram-positivi sporigeni e non, lieviti e muffe, sono influenzati in maniera specifica da determinati valori di pH, di attività dell'acqua, di temperature di conservazione ecc., potendo così colonizzare il prodotto. Nel corso della produzione, trasformazione, trasporto, conservazione e consumo di un alimento, i microrganismi che lo contaminano possono crescere, sopravvivere o morire in funzione dell'azione esercitata dai vari fattori ecologici. Manipolando in maniera appropriata questi fattori è quindi possibile operare un'azione di controllo dei microrganismi negli alimenti. In effetti, questi fattori rappresentano la base su cui si fonda la maggior parte delle procedure di conservazione degli alimenti.

3.2 Crescita, sopravvivenza e morte dei microrganismi

Il controllo della crescita dei microrganismi negli alimenti è di fondamentale importanza sia per limitare lo sviluppo dei microrganismi dannosi (agenti di deterioramento, patogeni) sia per favorire quello dei microrganismi utili (agenti di fermentazioni, probiotici, colture bioprotettive).

Gli alimenti sono contaminati da una varietà di propagoli microbici (cellule vegetative, spore asessuali e sessuali) che possono far parte della comunità microbica caratteristica dell'alimento, provenire dall'ambiente esterno o essere veicolati da animali o dagli operatori (Par. 2.3).

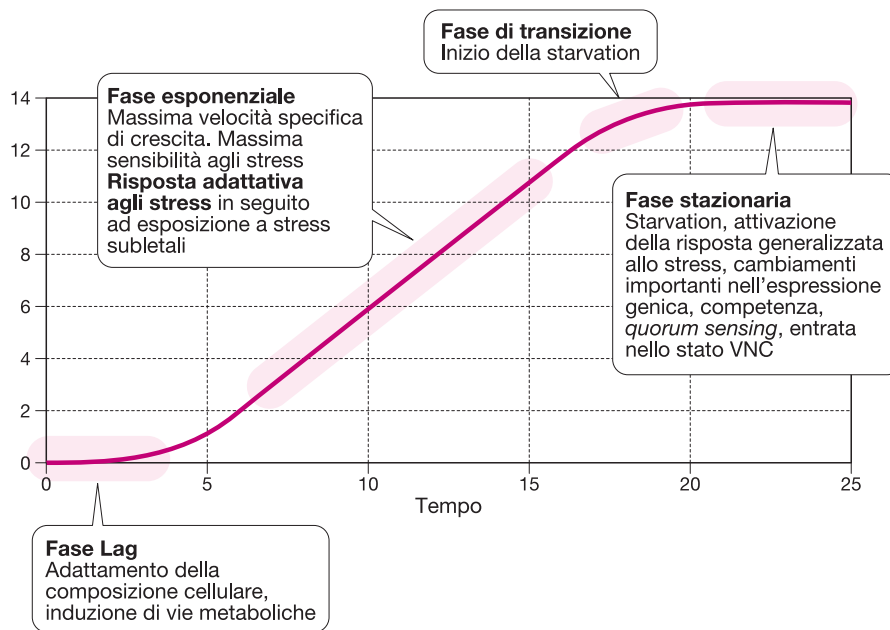
Quando una cellula o una spora microbica contamina un alimento, la combinazione dei fattori legati alla sua fisiologia e alla sua genetica, alla crescita nell'ambiente di provenienza, alle caratteristiche intrinseche del nuovo ambiente (Par. 3.4), ai fattori fisici che caratterizzano l'ambiente circostante l'alimento (Par. 3.5) e alle interazioni positive o negative con gli altri microrganismi presenti (Par. 3.6) determinano il tempo necessario per la prima divisione cellulare e la velocità alla quale la progenie potrà moltiplicarsi.

Molti microrganismi sono in grado di produrre forme dormienti, caratterizzate spesso da una maggiore resistenza alle condizioni avverse. L'esempio più classico sono le endospore eubatteriche e le spore sessuali resistenti prodotte da diversi eumiceti; in una popolazione di spore esiste una notevole eterogeneità nella capacità di germinare: la prima divisione cellulare, anche in seguito a trattamenti che inducono la germinazione (blandi trattamenti termici, alcuni trattamenti fisici, presenza di aminoacidi), può avvenire dopo 10-30 min ma anche dopo diversi giorni. Le spore per le quali è più difficile indurre la germinazione sono dette **superdormienti**. In alcuni casi (per esempio in seguito ad abbassamenti bruschi di temperatura o dopo un periodo prolungato in fase stazionaria), anche le cellule vegetative possono entrare in uno stato di dormienza e perdere temporaneamente la capacità di crescere, a meno che non vengano esposte a stimoli particolari. Le cellule che si trovano in questo caso sono definite **cellule vitali ma non coltivabili** (*Viable But Non-Culturable*, VBNC). Le cellule VBNC hanno generalmente dimensioni inferiori alle cellule coltivabili, sono dotate di attività metabolica, ma richiedono la presenza di alcuni stimoli esterni (ad esempio sostanze come sodio piruvato o cisteina, oltre a una sufficiente disponibilità di nutrienti) per poter iniziare la crescita.

La crescita può essere stimata con diverse tecniche (vedi Cap. 4). In ogni caso, in seguito alla contaminazione di un alimento o all'inoculo di un substrato di coltura, la **cinetica di crescita** ha un andamento approssimativamente sigmoidale (Fig. 3.1) e la popolazione microbica attraversa diverse fasi caratteristiche.

Alla **fase lag** segue una **fase di transizione**, in cui la velocità specifica di crescita (cioè la velocità alla quale la singola cellula o unità di biomassa cresce, espressa in tempo^{-1}) aumenta fino al valore massimo possibile nelle condizioni colturali. In realtà, l'insieme della fase lag e della fase di transizione per l'intera popolazione sono la risultante dell'eterogeneità nel tempo necessario alle singole cellule per dividersi la prima volta. La durata della fase lag (λ), che può non essere misurabile in condizioni ottimali di crescita e può raggiungere valori di oltre 100 h quando le condizioni sono particolarmente inibitorie, è un parametro particolarmente importante: nel controllo dei micror-

Figura 3.1 Crescita e adattamento. La cinetica di crescita viene tipicamente rappresentata in un grafico semilogaritmico, con il tempo sull'asse delle x e il logaritmo della biomassa, del numero di cellule vitali o del rapporto fra il numero di cellule vitali al tempo t con quelle iniziali sull'asse delle y. Benché sia più comune usare il logaritmo decimale del numero di cellule, l'uso del logaritmo naturale consente di stimare direttamente la velocità specifica di crescita dalla pendenza della curva durante la fase esponenziale.



ganismi indesiderati è preferibile estendere la fase lag il più possibile. λ è in genere inversamente proporzionale alla velocità specifica di crescita massima.

Durante la fase esponenziale, la velocità di crescita specifica è massima e costante, e la crescita è bilanciata. La cinetica può essere rappresentata dalle classiche equazioni della crescita esponenziale:

$$N_t = N_0 e^{\mu(t-t_0)} \quad (1)$$

$$\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right) = e^{\mu t} \quad (2)$$

Dove N_t è il numero di microrganismi al tempo t (h), N_0 il numero di microrganismi al tempo 0, μ la **velocità specifica di crescita** (in h^{-1} , che assume il valore massimo, $\mu_{\max}$, in fase esponenziale). Dal momento che il numero di microrganismi viene comunemente espresso come logaritmo decimale, l'equazione (2) può essere rappresentata come:

$$N_t = \log N_0 + \frac{\mu(t-t_0)}{2,303} \quad (3)$$

La **velocità specifica di crescita** può essere quindi stimata dalla pendenza del segmento

rettilineo della curva di crescita. Altrettanto frequentemente la velocità di crescita viene rappresentata utilizzando il **tempo medio di generazione** (MGT, cioè il tempo necessario perché la biomassa o il numero di cellule raddoppi):

$$\ln \frac{2N_0}{N_0} = \ln 2 = \mu \text{MGT} \quad (4)$$

$$\text{MGT} = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0,693}{\mu}$$

In condizioni ottimali la velocità specifica di crescita massima varia generalmente fra 2 h^{-1} (corrispondente a un MGT di ca. 20 min) e $0,3 \text{ h}^{-1}$ (corrispondente a un MGT di ca. 2 h). Tuttavia microrganismi come *Vibrio parahaemolyticus* possono compiere una divisione ogni 10-12 min, mentre a basse temperature di crescita possono essere richiesti anche 4-5 gg per una singola divisione cellulare.

Raramente la crescita esponenziale dura a lungo, se non in condizioni di laboratorio. A causa dell'esaurimento di nutrienti essenziali, dell'accumulo di prodotti del metabolismo (ad esempio acidi organici, con conseguente abbassamento del pH), della presenza di sostanze antimicrobiche, o per meccanismi

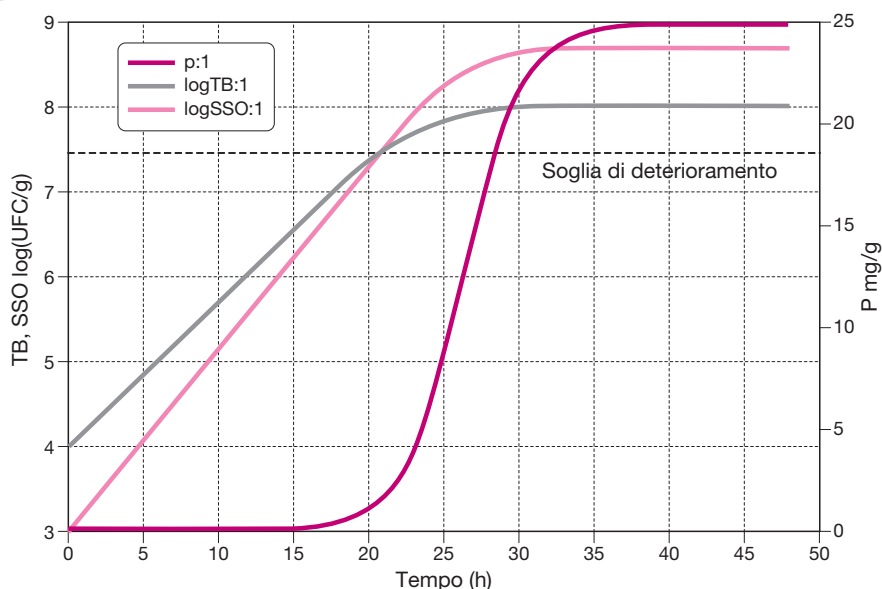
connessi al **quorum sensing** (vedi Cap. 2), la velocità di crescita progressivamente rallenta fino a diventare nulla in termini netti (il numero di nuove cellule può bilanciare il numero di cellule morte). La fase di transizione e la **fase stazionaria** sono particolarmente importanti per la sopravvivenza delle popolazioni microbiche: l'espressione di geni e la sintesi di proteine cambia sostanzialmente rispetto alla fase esponenziale e, negli sporigeni, viene indotta la differenziazione che porterà alla formazione delle endospore. Le cellule in fase stazionaria mostrano in genere una maggiore resistenza agli stress chimici e fisici rispetto alle cellule in fase esponenziale (Box 3.1) a causa dell'induzione di una **risposta generalizzata allo stress**. Alla fase stazionaria può seguire una fase di morte, preceduta dall'ingresso in uno stato di dormienza o non-coltivabilità.

La popolazione massima raggiunta in un alimento alla fase stazionaria ha una notevole importanza: per molti alimenti il deterioramento può essere percepito quando il numero di

cellule vitali raggiunge 5×10^7 - 1×10^8 UFC per g, mL o cm². Benché generalmente gli alimenti possano supportare numeri di cellule $> 10^8$ /g o mL, interazioni con altri microrganismi, come fenomeni di competizione, amensalismo (Par. 3.6) o ambienti particolarmente inibitori possono limitare sostanzialmente la popolazione massima. In alcuni casi, all'esaurimento di un nutriente essenziale segue una breve fase transitoria, seguita da una nuova fase di crescita, resa possibile dalla sintesi degli enzimi necessari all'uso degli altri nutrienti presenti (**crescita diauxica**).

Negli alimenti raramente i microrganismi crescono in coltura pura. Le specie o ceppi che sono in grado di crescere più velocemente finiranno per dominare rapidamente la comunità microbica e caratterizzare il deterioramento di un alimento, che sarà causato dall'accumulo dei loro metaboliti caratteristici (Fig. 3.2). Il microrganismo dominante al momento del deterioramento viene chiamato **Specific Spoilage Organism** (anche se talvolta il deterioramento è dominato da una comunità specifica

Figura 3.2 Crescita e deterioramento. Una simulazione della crescita della microflora totale (TB) e dei microrganismi deterioranti (SSO, *specific spoilage organism*, rappresentati da una sola specie dominante o da un'associazione di specie); p rappresenta il metabolita microbico con la più bassa soglia di percezione sensoriale che caratterizza il deterioramento. Gli SSO, anche se inizialmente presenti a livelli relativamente bassi, prendono il sopravvento perché più adatti alle condizioni ecologiche prevalenti nell'alimento. Quando la concentrazione del metabolita p raggiunge la soglia alla quale è percepito dai consumatori, il prodotto è deteriorato. Nella maggior parte dei casi ciò avviene quando il numero degli SSO è fra 5×10^7 e 1×10^8 UFC/g o cm², anche se per alcuni metaboliti con soglie di percezione particolarmente basse il prodotto può risultare deteriorato anche con livelli di contaminazione inferiori.



Box 3.1 Adattamento allo stress

I microrganismi rispondono a stress fisici, fisico-chimici e chimici non letali attraverso meccanismi (fattori σ alternativi, regolatori specifici, sistemi di HK/RR - istidina chinasi/regolatore di risposta) che possono variare da una specie all'altra. Le Figure B.3.1 e B.3.2 mostrano l'insieme dei geni e delle vie metaboliche attivate dall'esposizione a stress termici e acidi od osmotici. Alcuni dei geni e operoni indotti in seguito all'esposizione allo stress sono comuni per molti microrganismi e per diverse categorie di stress; in particolare tra questi abbiamo le chaperonine (DnaK/J, GrpE, GroES/EL) e i complessi multimerici formati dalla proteinas ClpP e dalle Clp-ATPasi, che sono responsabili del corretto ripiegamento o della degradazione delle proteine denaturate, e sono indotte sia da stress termici che acidi. Altri sistemi sono specifici per gruppi di microrganismi o per tipologia di stress. Per esempio, una maggiore estrusione di protoni da parte della pompa di protoni ATPasi F_0/F_1 , con consumo di ATP, e i meccanismi di decarbossilazione di aminoacidi, la produzione di vari tipi di *cold-shock proteins* e l'accumulo di soluti biocompatibili sono caratteristici della risposta allo stress acido in molti microrganismi. Altri sistemi, come il sistema della arginina deiminasi o l'ureasi, sono specifici per alcuni microrganismi e tipi di stress. La risposta allo stress implica in genere un consumo energetico elevato. Per questo, stress prolungati, troppo intensi o la combinazione di diversi stress possono risultare in un danno temporaneo o nella morte dei microrganismi.

Figura B.3.1 Risposta allo stress termico e da freddo. Diversi regolatori di risposta sono responsabili dell'induzione o della repressione dei geni implicati nella risposta agli stress da caldo e da freddo. La risposta allo stress termico è accompagnata praticamente in tutti i microrganismi dalla sovraespressione di *heat-shock proteins*, che comprendono chaperonine (DnaK/J, GroES/L), che contribuiscono al ripiegamento corretto delle proteine denaturate, e complessi fra proteinasi e Clp-ATPasi, che degradano le proteine non correttamente ripiegate. Sia nello stress termico che in quello da freddo la composizione della membrana interna ed esterna (per i Gram-negativi) può essere modificata in maniera sostanziale. La risposta allo shock da freddo è spesso accompagnata dalla produzione di piccole proteine (*Cold Shock Proteins*) che contribuiscono al mantenimento della corretta struttura di mRNA.

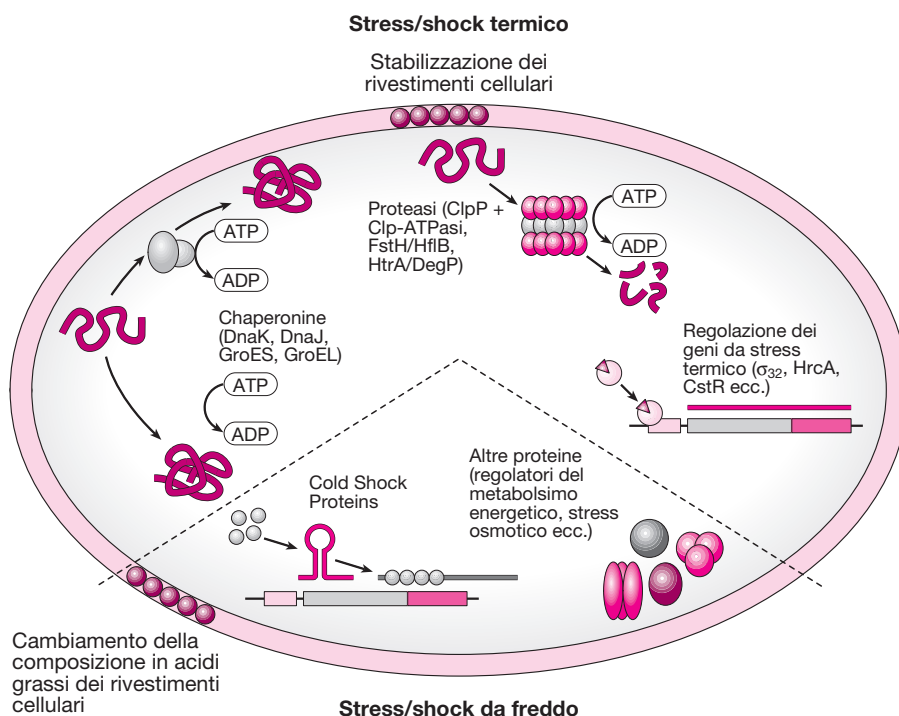
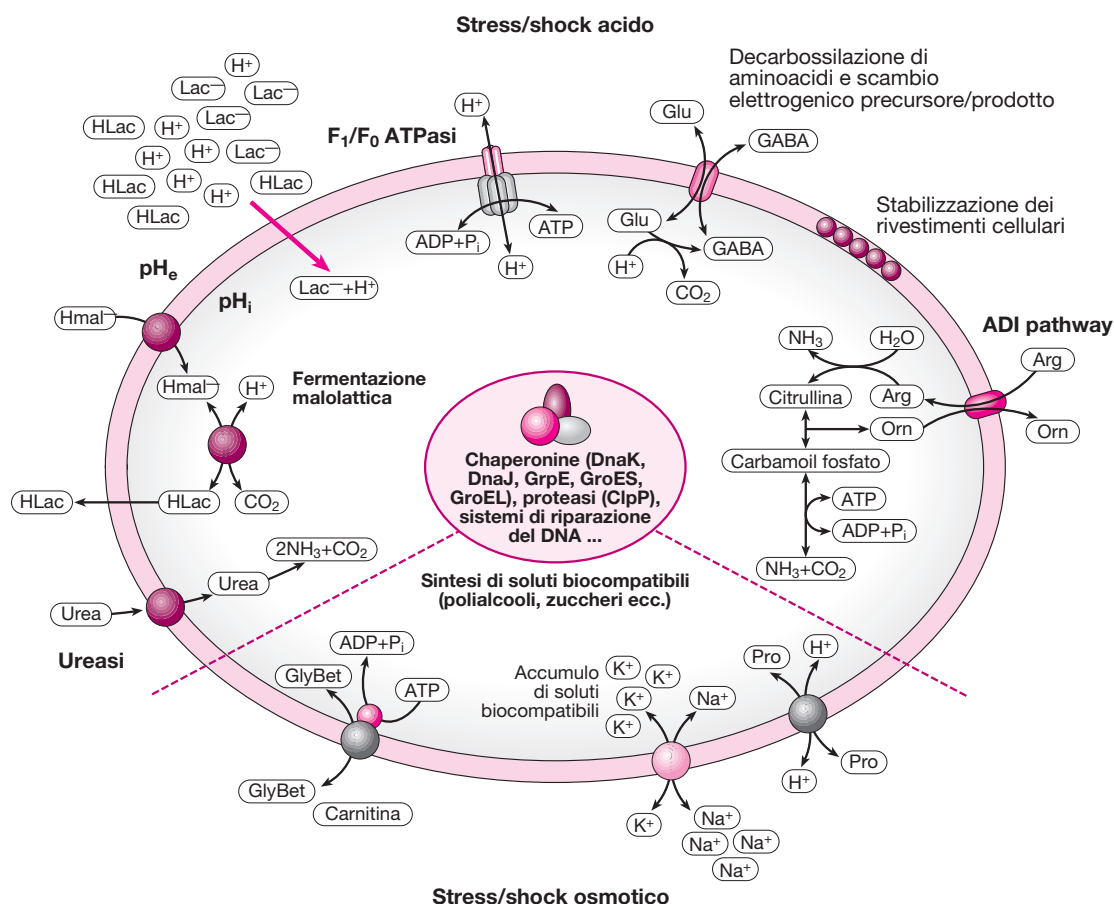


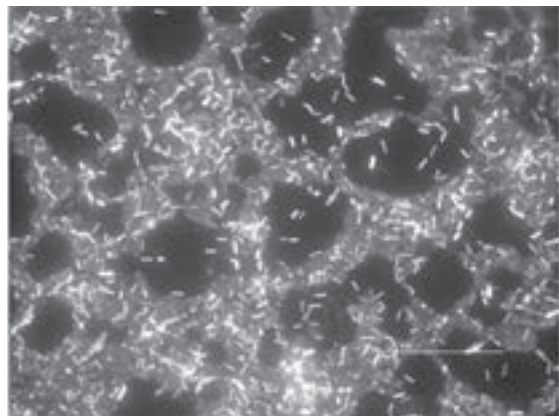
Figura B.3.2 Risposta agli stress acido e osmotico. Diversi sistemi consentono di mantenere un differenziale sufficiente fra pH extracellulare e intracellulare. L'abbassamento del pH intracellulare è causato dall'ingresso di acidi organici in forma indissociata attraverso la membrana, con successiva dissociazione all'interno della cellula. In caso di stress blandi l'estrusione di protoni mediante la pompa ATPasi F_0/F_1 può essere sufficiente. La decarbossilazione di aminoacidi e lo scambio elettrogenico precursore/prodotto (con espulsione delle amine prodotte) determina consumo di protoni, così come la decarbossilazione di alcuni acidi organici (per esempio nella fermentazione malolattica). Altri sistemi, come l'ureasi o la via dell'arginina deiminasi contribuiscono direttamente all'alcalinizzazione del citoplasma per formazione di ammoniaca. Nella risposta allo stress osmotico vengono accumulati (per sintesi, un meccanismo relativamente lento) o per trasporto di soluti biocompatibili. Dal momento che sia l'abbassamento del pH intracellulare sia il cambiamento della forza ionica dovuto a stress osmotici possono causare danni alla struttura di proteine e acidi nucleici, la risposta a questi stress è generalmente accompagnata anche dalla sintesi di proteine correlate con la risposta allo stress termico.



composta da più popolazioni microbiche: *Specific Spoilage Association*). Talvolta la storia di un alimento è caratterizzata da successioni di popolazioni e comunità microbiche, e la comunità microbica che aveva causato il deterioramento viene sostituita da altre (*Transient Specific Spoilage Association*).

Mentre in coltura liquida la crescita nella massa del substrato è relativamente omogenea, in alimenti solidi, date le piccole dimensioni

dei microrganismi, prevalgono condizioni di eterogeneità: la stessa contaminazione dell'alimento può essere notevolmente eterogenea e la crescita avviene sotto forma di microcolonie che si sviluppano da un unico propagolo o sotto forma di **biofilm** (Fig. 3.3) sulle superfici. In entrambi i casi la crescita è influenzata dalle condizioni prevalenti nello spazio molto piccolo (il **microhabitat**, spesso < 1 mm³) occupato dai microrganismi.

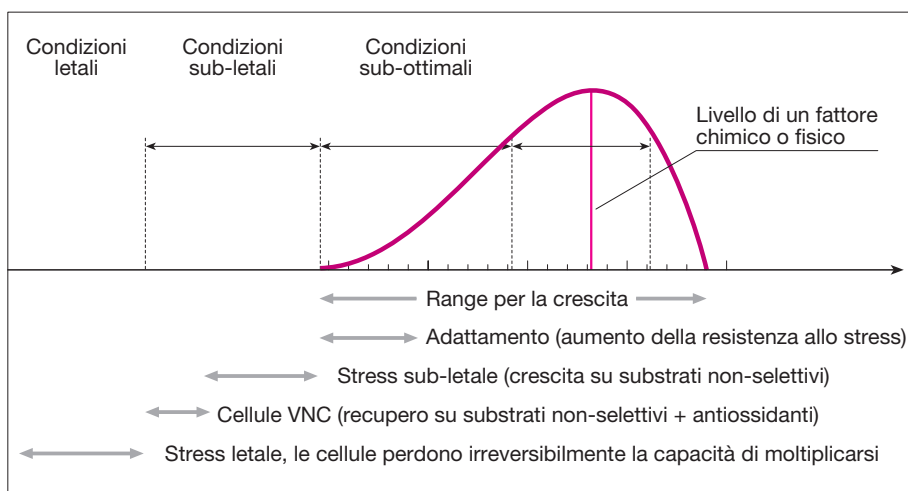
Figura 3.3 Immagine di un biofilm polimicrobico.

I fattori ambientali hanno una profonda influenza su crescita e sopravvivenza dei microrganismi (Fig. 3.4). Per ciascun fattore fisico e chimico, nel range permissivo per la crescita (fra i valori cardinali minimo e massimo), la velocità di crescita specifica varia da 0 a un massimo corrispondente alle condizioni ottimali per la crescita. Minimo e massimo possono essere significativamente influenzati dalla presenza di altri fattori inibitori: questo aspetto è sfruttato nel controllo dei microrganismi usando un approccio basato su combinazioni di *hurdles* (ostacoli) (vedi Cap. 5). La crescita in condizioni sub-ottimali induce l'espressione di una varietà di geni e vie metaboliche connessi con la tolleranza generalizzata

agli stress o con la tolleranza a uno stress specifico (Box 3.1). Questo fenomeno, oltre ad aumentare la tolleranza a uno stress specifico, può indurre una resistenza crociata ad altri stress: per esempio, un'esposizione a temperature subletali, oltre ad aumentare significativamente la resistenza agli stress da calore, aumenta in genere la resistenza allo stress acido.

Al di sotto del minimo e al di sopra del massimo per la crescita, in funzione dell'intensità dello stress, le cellule subiscono danni progressivi, prima subletali (le cellule rimangono vitali ma possono essere incapaci di iniziare la crescita in condizioni di stress) e poi letali. Una cellula microbica muore quando perde irreversibilmente la capacità di crescere e moltiplicarsi.

I diversi stati delle cellule microbiche negli alimenti sono descritti nella Tabella 3.1. I confini fra cellule stressate a livello subletale e cellule vitali ma non coltivabili sono labili e spesso non è possibile accertare in modo univoco lo stato in cui una cellula si trova. Il danno subletale e la non-coltivabilità, tuttavia, hanno conseguenze importanti: microrganismi stressati a livello subletale potrebbero non essere in grado di crescere in terreni selettivi, fornendo falsi risultati negativi nei test microbiologici (uso di tecniche di recupero) pur essendo in grado di tornare vitali se le condizioni stressanti vengono rimosse o attenuate.

Figura 3.4 Relazioni fra crescita, stress e sopravvivenza in funzione della concentrazione o intensità di un fattore fisico o chimico. VNC = cellule vitali ma non coltivabili.

(adattato da Ray B., 2004, fig. 9.5 p. 118, Da Sorlini C., Biavati B., *Microbiologia generale ed agraria*, Capitolo 14, fig. 19)

Tabella 3.1 Cellule vitali, danneggiate a livello subletale, non coltivabili, morte.

Stato delle cellule	Crescita su terreni non selettivi	Crescita su terreni selettivi	Membrana cellulare integra	Attività metabolica
Vitali, non danneggiate	Sì	Sì	Sì	Sì
Vitali, danneggiate a livello sub-letale	Sì	Sì, dopo resuscitazione	Sì	Sì
Vitali, non coltivabili	Sì, dopo resuscitazione	No	Sì	Sì
Morte	No	No	No	No

3.3 Classificazione dei fattori ecofisiologici

La crescita e la sopravvivenza dei microrganismi è influenzata da un gran numero di fattori di natura fisica, chimica e biologica. I fattori ecofisiologici sono in genere classificati in tre grandi gruppi (Tab. 3.2).

L'evoluzione delle comunità microbiche negli alimenti è quindi caratterizzata da una complessa serie di eventi e fattori, che generalmente interagiscono fra di loro. La comunità microbica che contamina inizialmente una materia prima o un ingrediente può cambiare sostanzialmente in termini quantitativi e qualitativi a causa della crescita o della morte di popolazioni, legata ai fattori intrinseci e alle condizioni prevalenti (temperatura, atmosfera di conservazione) durante la conservazione iniziale. Successivamente, i fattori estrinseci (temperatura e atmosfera di conservazione, trattamenti fisici e chimici letali o sub-letali) e ulteriori contaminazioni possono modificare anche sostanzialmente la comunità iniziale. Gli stessi microrganismi, crescendo, possono alte-

rare significativamente i fattori intrinseci ed estrinseci dell'alimento, modificandone per esempio il pH, la struttura, la composizione, il potenziale redox e limitando o favorendo la crescita di altri microrganismi.

Le sezioni che seguono presentano una descrizione generale dell'effetto di fattori intrinseci, estrinseci e impliciti sulla crescita e sopravvivenza dei microrganismi.

3.4 Fattori intrinseci

I fattori intrinseci caratterizzano l'alimento e derivano dalla sua composizione e dalla sua struttura.

■ pH e acidità

Il pH degli alimenti, cioè la misura diretta della presenza in essi di ioni idrogeno liberi, è uno dei fattori in grado di influenzare in maniera più significativa il comportamento dei microrganismi. La conservazione degli alimenti mediante acidificazione, ottenuta sia attraverso

Tabella 3.2 I fattori che influenzano crescita e sopravvivenza dei microrganismi.

Gruppo di fattori	Definizione	Esempi
Fattori intrinseci	Fattori caratteristici dell'alimento, derivanti dalla sua composizione o struttura	pH/acidità, attività dell'acqua, potenziale redox, disponibilità di nutrienti, presenza di agenti antimicrobici naturali, barriere fisiche
Fattori estrinseci	Fattori ambientali che agiscono durante la trasformazione o conservazione dell'alimento. Possono modificare i fattori intrinseci	temperatura di conservazione, trattamenti fisici (calore, irraggiamento, trattamenti con alte pressioni o correnti elettriche pulsate, essiccamento), modificazione dell'atmosfera di confezionamento, aggiunta di conservanti
Fattori impliciti	Fattori che derivano dall'interazione fra popolazioni microbiche durante la produzione o la conservazione	Interazioni positive (commensalismo, proto-cooperazione, simbiosi), interazioni negative (competizione, amensalismo, predazione, parassitismo)

i processi di fermentazione sia con l'aggiunta deliberata di acidi deboli, è stata praticata fin dai tempi più antichi.

Dal momento che il pH degli alimenti viene aggiustato aggiungendo direttamente acidi organici o consentendone la produzione per fermentazione, oltre al pH, è utile conoscere il pK_a degli acidi organici presenti. All'equilibrio, il pK_a rappresenta il pH a cui le concentrazioni di acidi dissociati e indissociati sono uguali. Gli acidi deboli (che sono la maggior parte degli acidi presenti negli alimenti) hanno valori di pK_a più alti degli acidi forti, e quindi sono solo parzialmente dissociati al pH degli alimenti. Ogni funzione acida (mono, di o tricarbossilica) di un acido presenta un suo valore di pK_a . L'acido acetico (CH_3COOH , $pK_a = 4,75$), l'acido lattico ($CH_3CHOCOOH$, $pK_a = 3,8$) o l'acido citrico ($COOHCH_2CHOCOOHCH_2COOH$, $pK_a = 3,1$) sono alcuni degli acidi organici naturalmente presenti in diversi alimenti e maggiormente utilizzati come conservanti; la loro efficacia antimicrobica è maggiore allo stato indissociato, e la concentrazione della forma indissociata aumenta con l'abbassamento del pH. Alcuni microrganismi possono utilizzare, in particolari condizioni, gli acidi organici deboli presenti negli alimenti come elementi nutritivi per la loro crescita, determinando innalzamenti dei valori di pH con conseguente creazione di un ambiente favorevole allo sviluppo di altri microrganismi.

Il pH dell'ambiente ha un profondo effetto sulla crescita e sopravvivenza di muffe, lieviti e batteri, i quali presentano valori di pH minimi, massimi e ottimali di crescita. Generalizzando, si possono indicare i range di pH per i vari gruppi di microrganismi, anche se singole specie di un dato gruppo possono differire in maniera significativa nei loro valori minimi di pH di crescita. Muffe e lieviti crescono a pH inferiori a quelli dei batteri. In particolare le muffe possono crescere tra valori di pH compresi tra 1,5 e 9,0 con valori ottimali compresi tra 3,0 e 3,5, mentre i lieviti tra 2,0 e 8,5 con valori ottimali tra 4,0 e 4,5. I batteri hanno limiti di crescita più ristretti, con minimi tra 4,0 e 4,5 e massimi di 8,0-9,0 e valori ottimali compresi tra 6,8 e 7,2. I batteri Gram-negativi sono in generale più sensibili ai bassi pH dei batteri Gram-positivi. Nella Tabella 3.3 sono riportati i valori di pH cardinali di alcuni gruppi e specie di batteri, lieviti e muffe di interesse alimentare. I microrganismi sono arbitraria-

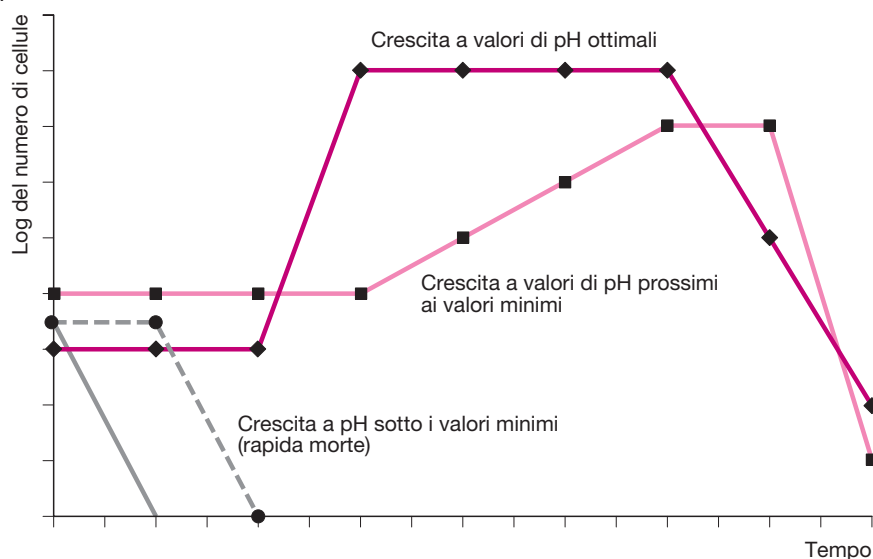
mente divisi in gruppi in base alla loro capacità di crescere e sopravvivere ai diversi valori di pH. In particolare, i microrganismi che sviluppano meglio a pH neutro sono definiti **neutrofili** (la maggior parte dei batteri di interesse alimentare, con poche eccezioni rappresentate per esempio dai batteri lattici e acetici che crescono bene anche a pH più bassi), quelli che sviluppano a pH acidi ($pH < 5,5$) sono detti **acidofili**, mentre quelli che presentano sviluppi ottimali a pH alcalini ($pH > 8,0$) sono detti **basofili** o **alcalofili** (ne sono un esempio alcune specie del genere *Vibrio*); infine sono noti come **acidotolleranti** i microrganismi che sono in grado di sopravvivere a pH bassi. Nella Figura 3.5 sono riportate le curve di crescita di un ipotetico microrganismo in funzione dei valori di pH. A pH inferiore a quello minimo per la crescita le cellule possono morire più o meno rapidamente o sopravvivere per periodi più o meno lunghi.

I valori di pH minimi e massimi non devono essere considerati in termini assoluti: essi sono fortemente dipendenti dai valori degli altri fattori di crescita e dal tipo di acido presente. Nella maggior parte dei casi questi valori sono determinati in colture di laboratorio sulla base della capacità della specie in esame di iniziare la crescita ai valori di pH indicati e dove i valori degli altri fattori di crescita (temperatura, a_w , nutrienti, antimicrobici, potenziale redox ecc.) sono mantenuti ai loro livelli ottimali. Molto più spesso, negli alimenti, diversi fattori ecologici possono presentare valori in grado di inibire di per sé lo sviluppo microbico; in queste condizioni, nella maggior parte dei casi, il pH minimo per la crescita si innalza. Per esempio, a temperature prossime ai valori ottimali di crescita del microrganismo, il range di pH entro cui può avvenire la crescita è più ampio di quello che consente la crescita a temperature non ottimali. Allo stesso modo, al pH ottimale di crescita, la variazione della temperatura di conservazione dell'alimento determina una variazione del tasso di crescita del microrganismo.

Altre interazioni tra vari fattori ecologici possono limitare sia la crescita dei microrganismi, sia influenzarne alcune importanti attività metaboliche come la produzione di tossine. Per esempio, il pH minimo che permette la crescita di *Staphylococcus aureus* è 4,5 in presenza di una concentrazione di NaCl compresa tra 8 e 10%; in presenza di concentrazioni del 16% di

Tabella 3.3 Valori di pH di crescita di alcuni microrganismi di interesse alimentare.

Microrganismi	Valori di pH		
	minimo	optimum	massimo
<i>Aeromonas</i> spp.	4,5	7,2	
<i>Bacillus</i> spp.	5,0	6,8-7,5	9,4-10,0
<i>Bacillus cereus</i>	4,4-4,9	7,0	9,3
Batteri acetici	4,0	5,4-6,3	9,2
Batteri lattici	3,2	5,5-6,5	10,5
<i>Brucella</i> spp.	4,5-5,1	7,3-7,5	8,2-8,8
<i>Campylobacter jejuni</i>	4,9-5,5	7,0	8,0-9,0
<i>Clostridium botulinum</i> A-B	4,7-4,8	7,0	8,5-9,0
<i>Clostridium botulinum</i> E	5,0	7,0	8,5
<i>Clostridium perfringens</i>	5,0-5,5	7,0	8,0-8,9
Enterobatteri	5,6	6,5-7,5	9,0
<i>Escherichia coli</i>	4,6	7,0	9,5
<i>Fusarium</i> spp.	1,8	3,0-3,5	11,1
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,5-4,8	7,0	8,0-9,6
<i>Pseudomonas</i> spp.	5,6	6,6-7,0	8,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,35	4,5	8,6
<i>Salmonella</i> spp.	3,8-4,5	7,0	9,0
<i>Shigella</i> spp.	3,8	7,0-7,5	9,0-11,0
<i>Staphylococcus</i> spp.	4,2	6,8-7,5	9,3
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2-4,3	7,0	9,0-9,3
<i>Vibrio cholerae</i>	6,0	7,0	9,6-11,0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8-5,0	8,0	9,0-9,6
<i>Vibrio vulnificus</i>	5,0	8,0	10,0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,4	7,0	9,0-9,6

Figura 3.5 Influenza del pH sulla crescita dei microrganismi quando gli altri fattori ecologici (temperatura, a_w , nutrienti ecc.) sono mantenuti ai loro livelli ottimali.

NaCl, il microrganismo richiede per la crescita un pH minimo di 6, ancora in grado di influenzare la produzione delle enterotossine, che richiede range di pH ancora più ristretti.

Il pH interno (**pH intracellulare**, pH_{in}) delle cellule microbiche presenta valori prossimi alla neutralità (con poche eccezioni: per esempio il pH_{in} delle cellule di lievito è 5,8), e le membrane cellulari sono impermeabili agli ioni H^+ e OH^- . Valori di pH estremi influenzano in maniera decisiva le fonti energetiche della cellula microbica, alterando lo stato della forza proton-motrice a livello della membrana citoplasmatica, con conseguenti ripercussioni a livello della sintesi di ATP, dei processi di trasporto e della motilità mediata da flagelli.

La possibilità di crescita dei microrganismi quando si trovano in ecosistemi con pH acidi o alcalini dipende dalla loro capacità di adattare il loro pH_{in} in funzione delle variazioni del pH extracellulare (pH_{out}). Tale adattamento può avvenire attraverso opportune modificazioni del metabolismo batterico, che vedono coinvolti diversi meccanismi, quali la risposta omeostatica, la risposta alla tolleranza agli acidi (ATR, **acid tolerance response**) e la produzione di proteine da stress acido (ASP, **acid shock proteins**). Il ricorso dei microrganismi ai vari meccanismi di risposta allo stress acido può variare tra i diversi gruppi microbici e nell'ambito dello stesso gruppo la risposta può dipendere dalla specie o dal ceppo. Ad esempio, per *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium, quando il pH_{out} è $> 6,0$, il pH_{in} viene aggiustato mediante una risposta omeostatica a livello dei sistemi di trasporto (simporto, antiporto), incrementando l'attività delle pompe di protoni in maniera da espellere più protoni dal citoplasma. Quando il pH_{out} è fra 5,5 e 6,0 viene indotta una ATR, accompagnata dall'espressione differenziale di almeno 18 proteine induttrici. Quando il pH di un alimento è diverso da quello ottimale per la crescita, le conseguenze per la cellula possono riguardare attività quali il funzionamento delle permeasi (che sono saturate con ioni H^+ o OH^-) deputate al trasporto all'interno della cellula di nutrienti, la produzione e attività di enzimi extracellulari e i meccanismi di produzione di ATP a livello della membrana. In particolare, quando una cellula si trova in un ambiente i cui valori di pH sono a livelli sub-ottimali (prossimi ai valori minimi o massimi di crescita), gli ioni H^+ e OH^- influen-

zano lo stato esterno della cellula senza modificare il pH_{in} , alterando, quindi, l'equilibrio di cariche tra l'esterno e l'interno della membrana citoplasmatica (Fig. 3.6a). Quando invece una cellula si trova in un ambiente i cui valori di pH sono fuori dal range di crescita, per esempio a pH molto acidi, la membrana cellulare viene danneggiata e gli ioni H^+ e OH^- possono penetrare all'interno della cellula; l'abbassamento del pH_{in} determina la denaturazione delle proteine e degli acidi nucleici con conseguente morte della cellula (Fig. 3.6b). Più bassi sono i valori di pH_{out} e maggiore sarà il dispendio energetico della cellula microbica per mantenere il pH_{in} vicino alla neutralità e conseguentemente la cellula avrà meno energia per svolgere le sue funzioni vitali (riproduzione, tossinogenesi, sporogenesi, mobilità ecc.). Inoltre, come già accennato in precedenza, i valori di pH minimi e massimi per la crescita dei microrganismi dipendono dal tipo di acido presente e dal loro grado di dissociazione. Gli acidi forti (come HCl e H_3PO_4) si dissociano completamente, mentre gli acidi deboli (come acido lattico o acido acetico) restano in equilibrio con la forma dissociata e non dissociata. A pH acido l'equilibrio si sposta verso la forma indissociata, che entra facilmente all'interno della cellula dove, grazie al pH neutro, viene dissociata determinando l'abbassamento del pH_{in} e la denaturazione delle proteine e degli acidi nucleici con conseguente morte della cellula (Fig. 3.6c).

Oltre agli effetti diretti sul comportamento dei microrganismi negli alimenti, il pH svolge anche un'azione di controllo indiretto, in quanto rende le cellule microbiche più sensibili ad altri trattamenti tecnologici (stress). Per esempio, il pH acido influenza in maniera decisiva l'effetto letale dei trattamenti termici e l'efficacia antimicrobica di alcuni conservanti chimici.

Gli alimenti freschi non trasformati presentano valori di pH molto variabili (Tab. 3.4). In generale, è possibile fare una classificazione degli alimenti in funzione del loro pH:

- **alimenti non acidi** $5,5 < pH < 7,0$: (carne bovina, pollame e pesce, vegetali), che consente la crescita della maggior parte dei microrganismi;
- **alimenti a media acidità** $4,5 < pH < 5,5$: possono supportare la sopravvivenza e/o la crescita di molti microrganismi, anche patogeni;

Figura 3.6 Effetti del pH sulla cellula microbica. Effetto del pH sulla cellula in ambienti con valori di pH prossimi alla neutralità (a); effetto del pH sulla cellula in ambienti di pH acidi o alcalini (b); effetto degli acidi organici (c).

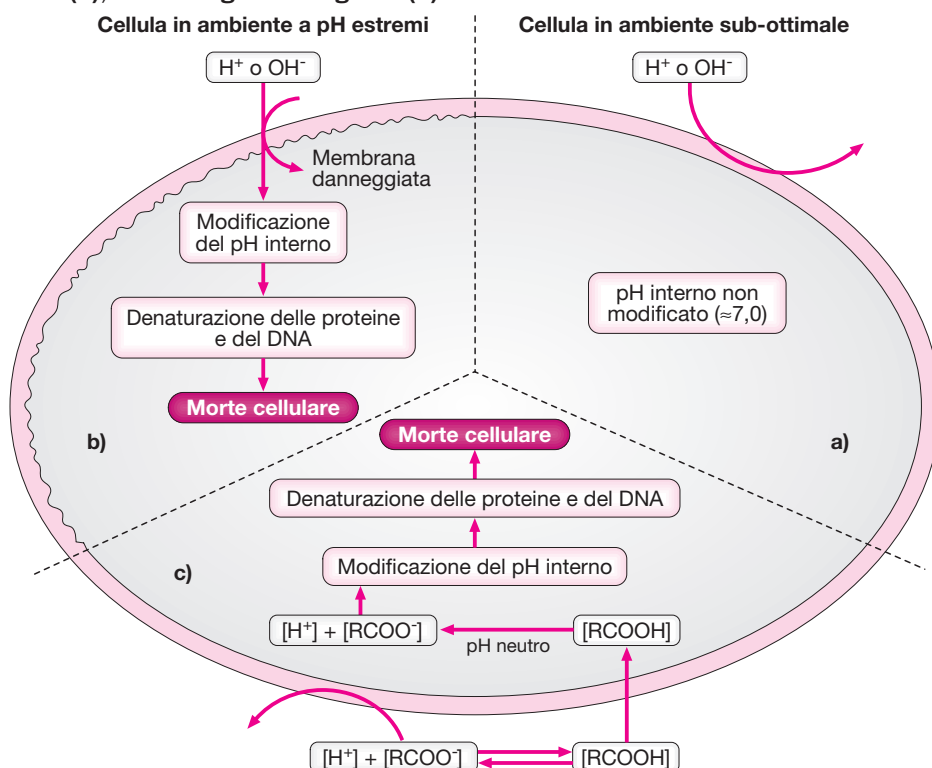


Tabella 3.4 Valori di pH minimi per la crescita dei microrganismi.

Verdure	pH	Frutta	pH	Carne	pH
Olive	3,6-3,8	Limone	1,8-2,0	Carne di manzo	5,1-6,2
Cetriolo	3,8	Mele	2,9-3,3	Carne di agnello	5,3-6,9
Pomodori	4,2-4,3	Prugne	2,8-4,6	Carne di maiale	5,4-6,7
Barbabietole	4,2-4,4	Pompelmo	3,0	Carne di pollo	6,2-6,4
Carote	4,9-5,2	Uva	3,4-4,5	Prosciutto	5,9-6,2
Asparagi	5,7-6,1	Arance	3,6-4,3	Pesce (molte specie)	6,6-6,8
Cipolle	5,3-5,8	Banane	4,5-4,7	Tonno	5,2-6,1
Cavolfiore	5,6	Fichi	4,6	Merluzzo	6,2-6,6
Spinaci	5,5-6,0	Cocomero	5,2-5,6	Molluschi	6,5
Broccoli	6,5	Melone	6,3-6,7	Gamberi	6,8-7,0

- **alimenti acidi $3,7 < \text{pH} < 4,5$:** possono supportare la sopravvivenza di microrganismi acidotolleranti, anche patogeni e la crescita di microrganismi acidofili. In ogni modo è ampiamente ritenuto che gli alimenti con pH inferiore a 4,5 non consentono lo sviluppo della maggior parte dei batteri patogeni;
 - **alimenti molto acidi $\text{pH} < 3,7$:** possono supportare la crescita solo dei microrganismi più acidofili;
 - **alimenti alcalini $7 < \text{pH} < 11$:** sono rari, per esempio l'albume d'uovo.
- Il pH negli alimenti può cambiare come conseguenza dell'attività dei microrganismi. Si pensi,

per esempio, all'acidificazione del latte dovuta alla produzione di acido lattico a opera dei batteri lattici, all'aumento del pH della carne dovuto alla produzione di ammonio da aminoacidi quando essa è alterata (soprattutto da batteri Gram-negativi come *Pseudomonas* spp.), oppure all'abbassamento del pH della carne quando è trasformata in insaccati fermentati. Il pH di molti altri alimenti viene modificato, aggiustandolo a valori acidi ($\text{pH} < 3,5-4,2$) mediante l'aggiunta di acidi organici come acido lattico, citrico o acetico. Per esempio l'acido acetico viene comunemente impiegato come conservante nella ricetta per la produzione di maionese e di altri condimenti per insalate. Negli alimenti inscatolati il valore di pH 4,5 è utilizzato per differenziare le conserve che necessitano di trattamenti termici di sterilizzazione da altre che richiedono trattamenti termici meno drastici. In questi alimenti il principale pericolo microbiologico è rappresentato da *Clostridium botulinum*, il quale non risulta in grado di crescere e produrre tossine a valori di pH inferiori a 4,5.

■ Attività dell'acqua (a_w)

Senza la presenza di acqua i microrganismi non sono in grado di svolgere le proprie attività metaboliche e dunque di crescere e moltiplicarsi. In un alimento la quantità totale di acqua (**umidità**) è presente sia in forma libera (utilizzabile dai microrganismi) che legata a componenti dell'alimento stesso o fisicamente immobilizzata. Pratiche come l'aggiunta di sale o di zuccheri agli alimenti o la loro essiccazione, sfruttando l'aria e il sole per la rimozione dell'acqua, sono impiegate fin dall'antichità come metodi di conservazione degli alimenti. L'acqua può essere non disponibile per i microrganismi per diverse cause: contiene soluti disciolti come sali o zuccheri; è cristallizzata sotto forma di ghiaccio; è presente come acqua di idratazione; è assorbita sulle superfici. Solo l'acqua libera presente in un ambiente consente la crescita dei microrganismi, e questo spiega perché conoscere il contenuto di umidità totale di un alimento non fornisce informazioni utili per prevedere la varietà dei microrganismi che vi possono crescere e dunque i tempi di alterazione.

L'**attività dell'acqua** (*water activity*, a_w) è la misura della disponibilità di acqua libera

presente in un ambiente per lo svolgimento delle funzioni biologiche dei microrganismi e, per un alimento, può essere definita come il rapporto tra la **pressione di vapore** dell'acqua dell'alimento (p) e la pressione di vapore dell'acqua pura (p_0).

La pressione di vapore si misura in Pascal (Pa) e dipende strettamente dalla temperatura: a 0 °C l'acqua pura ha una pressione di vapore di 0,610 kPa, mentre a 25 °C ha una pressione di vapore di 3,173 kPa.

L'attività dell'acqua può assumere solo valori compresi tra 1 [(la pressione di vapore dell'acqua dell'alimento è uguale a quella dell'acqua pura ($P = P_0 = 1$))] e 0 [(in materiali molto secchi non vi sono molecole di acqua in grado di esercitare una pressione di vapore ($P = 0$))]. In realtà nessun alimento può avere una a_w uguale a 1 o 0.

Il passaggio del vapore acqueo dall'alimento all'ambiente che lo circonda dipende da una serie di fattori, quali l'umidità e la natura dell'alimento e la temperatura e l'umidità dell'aria. Il contenuto di acqua nell'atmosfera sopra l'alimento, quando, a temperatura costante, va in equilibrio con l'acqua presente nell'alimento, prende il nome **Umidità Relativa all'Equilibrio** (ERH, *Equilibrium Relative Humidity*, in pratica l'umidità atmosferica). Essendo l'ERH correlata con l' a_w secondo la relazione: $\text{ERH} = 100a_w$, l'attività dell'acqua può essere anche definita nel seguente modo: $a_w = \text{ERH}(\%)/100$. Attualmente esistono strumenti in grado di misurare in maniera precisa e veloce l' a_w di un alimento mediante la misura della pressione del vapore d'acqua sopra l'alimento secondo la relazione dell' a_w con l'umidità relativa.

Proviamo, con un esempio, a spiegare come la pressione di vapore e l'attività dell'acqua siano correlate. Prendiamo un recipiente chiuso sotto vuoto e contenente acqua pura a 0 °C. Molecole di acqua sotto forma di vapore si liberano dalla superficie liquida nello spazio del recipiente, esercitando sul liquido una pressione. Quando il numero di molecole di acqua che evaporano e quelle che condensano è lo stesso, è stato raggiunto un equilibrio. In questa condizione, la pressione esercitata dal vapore d'acqua è di 0,6105 kPa e l'Umidità Relativa all'Equilibrio sopra l'acqua è 100%, per cui: a_w (acqua pura) = $0,6105/0,6105 = 1$. Se si aggiunge saccarosio o un altro soluto, un minor numero di molecole di acqua può libe-

rarsi dalla superficie liquida e quindi sarà minore la pressione esercitata all'interno del recipiente. Quando si raggiunge l'equilibrio, la pressione del vapore è ridotta a 0,6075 kPa e l'ERH sopra l'acqua è $< 100\%$ (99,5%), per cui: $a_w = 0,6075/0,6105 = 0,995$.

La crescita dei microrganismi negli alimenti è particolarmente influenzata dai valori dell'attività dell'acqua. I microrganismi presentano valori minimi e ottimali di a_w in funzione dei valori assunti dagli altri fattori ecologici; nella Tabella 3.5 sono riportati i valori minimi approssimativi di attività dell'acqua di alcune specie e gruppi di microrganismi. Alcuni gruppi di microrganismi sono particolarmente specializzati in ambienti con bassi valori di attività dell'acqua o contenenti sale. In base alla loro capacità di crescere e sopravvivere ai diversi valori di attività dell'acqua e concentrazione di cloruro di sodio, i microrganismi sono arbitrariamente divisi in gruppi, pur non avendo questa classificazione alcun significato tassonomico. A tal fine sono detti **xerofili** i microrganismi che prediligono basse concentrazioni di acqua (ambienti secchi). Per esempio muffe xerofile come *Xeromyces bisporus*, che alterano il pesce

salato o essiccato, risultano in grado di crescere a valori di a_w inferiori a 0,61. Per contro, questi microrganismi non sono in grado di moltiplicarsi a valori di a_w superiori a 0,96 (optimum compreso tra 0,85-0,90).

Alofili sono invece denominati quei microrganismi che amano il sale, richiedendo nell'ambiente di crescita la presenza di ioni sodio, mentre **alotolleranti** sono quei microrganismi che, pur potendo crescere in presenza di alte concentrazioni di sale, presentano valori ottimali di concentrazioni di NaCl basse; per esempio *Staphylococcus aureus* è un tipico microrganismo alotollerante (alodurico): i valori ottimali di NaCl per la crescita sono tra 0,5 e 4%, ma può crescere anche in presenza di concentrazioni di sale del 20% ($a_w = 0,83$). Inoltre il microrganismo è in grado di crescere anche in assenza di cloruro di sodio. Infine si definiscono **osmofili** (soprattutto alcune specie di lieviti) quei microrganismi che crescono in presenza di elevate concentrazioni zuccherine (elevate pressioni osmotiche). Il lievito *Zygosaccharomyces rouxii* cresce in presenza di almeno il 20% di saccarosio, ma può crescere fino a concentrazioni del 70% ($a_w = 0,62$).

Tabella 3.5 Valori di a_w minimi per la crescita dei microrganismi.

Gruppi microbici	a_w	Specifici microrganismi
	1,00	
	0,98	<i>Campylobacter</i> spp.
	0,97	<i>Clostridium botulinum</i> tipo E; <i>Pseudomonas</i> spp.
	0,96	<i>Escherichia coli</i> ; <i>Acinetobacter</i>
	0,95	<i>Bacillus subtilis</i> ; <i>Enterobacter aerogenes</i>
	0,94	<i>Clostridium botulinum</i> tipo A e B; <i>Candida utilis</i>
	0,93	<i>Rhizopus stolonifer</i> ; <i>Botrytis cinerea</i>
	0,92	<i>Listeria monocytogenes</i>
Maggior parte dei batteri alterativi	0,90	<i>Geotrichum candidum</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Maggior parte dei lieviti	0,88	<i>Staphylococcus aureus</i> (produzione tossine)
	0,86	<i>Staphylococcus aureus</i> (crescita)
	0,84	<i>Alternaria citri</i>
	0,81	<i>Penicillium patulum</i>
Maggior parte delle muffe	0,80	
Batteri alofili	0,75	
	0,70	<i>Aspergillus glaucus</i>
	0,64	<i>Aspergillus echinulatus</i>
Muffe xerofile	0,61	<i>Xeromyces bisporus</i>
Lieviti osmofili	0,61	
Alimenti con a_w al di sotto di 0,61 non consentono la crescita di nessun microrganismo		

La maggior parte degli alimenti freschi (carne, vegetali, frutta) presenta valori di a_w tali da permettere la crescita della maggior parte dei microrganismi. Nella Tabella 3.6 sono riportati i valori di a_w di alcuni alimenti. In generale, più è bassa l' a_w più è limitata la varietà di microrganismi che possono crescere, anche se molti sono in grado di sopravvivere per lunghi periodi. Alimenti con alti valori di attività dell'acqua sono soggetti a rapida alterazione, mentre quelli con valori inferiori a 0,61 sono stabili da un punto di vista microbiologico.

Come per il pH, è possibile classificare gli alimenti in categorie sulla base dei valori dell' a_w . Una possibile classificazione è la seguente:

- **Alimenti ad altissima a_w (0,99-0,95):** alimenti freschi o blandamente processati. Carne, pollame, latte, uova, vegetali, formaggi freschi.
- **Alimenti ad alta a_w (0,95-0,90):** alimenti processati come formaggi e salami fermentati, prosciutto, pane.
- **Alimenti a intermedia a_w (0,90-0,61):** alimenti trattati con processi di essiccazione o mediante l'aggiunta di elevate quantità di sale o zuccheri. Prosciutto e formaggi lungamente stagionati, frutta secca, marmellate.
- **Alimenti a bassa a_w (> 0,61):** latte in polvere, cioccolato, vegetali disidratati, miele, pasta, crackers, zucchero.

Combinando i valori di pH e di a_w , è possibile classificare alcune conserve alimentari (Tab.

3.7). Il termine **conserva** è utilizzato per indicare un prodotto che, dopo essere stato chiuso ermeticamente in un recipiente, è sottoposto a temperature di sterilizzazione che consentono la distruzione degli enzimi, di tutte le forme vegetative e delle spore microbiche di microrganismi patogeni e non. È utile ricordare che il pH determina anche il tipo di trattamento termico da applicare alle conserve; a valori di pH > 4,6 è necessario applicare un trattamento termico che possa causare almeno 12 riduzioni decimali (12D) di *Clostridium botulinum*.

Nella Figura 3.7 sono riportate, in forma schematica, le curve di crescita microbica in funzione dei valori di a_w , quando tutti gli altri fattori di crescita sono mantenuti al loro livello ottimale.

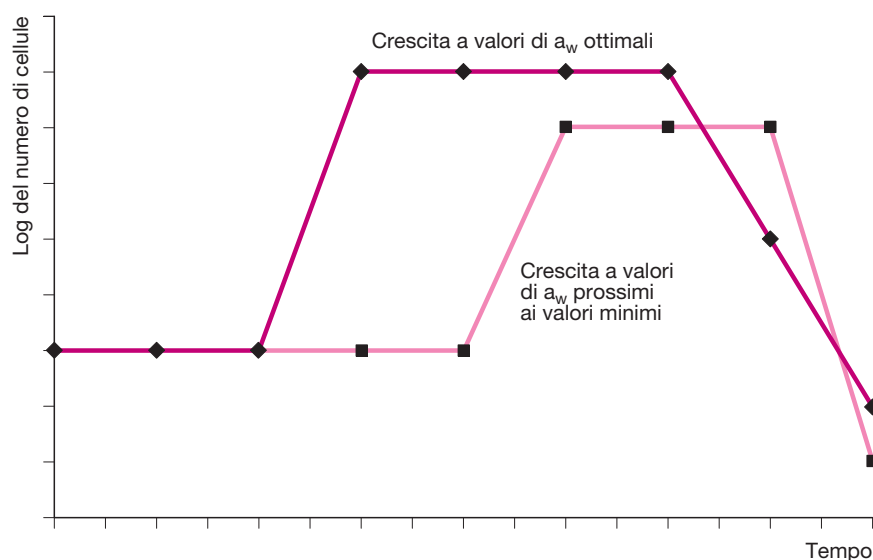
Al di sotto dei valori minimi di a_w , il comportamento dei microrganismi dipende molto da come l'acqua viene rimossa. Quando essa è rimossa a basse temperature (per es. **liofilizzazione** di un alimento) dalla cellula microbica, consente una sua sopravvivenza per lunghi periodi. Quando l' a_w di un alimento è abbassata attraverso l'aggiunta di sale o zucchero, le cellule microbiche sono soggette a fenomeni osmotici che ne causano una morte più rapida, per plasmolisi. La cellula subisce danni spesso irreversibili e la morte sopraggiunge per danni alla membrana e agli enzimi citoplasmatici. Gli effetti dei fenomeni osmotici sulla cellula microbica sono riassunti nella Figura 3.8. I microrganismi presentano vari meccanismi di adattamento alle variazioni di a_w . La strategia generale è quella di accumulare all'interno

Tabella 3.6 Attività dell'acqua di alcuni alimenti.

Alimento	a_w	Alimento	a_w
Succo di pomodoro	0,975	Verdure fresche	0,97
Pomodori interi in scatola	0,993	Frutta fresca	0,97
Macedonia in scatola	0,988	Succhi di frutta	0,97
Marmellate e gelatine	0,82-0,94	Uova	0,97
Miele	0,75	Formaggio fresco	0,97
Latte condensato	0,833	Pane	0,96
Crackers	0,10	Carne di manzo	0,94
Zucchero	0,10	Salame fresco	0,99
Farina	0,70	Cavolo	0,64-0,75
Latte magro in polvere	0,70	Carote	0,64-0,75
Verdure disidratate	0,70	Patate	0,64-0,75
Frutta secca	0,70	Fragole	0,65-0,75

Tabella 3.7 Classificazione delle conserve in base ai valori di attività dell'acqua e del pH.

a_w	Conserve acide		Conserve a bassa acidità
	pH < 4,3	4,3 < pH < 4,6	pH > 4,6
$a_w > 0,98$	succhi e polpe di agrumi, conserve di ortaggi all'aceto	succhi e polpe di frutta, succhi e passati di pomodoro, pomodori pelati, polpe e cubettati di pomodoro, conserve di frutta all'acqua e/o allo sciroppo	conserve di ortaggi al naturale, conserve sott'olio non fermentate e/o acidificate
$a_w < 0,98$	concentrati di pomodoro, concentrati di frutta, marmellate		
confetture e gelatine, ortaggi in salamoia fermentati	concentrati di pomodoro, concentrati di frutta, marmellate, confetture e gelatine, ortaggi in salamoia fermentati	ortaggi in salamoia non fermentati	

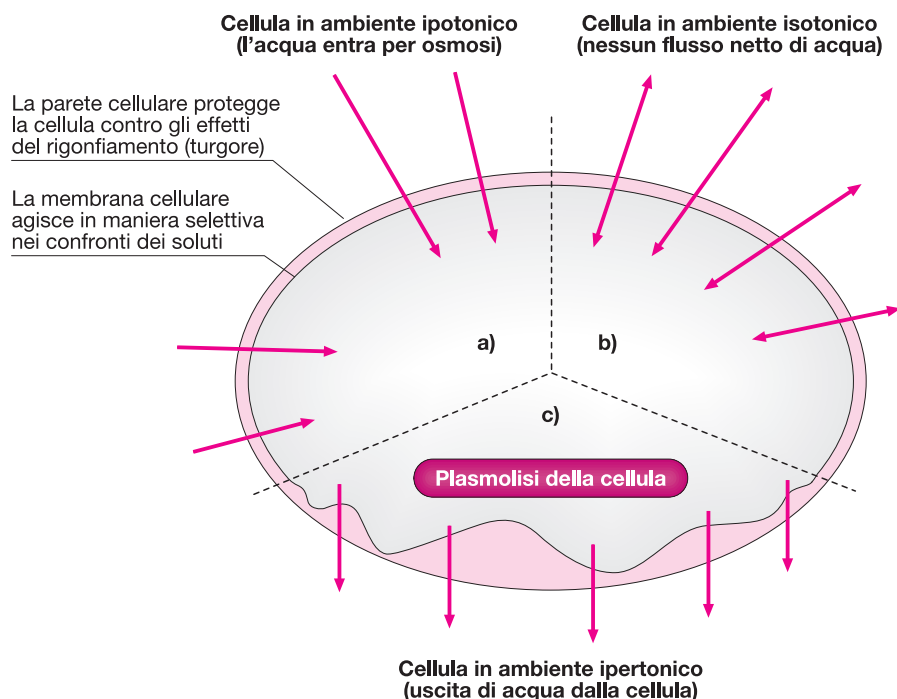
Figura 3.7 Influenza dell'attività dell'acqua sulla crescita dei microrganismi quando gli altri fattori ecologici (pH, temperatura, nutrienti ecc.) sono mantenuti ai loro livelli ottimali.

della cellula i soluti. I batteri possono adattarsi a variazioni di a_w nel range dei valori che ne consentono lo sviluppo mediante accumulo di soluti fisiologicamente compatibili (non tossici) che ristabiliscono le condizioni osmotiche ottimali. Tali soluti possono essere sintetizzati dalla cellula (batteri Gram-positivi, lieviti e muffe) oppure sono presi dall'ambiente di crescita (tutti i microrganismi). In particolare i batteri possono accumulare ioni K^+ e aminoacidi, mentre lieviti e muffe accumulano ioni K^+ e, a seconda della specie, zuccheri quali trealosio, saccarosio, glucosio e glicerolo.

■ Nutrienti e inibitori naturali

Per crescere negli alimenti, i microrganismi hanno bisogno di una sorgente di energia (zuccheri, alcoli, aminoacidi, carboidrati complessi, grassi) che consenta lo svolgimento delle loro attività cellulari e di una sorgente di composti chimici per la biosintesi dei componenti cellulari. La maggior parte dei microrganismi di interesse alimentare sono **chemioeterotrofi**, cioè utilizzano composti organici come sorgente di energia e di carbonio per la biosintesi dei componenti cellulari. In generale i microrganismi

Figura 3.8 Effetti dei fenomeni osmotici sulla cellula microbica in un ambiente ipotonico, in cui la concentrazione di soluti all'esterno è più bassa di quella all'interno della cellula (a), in un ambiente isotonico dove la concentrazione di soluti è la stessa all'interno e all'esterno della cellula (b) e in un ambiente ipertonico in cui la concentrazione di soluti all'esterno è più alta di quella all'interno della cellula (c).



smi mostrano una grande diversità nella capacità di utilizzare per le loro esigenze metaboliche le varie sostanze nutritive di un alimento. Quasi tutti gli alimenti hanno caratteristiche chimiche tali da soddisfare le esigenze nutritive di un gran numero e specie di microrganismi e la crescita dei microrganismi che contaminano un alimento raramente è limitata dal contenuto in nutrienti. In generale i batteri Gram-positivi sono, dal punto di vista nutrizionale, più esigenti dei batteri Gram-negativi, ed entrambi i gruppi sono più esigenti dei lieviti e delle muffe. I microrganismi predominanti negli alimenti sono quelli che più facilmente sono in grado di utilizzare i nutrienti presenti. In genere i carboidrati semplici e gli aminoacidi sono utilizzati per primi e solo quando essi diventano limitanti vengono utilizzate le forme più complesse di nutrienti.

Molti alimenti contengono naturalmente delle sostanze dotate di attività antimicrobica, che conferiscono un certo livello di stabilità microbiologica. In particolare i vegetali sono ricchi di costituenti antimicrobici, come gli oli essenziali, i tannini, i glicosidi e le resine. Altri antimicrobici naturali dei vegetali sono rappre-

sentati dalle fitoalessine e dalle lectine (proteine in grado di legarsi specificamente a diversi polisaccaridi, tra i quali le glicoproteine della superficie delle cellule microbiche, esercitando pertanto un'azione antimicrobica indiretta). Tuttavia, alle concentrazioni in cui queste sostanze sono presenti negli alimenti, l'azione antimicrobica può considerarsi lieve, anche se il loro effetto, combinato con altri fattori ecologici, contribuisce ad aumentare la stabilità degli alimenti. Anche alimenti di origine animale contengono sostanze antimicrobiche naturali: alcuni esempi sono rappresentati dal sistema lattoperossidasi presente nel latte bovino e dal lisozima nelle uova. Nella Tabella 3.8 sono riportati alcuni esempi di sostanze antimicrobiche naturalmente presenti in alcuni alimenti e la loro principale azione sui microrganismi.

Inoltre alcune sostanze antimicrobiche possono essere prodotte anche durante l'applicazione di alcuni trattamenti tecnologici agli alimenti. Per esempio durante l'affumicatura (carne, pesce, formaggi) si producono sostanze, come i fenoli, che oltre ad avere effetti antimicrobici abbassano il pH superficiale dell'alimento. Una certa azione antimicrobica è eserci-

Tabella 3.8 Sostanze antimicrobiche naturalmente presenti in alcuni alimenti.

Sostanza	Alimento	Microrganismi/Azione
Lisozima	Uova e latte	Batteri/Idrolizza la parete cellulare
Oli essenziali Eugenolo Timolo Carvacrolo	Diversi vegetali (chiodi di garofano, timo, origano ecc.)	Batteri e muffe/Azione sulle membrane biologiche
Acido idrossicinnamico e derivati (p-cumarico, ferulico, caffeico, clorogenico)	Frutta Vegetali Tè	Batteri e funghi
Lattoferrina	Latte	Soprattutto batteri
Sistema lattoperossidasi Mattoperossidasi Tiocianato Acqua ossigenata	Latte	Soprattutto batteri Gram-negativi. Tutti e tre i componenti devono essere presenti per avere l'effetto antimicrobico. Il target è rappresentato dalla membrana citoplasmatica

tata anche dai composti di condensazione che si producono durante la reazione di Maillard tra zuccheri e aminoacidi o peptidi con il riscaldamento. Ancora, sostanze antimicrobiche sono prodotte da microrganismi, in particolare dai batteri lattici, nei processi di fermentazione degli alimenti. Tra queste sostanze ricordiamo soprattutto le **batteriocine** (Par. 3.6), che sono definite come proteine biologicamente attive, con sintesi ribosomiale ed eventualmente modificate post-traduzionalmente, o complessi proteici in grado di esercitare attività battericida nei confronti di altre specie batteriche, ma non sul microrganismo produttore.

■ Potenziale redox

Tutti gli organismi viventi generano l'energia necessaria alle loro attività metaboliche attraverso reazioni di ossido-riduzione. In presenza di ossigeno, la maggior parte dei microrganismi presenti negli alimenti produce ATP attraverso la fosforilazione ossidativa, mentre in condizioni di anaerobiosi essi possono produrre ATP utilizzando accettori di elettroni diversi dall'ossigeno (nitrati, fumarato, tiosolfato ecc.) oppure mediante la fosforilazione a livello del substrato nei processi di fermentazione.

In funzione della loro crescita in presenza o in assenza di ossigeno libero, i microrganismi possono essere distinti in vari gruppi:

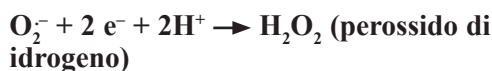
- **Aerobi:** richiedono ossigeno per produrre l'energia necessaria per la loro crescita. L'ossigeno funge da accettore finale di elettroni durante la respirazione aerobica che

coinvolge la glicolisi, il ciclo di Krebs e il sistema di trasporto degli elettroni. Es.: *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., molti funghi e alcuni lieviti.

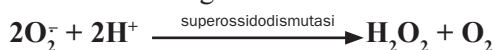
- **Microaerofili:** richiedono ossigeno per produrre l'energia necessaria per la loro crescita, ma in concentrazione minore di quello presente nell'aria (20%). Es.: *Campylobacter* spp.
- **Anaerobi facoltativi:** possono crescere sia in presenza sia in assenza di ossigeno. In presenza di sufficienti quantità di ossigeno generano energia come gli aerobi. In assenza di ossigeno utilizzano composti organici come accettori finali di elettroni. Es.: Lieviti, *Enterobacteriaceae* (*Salmonella* spp., *E. coli* ecc.), *Staphylococcus* spp.
- **Anaerobi obbligati:** crescono solo se non è presente ossigeno libero, che risulta tossico per la cellula. Traggono energia dai processi di fermentazione. Es.: *Clostridium botulinum* (*Cl. perfringens* è aerotollerante).
- **Anaerobi aerotolleranti:** possono crescere sia in presenza sia in assenza di ossigeno producendo la stessa quantità di energia e di prodotti metabolici in entrambe le condizioni. Sono quindi indipendenti dall'ossigeno. Es.: la maggior parte dei batteri lattici.

L'ossigeno quando è assorbito dalle cellule è ridotto facilmente, producendo sostanze tossiche per la cellula stessa (**reactive oxygen species, ROS**). In particolare il radicale superossido e il perossido di idrogeno (acqua ossigenata), essendo dei potenti ossidanti, possono

ossidare componenti vitali delle cellule, con conseguente morte. La produzione del radicale superossido e di acqua ossigenata avvengono secondo le seguenti reazioni:



Molti microrganismi possiedono enzimi specifici in grado di proteggerli dall'azione tossica dell'ossigeno. I batteri aerobi, gli anaerobi facoltativi e i batteri lattici hanno l'enzima **superossido dismutasi** che catalizza la conversione del superossido in perossido di idrogeno e di ossigeno. Il perossido di idrogeno è rimosso dall'azione di un altro enzima, la **catalasi**, presente nei batteri aerobi, negli anaerobi facoltativi e nei microaerofili. Queste reazioni sono schematizzate di seguito:



I batteri lattici non possiedono la catalasi e scindono il perossido di idrogeno per mezzo dell'enzima perossidasi secondo la seguente reazione:



I batteri anaerobi obbligati non hanno gli enzimi catalasi e superossido dismutasi, per cui in presenza di ossigeno muoiono.

Il **potenziale di ossido-riduzione** o redox (Eh, POR) può essere definito come una misura (espressa in milliVolt, mV) della tendenza di un substrato ad acquisire elettroni (diventando **ridotto**) o a cedere elettroni (diventando **ossidato**).

Come è noto, una reazione di ossido-riduzione è una reazione accoppiata in cui una sostanza è ossidata e una seconda è ridotta simultaneamente. A titolo di esempio, due classiche reazioni di ossido-riduzione sono rappresentate dalla produzione di alcol etilico e di acido lattico. Il substrato che cede elettroni (NADH) si ossida (a NAD⁺), mentre il substrato che acquista elettroni (acido piruvico e acetaldeide) si riduce (acido lattico e etanolo). In queste reazioni il donatore di elettroni, riducendo una sostanza ossidata, è detto anche agente riducente (o antiossidante), mentre l'accettore di elettroni, ossidando una sostanza ridotta, è detto anche agente ossidante.

Il POR di un materiale è misurato in unità elettriche espresse in milliVolt (mV) con un elettrodo standard di riferimento (0 mV) di platino circondato da idrogeno a pressione atmosferica, collegato a un Voltmetro. Le sostanze nel loro stato ossidato (con una tendenza ad accettare elettroni) producono correnti con valore positivo (+mV), mentre nel loro stato ridotto (con una tendenza a donare elettroni) danno un valore negativo (−mV). Il potenziale redox di un materiale può assumere valori che vanno da −421 a +816 mV. Più ossidato è un substrato, maggiormente positivo è il suo Eh; per contro, più ridotto è un substrato maggiormente negativo è il suo Eh.

Il POR di un alimento è determinato da una serie di fattori:

- Eh naturale dell'alimento;
- concentrazione (tensione) di ossigeno dell'atmosfera circostante;
- grado di accesso dell'atmosfera nell'alimento;
- processi di trasformazione a cui l'alimento è sottoposto;
- metabolismo microbico;
- capacità dell'alimento di resistere a cambiamenti di Eh;
- pH dell'alimento (la riduzione di 1 unità di pH comporta un aumento dell'Eh di 58 mV).

I tessuti vitali (animali e vegetali) tendenzialmente hanno un Eh negativo come conseguenza della loro attività respiratoria. Le superfici degli alimenti a contatto con l'aria hanno un Eh positivo, mentre i tessuti interni possono avere Eh negativi. Nella Tabella 3.9 sono riportati i valori di potenziale redox di alcuni alimenti. Tali valori sono fortemente influenzati dalle operazioni tecnologiche a cui l'alimento è sottoposto e dalla presenza di sostanze naturali riducenti. Per esempio le operazioni di omogeneizzazione, comportando la miscelazione di materie prime in presenza di aria, aumentano l'Eh (letta durante la produzione e l'imbottigliamento), oppure le operazioni di macinazione, aumentando la superficie di esposizione dell'alimento all'aria, ne aumentano l'Eh. La carne macinata ha un Eh di +200 mV comparata con la carne della carcassa (Eh da −150 a −200 mV). Ancora, con i trattamenti termici il riscaldamento scaccia l'ossigeno determinando una riduzione dell'Eh (per es. gli alimenti in scatola hanno Eh negativo).

Tabella 3.9 Valori di potenziale redox di alcuni alimenti.

Alimenti	Eh (mV)
Uovo (non fecondato)	+500
Succo d'uva	+409
Latte	da +200 a +340
Formaggi	da -20 a -200
Burro	da +290 a +350
Carne in scatola	da -20 a -150
Alimenti di origine vegetale	da 300 a 400
Carni intere (esterno)	+200
Carni intere (interno)	-200
Carne tritata	+200
Fegato	-200

Molti alimenti contengono naturalmente sostanze riducenti (o antiossidanti), come l'acido ascorbico nei vegetali e nella frutta, gli zuccheri riduttori in frutta, i gruppi -SH associati alle proteine della carne. Gli antiossidanti (cioè sostanze che rallentano o prevengono l'ossidazione di componenti alimentari) possono anche essere aggiunti deliberatamente agli alimenti come agenti conservanti (acido ascorbico e suoi sali, tocoferolo, gallati ecc.).

Il POR degli alimenti influenza la crescita dei microrganismi. Il range di Eh a cui i microrganismi possono crescere può essere così sintetizzato: aerobi da +300 a +500 mV; anaerobi facoltativi da +300 a -100 mV; anaerobi da +100 a -400 mV. Questi valori variano in funzione della presenza di antiossidanti e di ossigeno. Per esempio le muffe crescono preferibilmente sulla superficie degli alimenti a contatto con l'aria, anche se *Byssoschlamys fulva* può causare alterazione della frutta inscatolata. Il genere *Clostridium* è noto come anaerobio stretto, anche se alcune specie possono crescere a valori di Eh di +100 mV.

Si deve infine rilevare che in un alimento uno o più microrganismi possono modificare l'Eh, favorendo lo sviluppo di specie che normalmente non si sviluppano ai valori di Eh inizialmente presenti.

3.5 Fattori estrinseci

Si definiscono fattori estrinseci i fattori ambientali che intervengono durante la lavorazione e la conservazione dell'alimento, al punto da poterne modificare i fattori intrinseci.

■ Temperatura

Il regime termico al quale gli alimenti vengono esposti dalla raccolta al consumo è sicuramente uno dei fattori più importanti nell'influenzare la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi. Come per altri fattori intrinseci ed estrinseci, i microrganismi possono crescere soltanto in un range definito di temperature (Fig. 3.9), che di solito non eccede i 35 °C per i microrganismi **euritermi**, mentre può essere molto più ridotto per molti microrganismi patogeni obbligati, che sono strettamente adattati alla crescita nell'organismo ospite (**stenotermi**). Sulla base delle temperature cardinali i microrganismi di interesse alimentare sono solitamente classificati in tre gruppi principali: psicrofili, mesofili e termofili (Tab. 3.10). Come è possibile notare dalla tabella, i range per la crescita dei diversi gruppi si accavallano e non è sempre possibile classificare un microrganismo in un gruppo o nell'altro. I veri **psicrofili** (o **psicrofili obbligati**) sono rari e sono caratterizzati dall'incapacità di crescere al di sopra dei 20 °C: spesso si tratta di microrganismi il cui habitat naturale sono i mari o i laghi molto freddi. Gli **psicrofili moderati** o **psicrotrofici** sono caratterizzati dalla capacità di crescere a temperature di refrigerazione, ma hanno un *optimum* per la crescita vicino a quello dei mesofili. In realtà una distinzione funzionale fra i due gruppi è difficile: entrambi sono caratterizzati dalla capacità di formare colonie visibili in 7-10 gg a 7 °C. Gli psicrotrofici (e in minor misura gli psicrofili) hanno una grande importanza per la qualità microbiologica e la sicurezza igienica di alimenti freschi e trasformati conservati a tempe-

Figura 3.9 Effetto della temperatura sulla crescita dei microrganismi. Il grafico rappresenta l'effetto della temperatura sulla velocità specifica di crescita di un fermento lattico, *Weissella confusa*. I cerchi rappresentano le velocità specifiche di crescita misurate mentre la linea continua rappresenta la velocità di crescita predetta con un modello matematico. Nella figura sono indicate le temperature cardinali (minima, ottima e massima).

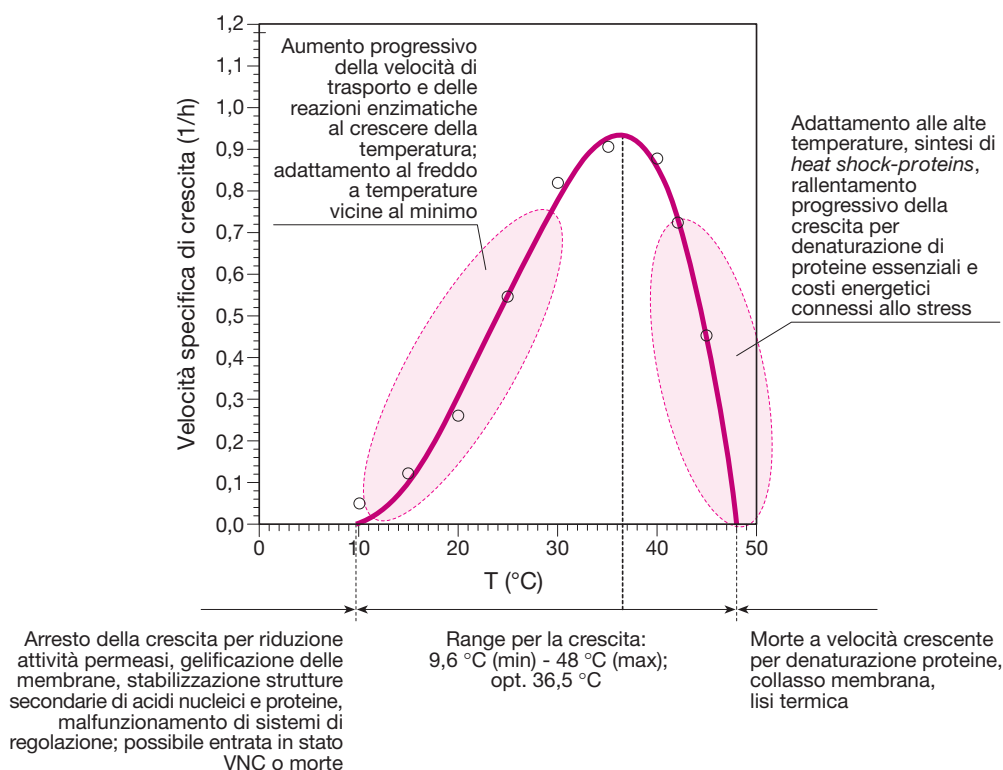
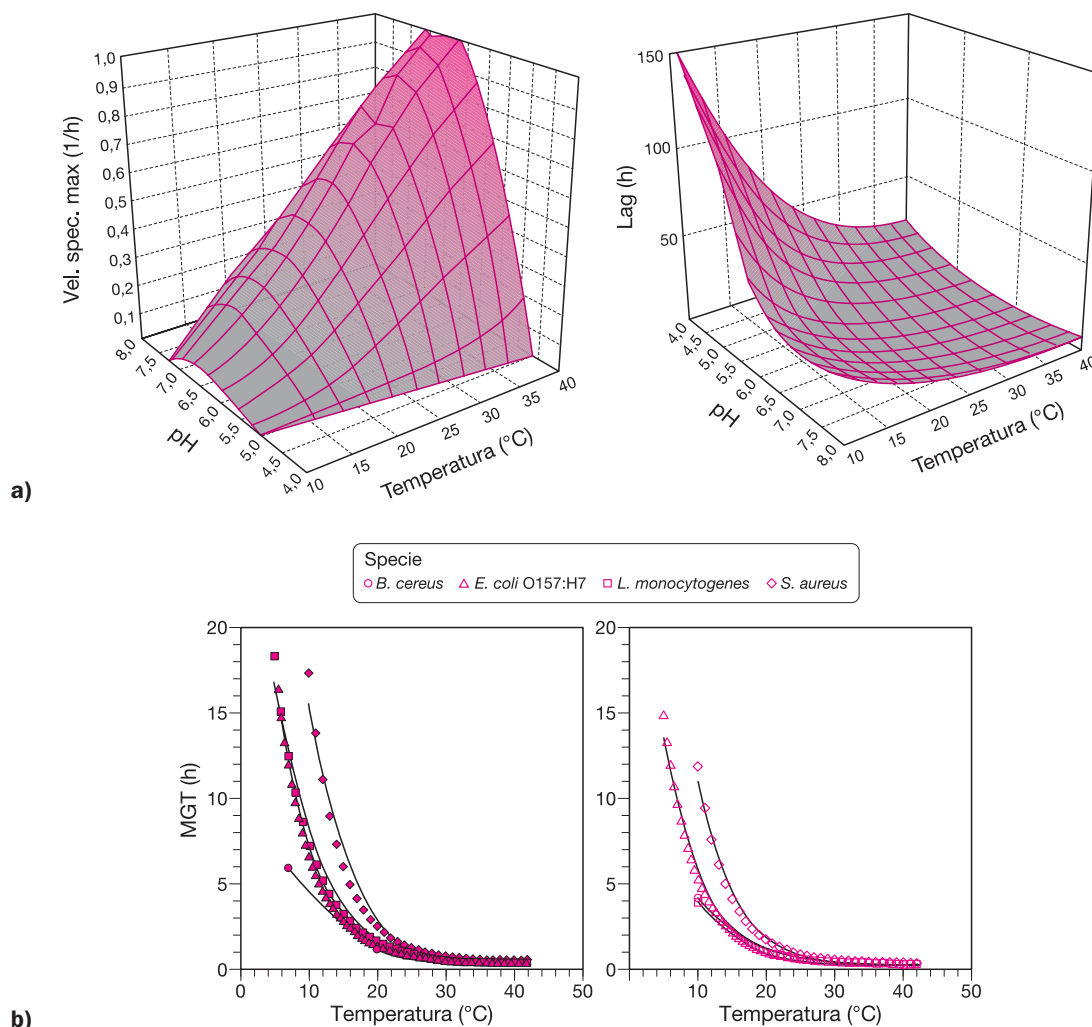


Tabella 3.10 Classificazione dei microrganismi sulla base del range di temperatura per la crescita.

Gruppo	T _{min} (°C)	T _{opt} (°C)	T _{max} (°C)	Esempi
Psicrofili	-15÷0	10÷20	20÷22	<i>Clostridium gasigenes</i> , <i>Psychrobacter alimentarius</i> , <i>Vibrio marinus</i> , <i>Cryptococcus cerealis</i> , <i>Thamnidium elegans</i>
Psicrotrofici	-5÷5	25÷30	30÷40	<i>Aeromonas hydrophila</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i> , <i>Clostridium botulinum</i> (tipo E), <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>P. putida</i> , <i>Leuconostoc gelidum</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> ,
Mesofili	5÷25	25÷40	40÷50	<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>Clostridium botulinum</i> (tipo A e B), <i>C. sporogenes</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Termofili	35÷40	45÷55	60÷80	<i>Bacillus coagulans</i> , <i>Geobacillus stearothermophilus</i> , <i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>

Figura 3.10 a) Interazioni fra temperatura e pH. Effetto di temperatura e pH sulla velocità specifica massima di crescita e durata della fase lag di *Listeria monocytogenes* in brodo di coltura, con 0,5% NaCl, in aerobiosi. b) Interazioni fra temperatura e pH. Tempo medio di generazione per 4 microrganismi patogeni a pH 5,5 (sinistra) e 6,5 (destra) in brodo di coltura, con 0,5% NaCl, in aerobiosi.



perature di refrigerazione, e includono patogeni importanti come *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophyla*, *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium botulinum* tipo E.

Le temperature minima e massima per la crescita di un determinato microrganismo sono significativamente influenzate da altri fattori intrinseci ed estrinseci. In generale, quando altre condizioni sono subinibitorie, il range per la crescita si restringe e le cellule possono mostrare una fase lag molto più prolungata. Questo effetto è illustrato nella Figura 3.10 per *Listeria monocytogenes*. Al pH ottimale, il range di temperatura per la crescita è più ampio e la velocità

specifiche massima di crescita in condizioni ottimali è maggiore. Al diminuire del pH il range di temperatura per la crescita si restringe.

I fattori che determinano la temperatura minima ($T_{\min}$) e massima ($T_{\max}$) di crescita sono mostrati nella Figura 3.9. La crescita in condizioni di stress termico ha grande rilevanza: l'esposizione a temperature vicine al massimo di crescita può determinare, a causa dell'espressione di *heat shock proteins*, un significativo incremento di resistenza allo stress termico, con aumento della sopravvivenza in seguito a blandi trattamenti termici. Inoltre le cellule adattate al calore mostrano un incremento della

resistenza verso altri stress (acido, osmotico) e possono sopravvivere meglio di cellule non adattate in alimenti conservati mediante l'uso di combinazioni sub-letali di fattori. La crescita a temperature vicine al minimo aumenta la tolleranza allo stress da congelamento: questo fenomeno può essere sfruttato per migliorare la sopravvivenza di colture starter e probiotiche. Inoltre, a basse temperature i microrganismi tendono a modificare la composizione della loro membrana cellulare, con aumento della proporzione di acidi grassi poliinsaturi e/o ramificati e con conseguente aumento della fluidità di membrana.

Fra la temperatura minima e massima per la crescita la velocità specifica di crescita aumenta con un Q_{10} (l'incremento di velocità di una reazione in seguito a un incremento della temperatura di 10 °C) compreso in genere fra 1,5 e 2,5. Tuttavia, a temperature molto vicine al minimo, i valori di Q_{10} possono essere molto più alti (anche 4-5). Di conseguenza, anche un aumento della temperatura di soli 5 °C è sufficiente a raddoppiare la velocità specifica di crescita.

Al di sotto di T_{min} , e fino a quando non si raggiungono temperature di congelamento, la crescita si arresta, senza danni (almeno nel breve periodo) per la vitalità cellulare. Brevi e moderati abbassamenti della temperatura non hanno conseguenze prolungate sulla crescita, che può riprendere quasi immediatamente quando la temperatura risale. Tuttavia, bruschi abbassamenti di temperatura possono indurre l'entrata nello stato VBNC e/o possono risultare in una fase lag molto prolungata. Quando le temperature scendono al di sotto di 0 °C inizia il congelamento, in funzione della concentrazione di soluti, della presenza di polimeri idrofili e di grassi. Il congelamento ha un effetto letale più o meno pronunciato sui microrganismi (con maggiore sensibilità per le forme bastoncellari rispetto a quelle cocciche, per i Gram-negativi rispetto ai Gram-positivi, mentre la sopravvivenza di cellule vegetative di lieviti e muffe è variabile e le endospore e le spore sessuali sono resistenti).

Al di sopra di T_{max} il danno termico determina una morte progressiva delle cellule vegetative e delle spore. I fenomeni connessi alla resistenza termica di cellule vegetative e spore e i trattamenti termici, tradizionali e non, utilizzati per il risanamento e la conservazione degli ali-

menti saranno descritti nel Capitolo 5, mentre le applicazioni specifiche per ogni alimento sono descritte nella parte seconda. In generale, minore è T_{max} , minore è la resistenza termica delle sue cellule vegetative e delle sue spore. I microrganismi psicrotrofici sono in genere distrutti anche da blandi trattamenti termici (ca. 50 °C), ma diversi psicrotrofici sporigeni (*Clostridium botulinum* tipo E e F, alcuni ceppi di *Bacillus cereus* ecc.) producono spore che possono sopravvivere alla pastorizzazione e germinare e crescere a temperature di refrigerazione. Oltre che per la distruzione dei microrganismi, alte temperature possono essere utilizzate per conservare temporaneamente gli alimenti: alimenti cotti dovrebbero essere refrigerati prontamente o tenuti a > 65 °C (nessun microrganismo patogeno e pochissimi agenti di deterioramento sono in grado di crescere in queste condizioni).

Le basse temperature (con conservazione dei cibi deperibili in ghiaccio) erano già usate nei climi freddi in tempi preistorici. Anche se i primi refrigeratori e congelatori domestici sono stati commercializzati in Germania intorno al 1890, essi si sono diffusi universalmente nella distribuzione e nella commercializzazione solo a partire dalla seconda guerra mondiale. La temperatura di conservazione refrigerata degli alimenti varia sostanzialmente da un alimento all'altro (Tab. 3.11), molti tipi di frutta e ortaggi non possono essere conservati al di sotto di 7-10 °C a causa dell'insorgenza di fisiopatie, ed è strettamente legata ad altri fattori intrinseci ed estrinseci (in particolare RH e atmosfera di conservazione) che selezionano la *specific spoilage association*. In linea di massima possiamo distinguere 3 gruppi di temperature di conservazione refrigerata: refrigerazione in celle, cantine o ambienti naturali, fra 7 e 15 °C, in ambienti più o meno asciutti, adatta a salumi e formaggi stagionati e ad alcuni tipi di frutta, bulbi e tuberi; conservazione in refrigeratori, fra 2 e 8 °C, destinata alla maggior parte degli alimenti freschi deperibili (alta a_w , pH vicino alla neutralità); conservazione alla temperatura del ghiaccio fondente, adatta a prodotti della pesca e molluschi.

L'interesse crescente dei consumatori per alimenti freschi, pronti per l'uso, minimamente conservati (cioè senza l'uso di dosi eccessive di conservanti o trattati con trattamenti fisici estremi) ha da una parte aumentato il numero di

Tabella 3.11 Temperature e umidità relative per la conservazione refrigerata di diverse derrate alimentari.

Prodotto	Temperatura (° C)	RH (%)
Albicocche	-0,5 ÷ 0	85÷90
Banane	11,7÷15,6	85÷90
Fagiolini, peperoni	7,2	85÷90
Cavoli, lattuga, carote	0	90÷95
Limoni	12,8÷14,4	85÷90
Meloni	4,4÷10	80÷85
Noci	0÷2,2	65÷70
Cipolle	0	70÷75
Pomodori (maturi)	4,4÷10	85÷90
Carni fresche e pollame	0÷7	85÷90
Carni macinate e separate meccanicamente	0÷2	85÷90
Pesce, molluschi, crostacei freschi	0	85÷90
Latte crudo, latte pastorizzato, formaggi freschi	0÷6	-
Formaggi stagionati, salumi	10÷12	65÷70

prodotti pronti per il consumo a *shelf-life* medio/lunga (> 15 gg), specialmente nella Grande Distribuzione Organizzata, dall'altra ha richiesto lo sviluppo di tecnologie sempre più sofisticate nella produzione e nel controllo qualità, e ha portato all'emergere di nuovi agenti di deterioramento, selezionati dall'insieme di trattamenti utilizzati per la produzione di questi alimenti. Inoltre i nuovi prodotti pronti per il consumo possono presentare un rischio aumentato da patogeni psicotrofici, alcuni dei quali, come *Listeria monocytogenes*, sono tolleranti a numerosi stress.

Benché esistano microrganismi che possono crescere fra -5 e -15 °C (specialmente in alimenti ricchi di zuccheri, come i succhi concentrati) e benché la minima temperatura registrata per la crescita di un microrganismo di origine alimentare (un lievito del genere *Candida*) sia -34 °C, il congelamento al di sotto di -18 °C arresta la crescita di praticamente tutti i microrganismi. Se la temperatura di congelamento viene mantenuta, il deterioramento dei cibi congelati è dovuto soprattutto a fenomeni chimici e fisici. Per le ragioni descritte prima, il congelamento causa alterazioni quali-quantitative delle comunità microbiche: le cellule eucariote, i microrganismi Gram-negativi e le cellule bastoncellari e alcuni virus e parassiti sono più sensibili. Il congelamento causa una riduzione dell' a_w : se l' a_w dell'acqua pura è 1 a 0 °C, l' a_w del ghiaccio è pari a 0,823 a -20 °C. Il congelamento può causare una riduzione della

carica microbica del 90-99,9%, ma non è da considerarsi in nessun caso un metodo per il risanamento degli alimenti. In genere gli alimenti scongelati sono più deteriorabili di quelli non congelati, a parità di temperatura: ciò dipende dalle alterazioni strutturali e dalla liberazione di nutrienti causate dal congelamento/scongelamento. Per questa ragione lo scongelamento dovrebbe essere rapido o dovrebbe essere condotto a temperature che non permettono lo sviluppo microbico.

Durante il magazzinaggio, il trasporto, la distribuzione e la conservazione domestica di alimenti congelati e refrigerati è raro che la temperatura venga mantenuta costante ai valori ottimali. Le fluttuazioni di temperatura e l'esposizione, per tempi più o meno prolungati, a temperature di abuso, possono ridurre sostanzialmente la *shelf-life* degli alimenti. Come conseguenza, i produttori sono costretti a usare un sistema di scadenza chiuso, con una data di scadenza sostanzialmente inferiore a quella possibile in condizioni ottimali o a usare un controllo stringente della catena del freddo. Nelle celle di conservazione e sulle navi che trasportano su lunghe distanze derrate congelate o refrigerate è comune l'uso di data-logger e integratori tempo-temperatura elettronici che, sfruttando modelli matematici sviluppati con i metodi della microbiologia predittiva, indicano la vita di scaffale residua dei prodotti conservati. Un'alternativa interessante per le singole confezioni o imballaggi è l'uso di un sistema di

scadenza aperto, accompagnato dall'uso di integratori tempo-temperatura chimici o biologici, in genere sotto forma di etichette il cui cambiamento di colore segnala l'esposizione a una singola temperatura critica (p.es. per segnalare l'esposizione a temperature $> 0^{\circ}\text{C}$ per prodotti congelati) o l'esposizione a un regime tempo-temperatura che può aver determinato il deterioramento dell'alimento. In pratica, l'indicazione sulla confezione è del tipo "consumare entro (o consumare preferibilmente entro) il ... a meno che" l'integratore tempo-temperatura non segnali il deterioramento.

■ Umidità relativa

L'umidità relativa dell'ambiente di conservazione è un fattore relativamente poco importante, se non per le sue relazioni con la conservazione (specialmente refrigerata) e l' a_w dei cibi. L' a_w di alimenti non confezionati raggiunge più o meno rapidamente un equilibrio con l'umidità relativa dell'ambiente. Alimenti secchi, con $a_w < 0,60$, devono essere conservati in ambienti secchi. Un'umidità relativa eccessiva favorisce la crescita superficiale di lieviti, muffe e microrganismi aerobi. Bruschi abbassamenti di temperatura o il trasferimento di un alimento freddo in un ambiente umido possono causare la condensazione superficiale dell'acqua e favorire il deterioramento superficiale. D'altra parte, un'umidità relativa troppo bassa può causare, anche a temperature di congelamento, una perdita di umidità dalla superficie, con conseguente deterioramento dell'aspetto superficiale e delle caratteristiche sensoriali del prodotto. Alcuni esempi di umidità relative per la conservazione di alcuni prodotti alimentari sono riportati nella Tabella 3.11.

■ Atmosfere di conservazione

L'idea che la protezione degli alimenti dall'esposizione all'aria potesse incrementarne la *shelf-life* è antica (6000-2000 a.C.: conservazione in fosse, anfore, recipienti chiusi con un ridotto spazio di testa), ma è solo a partire dal 1930 circa che l'idea che la modificazione dell'atmosfera potesse incrementare significativamente la *shelf-life* degli alimenti si afferma, per poi diffondersi dal 1960 con la disponibilità di materie plastiche per il confezionamento degli alimenti. Oggi una varietà enorme di ali-

menti è conservata con qualche forma di modificazione dell'atmosfera che circonda l'alimento (Tab. 3.12). Salvo che per i prodotti non deperibili (prodotti secchi, prodotti acidi), il controllo dell'atmosfera è sempre accoppiato alla refrigerazione.

Dei gas principali che compongono l'atmosfera (N_2 , 78% v/v; O_2 , 21% v/v; Ar, 0,9% v/v; CO_2 , 0,04% v/v); solo O_2 e CO_2 hanno un effetto diretto sui microrganismi. A parte l'ovvio effetto inibitorio delle concentrazioni pari o superiori a quella atmosferica verso i microrganismi anaerobi stretti e microaerofili, e della sostituzione dell' O_2 con gas inerti verso i microrganismi aerobi stretti, la CO_2 è sicuramente il gas che ha l'effetto maggiore sui microrganismi aerobi e, in parte, sugli anaerobi facoltativi e anaerobi. La CO_2 produce effetti inibitori evidenti a partire da una concentrazione del 20% (v/v), quasi indipendentemente dalla produzione di ossigeno. L'effetto inibitorio è complesso e dipende da diversi fattori: la CO_2 è molto solubile e può penetrare attraverso le membrane cellulari, diminuendo il pH intracellulare; elevate concentrazioni di CO_2 hanno un effetto diretto sulle reazioni di decarbossilazione. Alle concentrazioni comunemente impiegate nella conservazione in atmosfera protettiva, la CO_2 ha azione prevalentemente batteriostatica e fungistatica (prolungamento della fase lag, rallentamento della crescita in fase esponenziale); in generale, i microrganismi aerobi Gram-negativi sono più sensibili delle muffe e dei batteri aerobi Gram-positivi, mentre la maggior parte degli anaerobi facoltativi e anaerobi stretti sono resistenti. L'applicazione della CO_2 ad alte pressioni ($> 5\text{ MPa}$) ha un effetto letale sui microrganismi; anche se l'effetto letale potrebbe essere dovuto principalmente all'abbassamento brusco di pressione dopo il trattamento, è stato notato che la CO_2 ha uno spettro di inibizione simile a quello di composti dicarbonilici, come il diacetile.

L'atmosfera di conservazione ottimale varia sostanzialmente da un alimento all'altro. Alcuni esempi sono riportati nella Tabella 3.13, ma la conservazione in atmosfera protettiva verrà descritta in dettaglio nella seconda parte. In molti casi (carni rosse, pesce bianco, verdura e ortaggi) non è possibile escludere completamente la presenza di ossigeno per evitare il peggioramento delle caratteristiche sensoriali dell'alimento. Inoltre la permeabilità ai gas dei

Tabella 3.12 Conservazione degli alimenti per modifica dell'atmosfera di confezionamento.

Tipologia		Modalità	Esempi	Effetto
Confezionamento sotto vuoto		Applicazione di un vuoto più o meno spinto (0,01-0,03 MPa) attorno all'alimento, mantenuto da chiusure stagne o da film impermeabili	Carni crude e trasformate, formaggi, pasta, caffè	Inibizione di microrganismi aerobi stretti, prevenzione delle reazioni di ossidazione, controllo del calo peso
Conservazione in atmosfera ipobarica		Mantenimento di un vuoto (1-8 kPa) e di una UR controllate (85-95%) in ambienti di conservazione	Frutta, verdura, carni, pesce	vedi sopra
Atmosfera controllata		La composizione dell'atmosfera intorno al prodotto viene intenzionalmente alterata e mantenuta nelle condizioni specificate. Applicata in celle e durante la distribuzione a lungo raggio	Frutta, carne	vedi sopra, e rallentamento e controllo della maturazione di frutta
Atmosfera modificata (MAP)/Atmosfera protettiva (PA)	Atmosfera modificata di equilibrio	Il prodotto viene confezionato in materiale con permeabilità selettiva a diversi gas e l'atmosfera si altera dinamicamente in funzione di un gran numero di fattori	Frutta, verdura, ortaggi, carne, pasta, formaggi	Controllo parziale dei microrganismi aerobi, controllo delle reazioni di ossidazione e del calo peso
	Atmosfera modificata	L'atmosfera intorno al prodotto viene modificata inizialmente, ma può variare in seguito	Frutta, verdura, ortaggi, carne, pasta, formaggi	come sopra
Confezionamento attivo		Oltre alla modificazione dell'atmosfera, si utilizzano reattivi che consumano o producono uno o più componenti contribuendo al mantenimento della composizione desiderata	Frutta, verdura, ortaggi, carne, pasta, formaggi, prodotti da forno	come sopra, ma con controllo migliorato

film utilizzati per il confezionamento e la stessa attività respiratoria degli alimenti freschi (carni, frutta, verdura) e dei microrganismi presenti possono alterare sostanzialmente la composizione dell'atmosfera.

Benché il confezionamento in atmosfere protettive possa estendere sostanzialmente la *shelf-life* di molti alimenti, specialmente se accoppiato al corretto mantenimento della temperatura di conservazione, le atmosfere protettive non hanno in genere un effetto inibitorio significativo sui microrganismi anaerobi facol-

tativi e anaerobi stretti. Desta particolare preoccupazione la capacità di diversi patogeni psicrotrofici (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, tipi non proteolitici E, F e B, *Yersinia enterocolitica*) e non (*Staphylococcus aureus*) di crescere in alimenti conservati in atmosfera protettiva e raggiungere livelli pericolosi (anche a causa della ridotta competizione) prima che l'alimento sia apprezzabilmente deteriorato, specialmente in caso di abuso di temperatura (conservazione, anche per brevi periodi, a 10-15 °C, piuttosto che a 0-4 °C).

Tabella 3.13 Composizione dell'atmosfera per la conservazione di alcuni alimenti. Gli alimenti sono ordinati approssimativamente in termini di a_w decrescente.

Prodotto	%N ₂	%O ₂	%CO ₂
Frutta e ortaggi	85-95	3-5	3-5
Carni rosse	-	60-85	15-40
Carni cotte o curate	65-80	-	20-35
Pollame	75	-	25
Pesce bianco	30	30	40
Pesce grasso	40	-	60
Salmone	20	20	60
Formaggi molli	70	-	30
Formaggi duri	-	-	100
Pane	30-40	-	60-70
Dolci	40-100	-	0-60
Pasta fresca	100	-	-
Cibi secchi	100	-	-

Per questa ragione è opportuno che la formulazione o il processo per la produzione degli alimenti destinati ad avere una *shelf-life* maggiore includa ulteriori barriere (blandi trattamenti di pastorizzazione, altri trattamenti fisici letali, abbassamento del pH e dell' a_w , aggiunta di conservanti).

■ Conservanti

Gli alimenti possono contenere una varietà di sostanze antimicrobiche, siano esse naturalmente presenti nelle materie prime (Par 3.4), prodotte dai microrganismi (Par 3.6) o aggiunte durante la formulazione dell'alimento. I conservanti sono un'importante categoria di additivi alimentari, definiti dalla direttiva 95/2 CE come "sostanze che prolungano il periodo di validità di prodotti alimentari proteggendoli dal deterioramento provocato da microrganismi", e sono a tutti gli effetti fattori estrinseci. Sale e zucchero non sono di solito considerati conservanti, soprattutto perché il loro effetto principale è sull' a_w , sulla forza ionica e sulla pressione osmotica dei cibi. I conservanti appartengono a diverse categorie e il loro modo di azione e la loro efficacia verso diversi gruppi di microrganismi varia sostanzialmente. Solo alcuni conservanti (come molti acidi organici) sono sostanzialmente innocui e la quantità massima utilizzabile non è prescritta per legge (anche se ci possono essere limitazioni alle categorie di alimenti nei quali possono essere utilizzati).

Altri, se usati in quantità inappropriate, possono avere effetti più o meno gravi sulla salute ed esistono limitazioni sia alle tipologie di alimenti nei quali possono essere utilizzati, sia alla dose massima d'uso.

I principali conservanti alimentari, gli alimenti nei quali vengono utilizzati, le dosi ammissibili, il loro spettro di inibizione e il meccanismo di azione sono elencati nella Tabella 3.14. Molti conservanti svolgono anche altre funzioni importanti (acidulanti, antiossidanti ecc.) come additivi alimentari. Infatti alcuni antiossidanti, come il butilidrossianisolo (BHA), il butilidrossitoluene (BHT) e il *terz*-butil-idrossichinone (TBHQ) alle loro concentrazioni d'uso (10-500 mg/kg) hanno anche un effetto inibitorio su batteri Gram-negativi e Gram-positivi e alcuni funghi. L'uso specifico di singole categorie di conservanti è descritto nella seconda parte.

Il crescente interesse dei consumatori per alimenti naturali, senza conservanti, ha spinto a una riduzione nell'uso dei conservanti tradizionali (nitriti e nitrati, solfiti) e alla ricerca di nuovi **conservanti di origine naturale**. Olii essenziali di piante come origano, timo, rosmarino, salvia ecc. contengono una varietà di principi attivi di diversa natura (carvacrolo, timolo, eugenolo, aldeide cinnamica) che mostrano un notevole potenziale in questo senso. Un'importante alternativa all'uso di conservanti è l'uso di colture bioprotettive (Par. 3.6), che sfrutta fenomeni di competizione e

Tabella 3.14 I principali conservanti alimentari. La classificazione e le sigle dei conservanti sono quelle previste dalla normativa nazionale e internazionale vigente.

Categoria	Conservante	Spettro di inibizione (2)						Meccanismo di azione (3)				Campo di applicazione e dosi
		G-	G+	SAe	SAn	L	M	pH	MC	IE	IS	A
Acidi organici	Acido acetico e acetati (E260-E263)	±	±	±	±							
	Acido lattico e lattati (E270, E325-327)	±	±	±	±							
Acido sorbico, benzoati, esteri dell'acido p-idrossibenzoico (1)	Acido sorbico e sorbati (E200-E203)	±	±	±	±	+	+					vari cibi e bevande, 200-2000 mg/kg o L
	Acido benzoico e benzoati (E210-E213)	±	±	+	+	+	+					vari cibi e bevande, 150-2000 mg/kg
	Esteri dell'acido p-idrossibenzoico (E214-E219)	±	+			+	+					alcuni cibi e bevande, in combinazione con sorbati e/o benzoati, 1000-2000 mg/kg
	Anidride solforosa e solfiti (E220-E228)	+				±	±					prodotti vegetali, inclusa frutta secca, alcuni prodotti di origine animale, alcune bevande, 10-2000 mg/L o kg
Altri conservanti	Nitriti e nitriti (E249-E252)	±	±	±	+							prodotti a base di carne, alcuni formaggi, astringhe marinate, 50-300 mg/kg
	Bifenile, difenile (E230), orfotenilfenoli (E231-232)						+					Trattamento superficiale degli agrumi, 12-70 mg/kg
	Nisina (E234)		+	+	+							budini, creme di formaggio, formaggi duri, 3-12,5 mg/kg
	Natamicina (E235)											formaggi, insaccati, 1 mg/dm ²
	Esametileene tetrammina (E239)			+	+							formaggio Provolone, 25 mg/kg
	Dimetildicarbonato (E242)	±				+	-					bevande analcoliche, 250 mg/L
	Acido borico e borati (E284-E285)	±	±	-	-	-	-					caviale, 4 g/kg
	Acido propionico e propionati (E280-E283)	±	±	±	±	+	+					pane e prodotti da forno, formaggi, 1000-3000 mg/kg
	Lisozima (E1105)	-	+	+	+	-	-					formaggio stagionato, quanto basta, < 300 mg/kg

(1) sorbati e benzoati o p-idrossibenzoati sono spesso usati in combinazione.

(2) G- cellule vegetative di batteri Gram-negativi; G+ cellule vegetative di batteri Gram-positivi; SAe sporigeni aerobici; SAn sporigeni anaerobici; L lieviti; M muffe; + la maggior parte delle specie sono inibite, - la maggior parte delle specie non sono inibite, ± risultati variabili.

(3) pH acidificazione del pH intracellulare; MC alterazione della permeabilità cellulare; IE inibizione di enzimi; IS inibizione della sintesi di macromolecole (proteine, RNA, DNA); A altro.

amensalismo per il controllo degli agenti di deterioramento e patogeni (Par. 3.6).

Come per tutti i fattori che controllano lo sviluppo dei microrganismi, anche per i conservanti l'efficacia a una determinata dose dipende dalla presenza di altri fattori inibitori: combinando diverse barriere è quindi possibile minimizzare l'uso di conservanti.

3.6 Fattori impliciti

Negli alimenti i microrganismi sono molto raramente presenti in colture pure. In ogni dato habitat e in ogni dato momento esistono molte specie diverse e, spesso, più ceppi microbici per la stessa specie. Inoltre le comunità microbiche degli alimenti non sono affatto statiche: le diverse popolazioni cambiano di numero e si influenzano le une con le altre (mediante complessi fenomeni di comunicazione, consumando o producendo sostanze essenziali per la crescita di altre specie, producendo sostanze antimicrobiche) e spesso influenzano l'ambiente. In molti casi è possibile sfruttare questi fenomeni per controllare lo sviluppo di microrganismi indesiderati, quali agenti di deterioramento e patogeni, o per ottimizzare lo sviluppo di microrganismi utili in prodotti fermentati. Le interazioni fra microrganismi introdotte nel Paragrafo 2.6 costituiscono, nel loro insieme, i cosiddetti fattori impliciti. Le possibili interazioni fra microrganismi negli alimenti sono sintetizzate nella Tabella 3.15. Con l'eccezione del **neutralismo**, una condizione in cui la crescita di un microrganismo non ha nessun effetto sulla crescita di un altro microrganismo, tutti i fattori impliciti risultano in una combinazione di svantaggi o vantaggi per i microrganismi interessati. Il neutralismo è una condizione molto rara, che deriva da una separazione fisica

(i due microrganismi crescono in aree diverse dell'alimento) o temporale (i due microrganismi crescono in momenti diversi).

■ Interazioni negative: competizione, amensalismo, predazione, parassitismo

Nelle interazioni negative uno o entrambi i microrganismi coinvolti subiscono uno svantaggio dall'interazione.

La **competizione** è il tipo di relazione più frequente: i due microrganismi occupano la stessa nicchia e competono per gli stessi nutrienti o anche per lo stesso spazio; entrambi sono danneggiati dalla presenza dell'altro membro dell'associazione. Come risultato essi crescono più lentamente e raggiungono una densità di popolazione inferiore quando crescono insieme rispetto a quando crescono in coltura pura. Diversi microrganismi patogeni sono significativamente limitati dalla competizione con la microflora deteriorante o con gli agenti di fermentazione. *Staphylococcus aureus*, pur essendo frequentemente presente nelle carni crude o nel latte destinato alla produzione di formaggi a latte crudo, anche in caso di abuso della temperatura raramente è in grado di raggiungere livelli di popolazione associati a livelli significativi di enterotossina; nel primo caso la microflora aerobia Gram-negativa, presente a livelli tipicamente 100-10000 volte superiori, compete con i nutrienti; nel secondo caso sono la microflora lattica naturalmente presente e i fattori intrinseci sfavorevoli (basso pH, basso Eh) che determinano l'inibizione. Quando la crescita di altri microrganismi è limitata dalla bassa a_w causata dall'aggiunta di sali o quando *S. aureus* ricontamina il prodotto dopo un trattamento termico, la ridotta competizione consente al patogeno di raggiungere livelli perico-

Tabella 3.15 I fattori impliciti e le interazioni fra microrganismi.

Interazione	Microrganismo A	Microrganismo B
Neutralismo	Nessun effetto	Nessun effetto
Commensalismo	+	Nessun effetto
Amensalismo	Nessun effetto	–
Mutualismo	+	+
Competizione	–	–
Parassitismo	+	–
Predazione	+	–

losi. Analogamente, *Clostridium botulinum* tipo E raramente causa problemi in pesce crudo, a causa della competizione con gli agenti di deterioramento Gram-negativi. Quando però questi sono inibiti dall'atmosfera di conservazione o da blandi trattamenti di conservazione (affumicazione, salagione) la crescita del patogeno è possibile. In questi, come in altri casi, per determinare un'inibizione significativa, è necessario che la microflora saprofitica sia presente a livelli elevati (10^5 - 10^6 UFC/g o cm^2).

Nell'**amensalismo** uno dei due microrganismi produce uno o più prodotti che influenzano negativamente l'altro microrganismo, senza trarne un vantaggio diretto (anche se la riduzione della competizione può favorirne la crescita). Oltre alle sostanze che modificano direttamente i fattori intrinseci (p.es. acidi organici, alcoli), molti microrganismi sono in grado di produrre diverse tipologie di inibitori di varia natura chimica. Diacetile e perossido di idrogeno sono per esempio prodotti da fermenti lattici in diverse matrici alimentari e possono contribuire sostanzialmente all'inibizione di patogeni ed agenti di deterioramento. La **reuterina** (3-idrossipropionaldeide) e miscele di acidi organici e sostanze fenoliche ad azione antimicotica sono altri esempi di sostanze inibitorie a basso peso molecolare prodotte da fermenti lattici. Oltre a produrre reuterina, alcuni ceppi di *Lactobacillus reuteri* producono un antibiotico, la **reutericiclina**, con uno spettro di azione relativamente ampio. Fra le sostanze antimicrobiche implicate nell'amensalismo ricordiamo le batteriocine (Par. 3.6).

La **predazione** è un tipo di interazione antagonista in cui un organismo predatore usa come fonte di cibo un altro organismo preda, ha poca importanza negli ecosistemi microbici degli alimenti, nei quali protozoi predatori, importanti nell'ecologia del ruminante e della depurazione delle acque, non rivestono alcun ruolo significativo.

Nel **parassitismo** uno dei due membri dell'associazione trae vantaggio danneggiando direttamente l'altro. L'esempio più importante di parassitismo negli ecosistemi alimentari sono le **infezioni fagiche**: le infezioni con batteriofagi di colture miste di fermenti lattici sono una delle cause maggiori di cambiamento della composizione dell'associazione ed esercitano un profondo effetto selettivo; nelle colture

a composizione definita le infezioni fagiche possono avere un effetto ancora più disastroso, distruggendo uno o più dei componenti della coltura (vedi Cap. 19). Batteriofagi ed endolisine fagiche (enzimi prodotti dai fagi in grado di lisare specificamente la parete dell'ospite per permettere l'uscita dei virioni maturi) costituiscono un potenziale agente di biocontrollo per numerosi agenti patogeni (*C. jejuni*, *C. perfringens*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Salmonella*). Il loro uso tuttavia è limitato dalla specificità dell'interazione fago/ospite e dalla scarsa possibilità di applicazione in alimenti solidi.

■ Interazioni positive: commensalismo, proto-cooperazione e mutualismo

Il **commensalismo** è una forma di interazione in cui uno dei due microrganismi implicati utilizza prodotti o sottoprodotti del metabolismo dell'altro microrganismo, traendone un vantaggio ma senza apportare danno all'altro organismo. Esistono numerosi esempi di relazioni commensalistiche fra microrganismi degli alimenti. Negli impasti per la panificazione alcuni lieviti possono produrre vitamine del gruppo B, stimolando la crescita di batteri lattici. In diverse fermentazioni vegetali i fermenti lattici possono produrre acidi organici che vengono utilizzati come substrati dai lieviti. Il lattato prodotto dai fermenti lattici viene utilizzato come substrato dai fermenti propionici nei formaggi di tipo svizzero; nei formaggi a maturazione superficiale a crosta lavata o fiorita la crescita della caratteristica microflora alofila ma non acidurica composta da microstafilococchi e corinebatteri avviene solo dopo che lieviti e muffe hanno innalzato il pH mediante consumo dell'acido lattico o per proteolisi. In molti alimenti, microrganismi aerobi possono consumare l'ossigeno permettendo la crescita di microrganismi anaerobi. Le interazioni commensalistiche possono significativamente aumentare il deterioramento degli alimenti: per esempio, la presenza contemporanea di fermenti lattici e *Hafnia alvei* aumenta significativamente il deterioramento di carni sotto vuoto; la presenza contemporanea di Gram-positivi, come *Brochothrix thermosphacta* e *Carnobacterium piscicola*, e Gram-negativi, come *Shewanella*,

Photobacterium e *Aeromonas*, aumenta la produzione di odori sgradevoli nel salmone affumicato.

Nelle relazioni mutualistiche entrambi i microrganismi implicati traggono un vantaggio dall'interazione. Negli alimenti relazioni simbiotiche strette come quelle fra funghi e alghe nei licheni non sono rilevanti. Esistono però numerosi casi di **proto cooperazione**, in cui entrambi i membri dell'associazione producono sostanze utili all'altro componente: la forma più nota è quella fra *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nello yogurt: il primo produce CO₂ e acido formico, che sono stimolatori per il secondo che, a sua volta, libera aminoacidi e peptidi stimolatori dalla caseina, che sono stimolatori per il primo.

■ Le colture bioprotettive

L'interesse dell'industria e dei consumatori per prodotti privi di conservanti chimici e che abbiano subito solo blandi processi di conservazione ha spinto negli ultimi venti anni a concentrare sforzi imponenti nella ricerca di alternative ai processi di conservazione tradizionali. Numerosi agenti di fermentazione sono in grado di produrre sostanze inibitorie di natura proteica (le **batteriocine**) che, per le loro differenze nel modo d'azione rispetto agli antibiotici classici (il meccanismo prevalente di azione delle batteriocine è la formazione di pori transitori nelle membrane cellulari dei microrganismi sensibili, con collasso della forza protonmotrice e perdita di materiale intracellulare, seguita da morte e lisi), per la loro natura proteica (sono degradate facilmente dagli enzimi digestivi) e per lo status QPS² dei microrganismi produttori possono costituire un'alternativa promettente ai conservanti chimici tradizionali. Le batteriocine vengono di solito classificate in 3 gruppi: **lantibiotici** (sono peptidi che hanno subito un'estensiva modificazione post-tradu-

zionale, con la modificazione di alcuni aminoacidi standard in aminoacidi non standard, come la lantionina e la β-metil-lantionina: appartiene a questo gruppo la nisina, l'unica batteriocina il cui uso è autorizzato in forma semi-purificata (Par 3.5); **batteriocine di classe 2** (piccoli peptidi termostabili, prevalentemente ad azione antilisterica, prodotti da moltissimi fermenti lattici e a loro volta divisi in 3 sottogruppi sulla base della struttura e delle modalità di sintesi e secrezione: appartengono a questo gruppo molte batteriocine a spettro relativamente ampio, come la pediocina AcH, prodotta da *Pediococcus acidilactici*) e **batteriocine di classe 3** (peptidi di grandi dimensioni, generalmente termolabili e a spettro di azione ristretto). Benché le batteriocine abbiano indubbiamente numerosi vantaggi (sono termostabili, non tossiche, agiscono efficacemente in combinazione con altri fattori intrinseci ed estrinseci), lo spettro di azione relativamente ristretto (quasi tutte le batteriocine prodotte da fermenti lattici sono generalmente inattive contro i microrganismi Gram-negativi, i lieviti e le muffe) e la possibile insorgenza di mutanti resistenti ne hanno limitato l'applicazione diretta: oltre alla nisina (vedi sopra) sono disponibili solo alcuni esempi di prodotti fermentati complessi (come la linea MicroGARD® commercializzata dalla Danisco) il cui status legislativo è incerto nell'Unione Europea. In alternativa all'applicazione diretta di batteriocine, è interessante in molte situazioni l'uso di colture bioprotettive (un esempio è la linea HoldBAC della Danisco) che possono inibire microrganismi patogeni e agenti di deterioramento con una varietà di meccanismi, che vanno dalla semplice competizione all'amensalismo, alla produzione di batteriocine.

2 La Presunzione Qualificata di Sicurezza è il termine europeo che corrisponde al termine GRAS, Generally Recognized as Safe, usato negli USA: un microrganismo che ha una presunzione qualificata di sicurezza, basata su una caratterizzazione tassonomica adeguata, sulla mancata associazione con patologie e su una storia di uso sicuro negli alimenti senza caratteristiche negative sui consumatori può essere liberamente aggiunto agli alimenti senza dover condurre studi tossicologici e di sicurezza.

Bibliografia

- Bell, C., Neaves, P., Williams A.P., *Food microbiology and laboratory practice*, Blackwell Science, 2005.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J., *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, ASM Press, 1997.
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A., *Microbiologia degli alimenti*, Springer, Milano, 2008.
- Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W., *The microbiological safety and quality of food*, Aspen Publishers, 2000.
- Ray B., *Fundamental of food microbiology*, CRC PRESS, Londra, 2004.