

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti,
Risorse Naturali e Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in
Scienze e Tecnologie Alimentari

Gli ultrasuoni e l'omogenizzazione nella produzione del
gelato: caratteristiche fisiche e aspetti microbiologici

Relatore: prof.sa *Giovanna Lomolino*

Correlatore: prof. *Valerio Giaccone*

Laureanda: *Sonia Cattin*

Matricola n. 2039778

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

RIASSUNTO

Il gelato è un dessert lattiero-caseario molto diffuso e apprezzato in tutto il mondo, costituito da una complessa matrice di grassi, proteine, zuccheri, aria, acqua, sali minerali e cristalli di ghiaccio, con la possibile presenza di stabilizzanti ed emulsionanti. La qualità di questo dessert freddo è molto influenzata dagli ingredienti ma anche dalle tecniche di produzione, per questo sono studiate delle tecnologie “*mild*” innovative che minimizzano il danno termico e meccanico, e garantiscono una qualità nutrizionale e organolettica migliore. Tra queste tecnologie innovative ritroviamo l’uso degli ultrasuoni che sono utilizzati in diversi settori alimentari e sono stati identificati per il basso costo e perché consentono una produzione ecosostenibile, caratteristica che è molto apprezzata dai consumatori negli ultimi tempi. In questa tesi sono state effettuate delle analisi comparative sui processi produttivi standard che utilizzano l’omogenizzazione e quelli che utilizzano gli ultrasuoni ad alta intensità, e sono state valutate le proprietà reologiche della matrice di gelato e l’abbattimento della carica microbica. Sono state valutate le differenze chimico, fisiche e microbiologiche dei campioni prodotti con le due diverse tecnologie, e sono stati riscontrati effetti positivi degli ultrasuoni relativamente alla texture, ma anche gli aspetti microbiologici. Le caratteristiche positive rilevate nella texture riguardano principalmente la ridotta dimensione dei globuli di grasso e la presenza di strutture di aggregazione che rendono la matrice più coesa e omogenea. E alla luce dei primi risultati ottenuti, possiamo dire che associando il trattamento termico con la sonicazione, gli effetti battericidi che otteniamo sono molto efficaci.

ABSTRACT

Ice cream is a widely popular dairy dessert enjoyed worldwide, consisting of a complex matrix of fats, proteins, sugars, air, water, mineral salts, and ice crystals, with the possible presence of stabilizers and emulsifiers. The quality of this cold dessert is greatly influenced by the ingredients, as well as production techniques. For this reason, innovative "mild" technologies have been studied to minimize thermal and mechanical damage, ensuring improved nutritional and sensory quality. Among these innovative technologies, ultrasound has been utilized in various food sectors due to its low cost and ability to enable eco-friendly production, which is highly valued by consumers in recent times.

In this thesis, comparative analyses were conducted on standard production processes that employ homogenization and those that utilize high-intensity ultrasound. The rheological properties of the ice cream matrix and the reduction of microbial load. Differences in chemical, physical, and microbiological characteristics of the samples produced using the two different technologies were assessed, and positive effects of ultrasound were observed in terms of texture and microbiological aspects.

The positive characteristics observed in texture primarily involve the reduced size of fat globules and the presence of aggregation structures that make the matrix more cohesive and homogeneous. Furthermore, considering the initial results obtained, it can be said that when combining thermal treatment with sonication, the bactericidal effects achieved are still highly effective.

Indice

1. INTRODUZIONE.....	8
1.1 Storia.....	8
1.2. Cos'è il gelato.....	9
1.3 Il processo produttivo del gelato.....	13
1.4 Omogenizzazione alta pressione con valvola e metodo ad ultrasuoni	15
1.4.1 Omogeneizzazione ad alta pressione con valvola.....	15
1.2.2 Metodo ad ultrasuoni	16
2. OBIETTIVI.....	21
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 Analisi microbiologiche	23
3.1.1 Preparazione terreni di crescita per l'inoculo.....	24
3.1.2 Preparazione dell'inoculo	27
3.1.3 Analisi dei campioni.....	28
3.2 Produzione del gelato	31
3.2.1 Macchinario utilizzato	31
3.2.2 La preparazione e gli ingredienti.....	32
3.2.3 Sonicatore	34
3.2.4 Omogeneizzatore.....	34
3.3 Analisi reologiche	36
3.3.1 Il reometro	36
3.3.2 Microscopio ottico.....	37
3.3.3 Dinamometro.....	38
3.3.4 Sonda a sfera	39
3.3.5 Cilindro di estrusione.....	40
3.3.6 Analisi statistica.....	42
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	43

4.1 Microbiologia	43
4.1.1 <i>Listeria, Salmonella e Staphylococcus</i>	43
4.1.2 <i>Bacillus cereus e Clostridium sporogenes</i>	44
4.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.2 Reologia	46
4.2.1 Analisi d'immagine.....	46
4.2.2 Studio dei parametri G' e G'' sui campioni di mix di gelato trattati con metodi fisici.....	58
4.2.3 Analisi TPA sul gelato.....	60
5. CONCLUSIONI.....	65
6. BIBLIOGRAFIA	67
7. SITOGRAFIA.....	72

1. INTRODUZIONE

1.1 Storia

Sono tanti gli alimenti che nel corso della loro storia hanno subito una trasformazione. In particolare, il gelato si è evoluto nel tempo, partendo dai primissimi tentativi di preparazioni di questo dessert fino ad arrivare alle numerose tipologie di gelato che abbiamo la possibilità di trovare nei supermercati e nei punti vendita oggi.

Definire in modo preciso l'origine del gelato non è semplice, in quanto le testimonianze storiche e i riferimenti alle antiche usanze di conservare gli alimenti congelandoli sono molteplici. Le prime leggende sull'origine del gelato narrano della presenza di un suo antenato già nella Bibbia: Isacco, offrendo ad Abramo latte di capra misto a neve, avrebbe inventato il primo “mangia e bevi” della storia. Altri, invece, la affidano agli antichi romani che si distinsero ben presto grazie alle loro “*nivatae potiones*”, che erano dei veri e propri dessert freddi.

Bisogna però aspettare il Cinquecento per assistere al trionfo di questo dolce italiano più amato al mondo. In particolare, è Firenze a rivendicare l'invenzione del gelato ‘moderno’, infatti è proprio a Firenze che è stato prodotto il primo gelato utilizzando il latte, la panna e le uova. Il gelato che oggi conosciamo è stato inventato dall'architetto Bernardo Buontalenti, alla corte di Caterina de' Medici. Un secondo grande epigono del gelato fu anche un cuoco palermitano, Francesco Procopio dei Coltelli che diede vita alla prima miscela perfetta per produrre e confezionare il gelato. Egli trasferitosi a Parigi alla corte del Re Sole, aprì il primo caffè-gelateria della storia, il tuttora famosissimo *caffè Procope* (Figura 1.1).



Figura 1.1: caffè Procope.

Per produrre il gelato Procopio inventò un sistema che a quei tempi era innovativo: metteva il liquido da gelare dentro un recipiente cilindrico di metallo, il quale a sua volta veniva immerso in una tinozza di legno, in cui era stata preparata una miscela di ghiaccio e sale. Il cilindro metallico veniva fatto girare. Quando la sostanza zuccherina cominciava ad attaccarsi alle pareti del cilindro, veniva via via staccata con una spatola di legno finché, grazie alla bassa temperatura, il liquido solidificava in cristalli fini (Panciera, 2020). Nasceva così il sistema di mantecazione del gelato.

La storia moderna di questo goloso alimento comincia ufficialmente quando l'italiano Filippo Lenzi, alla fine del XVIII secolo, aprì la prima gelateria in terra americana. Il gelato si diffuse a tal punto da stimolare una nuova invenzione: la sorbettiera a manovella, brevettata nel XIX secolo da William Le Young.

1.2. Cos'è il gelato

Il termine "gelato" viene utilizzato per rappresentare una famiglia di prodotti lattiero-caseari montati che vengono prodotti mediante congelamento e vengono consumati allo stato congelato. Il gelato è una miscela parzialmente congelata di una combinazione di componenti come il latte, panna, dolcificanti, stabilizzanti, emulsionanti e aromi. Tutti questi contribuiscono agli elementi strutturali del gelato. Possono essere aggiunti anche altri ingredienti come prodotti a base di uova, coloranti e idrolizzati di amido. Questa miscela viene tradizionalmente pastorizzata e omogeneizzata prima del congelamento. Il congelamento comporta la trasformazione dell'acqua in cristalli di ghiaccio, e una rapida rimozione del calore mentre si agita vigorosamente permette l'incorporazione dell'aria, conferendo così la levigatezza e la morbidezza desiderabili di questo dessert congelato. L'apparente semplicità del gelato nasconde nella realtà una struttura molto complessa, è infatti contemporaneamente un'emulsione, una dispersione e una schiuma. La dispersione e l'emulsione consistono principalmente in una fase sierica acquosa concentrata per congelamento, contenente zucchero e sostanze secche che circondano cristalli di ghiaccio dispersi e globuli di grasso (Marshall *et al.*, 2003; Cook *et al.*, 2010). La funzionalità delle proteine contribuisce alla struttura del grasso e dell'aria adsorbendosi alle interfacce e alla fase non congelata fornendo proprietà di consistenza e trattenimento dell'acqua, entrambe le quali aumentano la viscosità.

Cellule d'aria

Fino a più della metà del volume del gelato è costituito da aria, con valori di sovraffollamento (aumento di volume dovuto all'incorporazione dell'aria come percentuale del volume della miscela) che possono variare dall'25% fino al 150%. Questa fase di aria si presenta come cellule finemente disperse con una dimensione che varia da pochi micron a oltre 100 μm . La dimensione media delle cellule d'aria si trova spesso tra i 20 e i 25 μm . Le cellule d'aria conferiscono una consistenza leggera ai dessert congelati. La schiuma quindi, è formata da bolle d'aria disperse in tutta l'emulsione e sostenute da globuli di grasso parzialmente coalescenti (Goff, 2002; Marshall *et al.*, 2003) (figura 1.2).

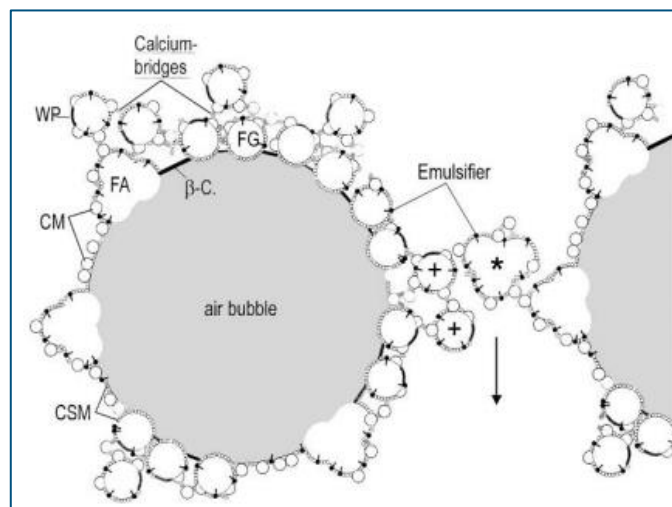


Figura 1.2: Modello di una bolla d'aria stabilizzata e la lamella di schiuma durante il processo di scioglimento del gelato (FG: globulo di grasso intatto; +: globulo di grasso intatto collegato alla bolla d'aria tramite ponti di calcio; FA: agglomerato di grasso parzialmente destabilizzato; *: agglomerato di grasso che blocca la lamella di schiuma; CM: micella di caseina; CSM: sub-micella di caseina; B-C: B-caseina; WP: proteina del siero) (Goff *et al.*, 2012).

Globuli di grasso e agglomerati

Nella miscela di gelato, le singole goccioline di emulsione hanno tipicamente una dimensione compresa tra 0,5 e 2 o 3 μm , con una dimensione media di circa 0,8 μm . Dopo la congelazione, si formano agglomerati di globuli di grasso a causa della parziale coalescenza delle singole goccioline. Gli agglomerati variano in dimensione da 5 a 10 μm fino a 70-80 μm , con alcuni agglomerati che raggiungono anche i 100 μm . Questa parziale coalescenza dei globuli di grasso è spesso caratterizzata da una percentuale di destabilizzazione del grasso, data dal rapporto tra gli agglomerati di una certa dimensione e le goccioline di emulsione iniziali. Gli agglomerati di globuli di grasso sono uno dei

parametri importanti che determinano le proprietà di ritenzione della forma, la velocità di scioglimento e la consistenza liscia e cremosa (Goff et al. 2002). Tale consistenza cremosa, associata principalmente a un elevato contenuto di grassi, è determinata anche in parte dalla dimensione media dei cristalli di ghiaccio (Figura 1.3).

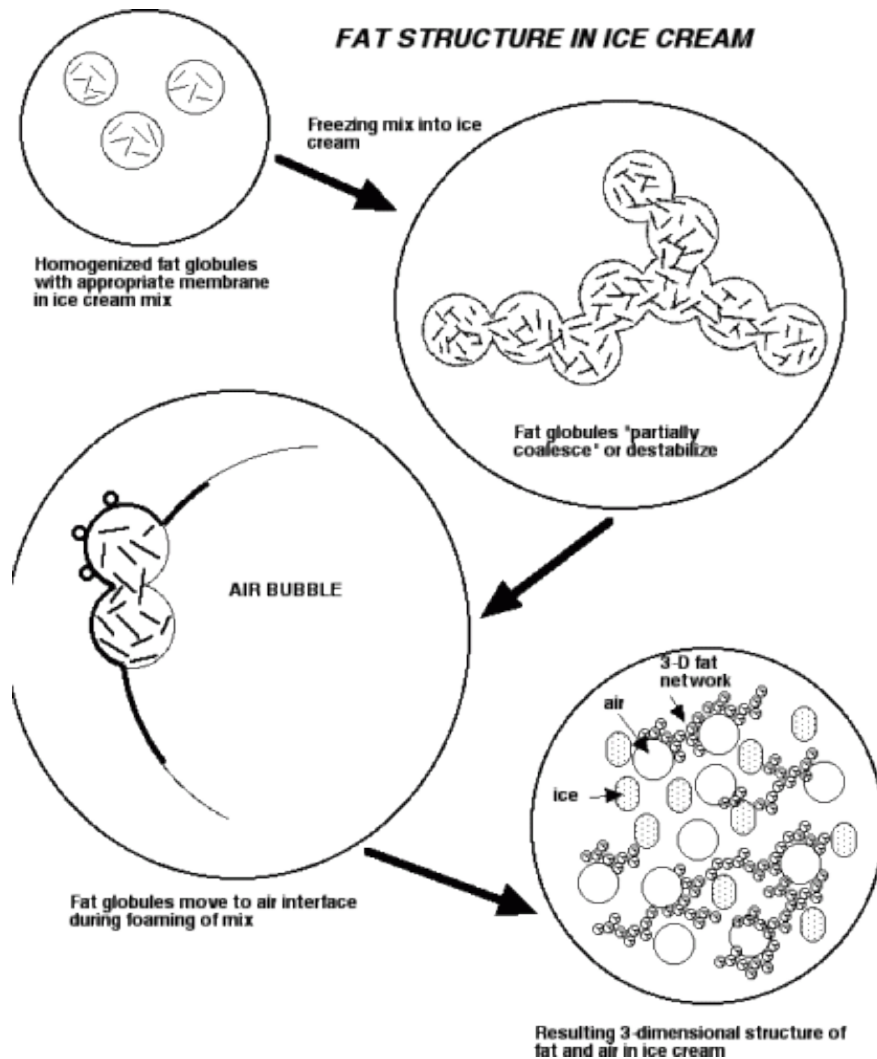


Figura 1.3: Evoluzione della componente grassa del gelato dall'omogeneizzazione fino al congelamento (M. D. Eisner et al., 2005).

Cristalli di ghiaccio

Come dessert congelato, i cristalli di ghiaccio sono una componente fondamentale del gelato. Essi dovrebbero essere sufficientemente piccoli per conferire una consistenza liscia e sciogliersi facilmente in bocca. I cristalli di ghiaccio generalmente variano in dimensione da pochi micron a oltre 100 μm , con una dimensione media compresa tra 35

e 45 μm per i gelati induriti (Berger *et al.*, 1972; Caldwell *et al.*, 1992; Donhowe e Hartel, 1996a; Hagiwara e Hartel, 1996; Hartel, 1996; Koxholt *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2003; Sofjan e Hartel, 2004; Inoue *et al.*, 2008; Kusumaatmaja, 2009). Dopo la congelazione, circa la metà dell'acqua si è congelata, a seconda del punto di congelamento della miscela. Dopo l'indurimento, circa il 75-80% è congelato, a seconda della temperatura di conservazione. La quantità e la dimensione dei cristalli di ghiaccio influenzano numerose caratteristiche del prodotto finito, come la facilità di prelievo con il cucchiaino, la consistenza (granulosa se i cristalli sono $>50 \mu\text{m}$, cremosa se i cristalli sono di circa 10-20 μm) la durezza, l'effetto rinfrescante e la velocità di scioglimento (Marshall *et al.*, 2003; Eisner *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2010, Goff et al. 2002).

Struttura proteica/stabilizzante

La miscela di gelato contiene sia caseine che proteine del siero del latte in una proporzione che dipende dalle fonti lattiero-casearie utilizzate nella formulazione, ma solitamente sono circa il 4%. Le caseine si trovano in forma micellare con una dimensione media di circa 0,3-0,4 μm , mentre le proteine del siero sono disciolte nella fase acquosa/serica. Gli stabilizzanti (proteine e gomme) utilizzati nel gelato assumono una struttura e un'orientazione in base alla natura della molecola e alle sue interazioni con gli altri componenti del gelato. Alcuni stabilizzanti possono formare un gel debole, mentre altri rimangono disciolti nella fase acquosa. Le interazioni tra gli stabilizzanti e le proteine lattiero-casearie possono influenzare notevolmente le caratteristiche del gelato, soprattutto quando subiscono una separazione di fase termodinamica. Le proteine presenti nel gelato sono importanti anche perché hanno diversi ruoli funzionali fondamentali allo sviluppo della struttura: in primo luogo partecipano all'emulsione con conseguente parziale coalescenza e formazione della struttura grassa; inoltre contribuiscono a mantenere la stabilità della schiuma; ed infine sono necessarie per altre proprietà della soluzione (Goff, 1997; Walstra e Jonkman, 1998). Le proteine si trovano all'interfaccia del grasso, insieme ai tensioattivi aggiunti, infatti, si adsorbono ai globuli di grasso al momento dell'omogeneizzazione, sono quindi responsabili di molti degli attributi strutturali e organolettici del gelato. Le proteine che non si trovano su un'interfaccia sono presenti nella fase acquosa, non congelata.

Siero

Anche alle temperature di conservazione più basse, non tutta l'acqua nel gelato è congelata. Questa acqua contiene zuccheri e sali disciolti, nonché eventuali proteine e stabilizzanti in fase acquosa. È questa fase sierica che forma la lamella tra le altre strutture (ghiaccio, aria, globuli e agglomerati di grasso, micelle, ecc.). Quando raffreddata al di sotto della sua temperatura di transizione vetrosa, la fase sierica diventa vetrosa. La Tg di un gelato tipico è inferiore a -32°C , il che significa che la fase sierica non è nello stato vetroso nelle normali condizioni di conservazione.

1.3 Il processo produttivo del gelato

Un'attenta selezione degli ingredienti insieme all'utilizzo di tecnologie avanzate sono gli elementi fondamentali per ottenere un gelato di buona qualità. Le fasi di produzione del gelato possono essere più o meno lunghe e complesse, e sono principalmente sei: il dosaggio e la miscelazione, la pastorizzazione e l'omogeneizzazione, la maturazione, la mantecazione ed infine il confezionamento. Successivamente alle fasi produttive avremo ovviamente la conservazione e la distribuzione.

Dosaggio e miscelazione

Il dosaggio è semplicemente dato dalla scelta degli ingredienti e la loro miscelazione nelle quantità stabilite dal mastro gelataio. Per avere delle caratteristiche organolettiche ottimali è necessario che la miscela sia bilanciata, soprattutto per quanto riguarda il contenuto di solidi che nel gelato si aggirano tra il 30% e il 42%. Un gelato con meno sostanze solide risulterà poco cremoso, duro, a causa della tendenza a cristallizzare velocemente; al contrario un gelato troppo carico di solidi risulterà sabbioso, e pesante. Una volta terminata la miscelazione, si passa alla pastorizzazione della miscela.

Pastorizzazione e omogeneizzazione

La pastorizzazione è utile all'abbattimento della carica batterica del gelato e all'amalgamazione ottimale dei vari ingredienti. Nonostante ciò non è una operazione obbligatoria, perché dal punto di vista batteriologico il processo può non avere delle rilevanti criticità se il latte utilizzato è pastorizzato (e così possono esserlo tutti gli altri ingredienti). Va detto però che la pastorizzazione è molto utile per sciogliere

completamente gli zuccheri della matrice, in quanto essa è in grado di consentire agli idrocolloidi (gli addensanti e stabilizzanti) di assorbire l'acqua, e riesce a disperdere ed emulsionare in modo migliore le sostanze grasse.

L'omogeneizzazione si esegue con una pompa che fa passare la miscela riscaldata a 65°-70° C in un filtro molto fine, in grado di ridurre le particelle insolubili (i grassi) ad una dimensione molto piccola, di 2 micron circa.

In alternativa a questo tipo di omogeneizzazione si possono utilizzare gli ultrasuoni, e ne saranno elencati i vantaggi successivamente.

La maturazione

La maturazione è un processo molto importante per la preparazione del gelato. Dopo la preparazione della miscela è importante ridurre bruscamente la temperatura finale a 4°-5°C per evitare che i batteri resistenti al calore possano riprendere la loro attività. Il gelato in questa fase viene mantenuto quindi a temperature di refrigerazione per un periodo che va dalle 4 alle 8 ore. Questo riposo serve per far assorbire acqua ai neutri (addensanti, emulsionanti, stabilizzanti, ecc), e quindi diminuire l'attività dell'acqua.

Mantecazione

È la fase di produzione vera e propria del gelato. La mantecazione avviene in una macchina che mescola in continuazione la miscela mentre questa, venendo a contatto con le pareti gelate del mantecatore, viene congelata. In questa fase l'acqua si trasforma in cristalli di ghiaccio e la loro dimensione (che dipende dalla velocità di congelamento) sarà determinante per le caratteristiche organolettiche del gelato. Infatti più piccoli e fini saranno i cristalli, migliore sarà la consistenza del gelato. Durante la fase di mantecazione, il continuo mescolamento consente alla miscela di incorporare aria ed ottenere infine il prodotto finale. A questo punto il gelato sarà congelato a temperature attorno ai -18°C e sarà pronto per essere confezionato e distribuito.

1.4 Omogenizzazione alta pressione con valvola e metodo ad ultrasuoni

I metodi ad alta energia prevedono l'uso di un dispositivo meccanico come omogeneizzatori a valvole con applicazione di alte pressioni e ultrasuoni (Figura 1.4). Questi dispositivi agiscono grazie all'applicazione di una forza altamente dirompente per interrompere la fase dispersa e formare minuscole goccioline: le emulsioni (Maali e Hamed Mosavian, 2013).

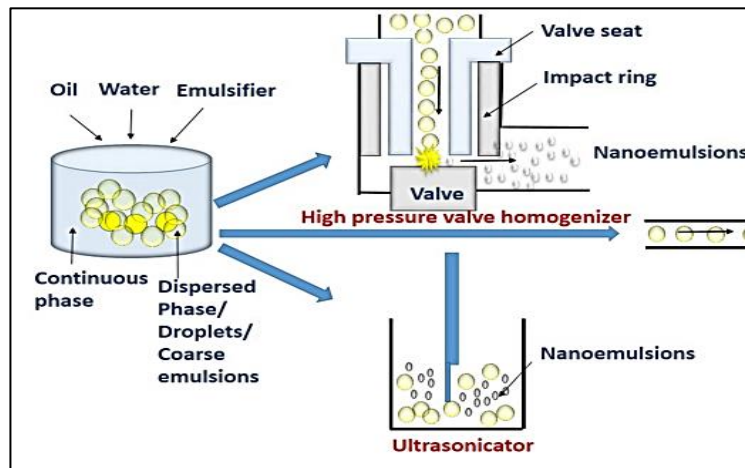


Figura 1.4: rappresentazione dei metodi ad alta energia che formano emulsioni (Aswathanarayan, J. et al 2019).

1.4.1 Omogeneizzazione ad alta pressione con valvola

Il dispositivo utilizzato nell'omogeneizzazione con valvola ad alta pressione (HPVH) comprende una pompa volumetrica, una valvola per la pressione e una camera per l'omogeneizzazione (Figura 1.5). L'emulsione grossolana viene aspirata nella camera di omogeneizzazione dalla pompa di aspirazione.

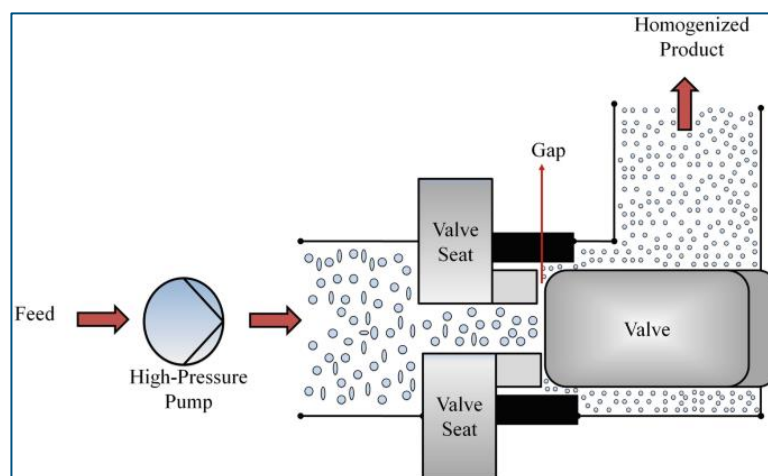


Figura 1.5: rappresentazione di un dispositivo per l'omogeneizzazione (Vinchhi et al., 2021).

La camera di omogeneizzazione può essere rappresentata da un semplice orifizio piatto, un getto in collisione o gruppi di diffusori radiali (Stang *et al.*, 2001; Donsì *et al.*, 2009). L'elevata pressione, fino a 300 Mpa, generata nella camera, fa sì che l'emulsione grossolana venga espulsa attraverso il piccolo orifizio di dimensioni micrometriche dalla valvola dell'omogeneizzatore. In questa fase, fattori come la turbolenza, lo sforzo di taglio e la cavitazione disgregano le emulsioni grossolane in goccioline molto più fini (Schultz *et al.*, 2004). Inoltre, le goccioline fini prodotte successivamente si stabilizzano.

Pertanto, nell'omogeneizzazione ad alta pressione, l'emulsione si forma attraverso due stadi:

- I. In primo luogo, l'interruzione della fase dispersa provoca la formazione di minuscole goccioline con una maggiore area superficiale nella camera di omogeneizzazione.
- II. Nella seconda fase, la presenza di proteine od altre molecole con funzione emulsionante, presenti nella fase dispersa, tendono a disporsi all'interfaccia delle goccioline stesse, formando così uno strato protettivo, impedendo la coalescenza e stabilizzandole (Jafari *et al.*, 2008).

L'omogeneizzazione ad alta pressione scompone efficacemente le goccioline e aumenta la stabilità (Schultz *et al.*, 2004). La facilità di applicazione, la riproducibilità e l'elevata produttività rendono la tecnica di omogeneizzazione con valvola ad alta pressione particolarmente adatta per la produzione di nanoemulsioni nelle industrie alimentari (Schubert e Engel, 2004).

1.2.2 Metodo ad ultrasuoni

Nell'industria alimentare si sta diffondendo sempre di più la tendenza di ridurre l'uso dei trattamenti termici, al fine di conservare tutte le caratteristiche nutrizionali dei prodotti alimentari e quindi di migliorarne la qualità.

La conservazione degli alimenti si basa su metodi e tecniche che hanno lo scopo di rallentare o bloccare il loro naturale processo di alterazione, controllando e riducendo la carica microbica o creando un ambiente sfavorevole alla vita, allo sviluppo e all'attività dei microrganismi. Tra queste tecniche innovative rientra la sonicazione che ha come principio l'utilizzo degli ultrasuoni.

Gli ultrasuoni sono onde sonore con frequenze che superano il limite uditivo dell'orecchio umano (20 kHz). Esistono ultrasuoni a bassa frequenza e alta energia, con potenza nella gamma dei kHz, e ultrasuoni diagnostici ad alta frequenza e bassa energia nella gamma dei MHz (Mason *et al.*, 1996). Gli ultrasuoni ad alta intensità e bassa frequenza generano forti forze di taglio e meccaniche. Si utilizzano ampiamente nei processi di emulsione nell'industria lattiero-casearia. Al contrario, gli ultrasuoni ad alta frequenza e bassa potenza sono ampiamente utilizzati in applicazioni in cui è necessaria una quantità elevata di radicali redox. Nel campo della lavorazione degli alimenti sono poco utilizzati tranne che per il monitoraggio della qualità e per scopi diagnostici (Ashokkumar *et al.*, 2014).

Il principio di funzionamento degli ultrasuoni in un liquido consiste nel generare bolle di cavitazione a causa delle variazioni di pressione (O'Donnell *et al.*, 2010). Le bolle di cavitazione possono essere caratterizzate dalla dinamica delle oscillazioni, e dalle temperature e pressioni massime raggiunte quando collassano (Ashokkumar *et al.*, 2011). Vale a dire, quando gli ultrasuoni attraversano un mezzo liquido, l'interazione tra le onde ultrasoniche, il liquido e il gas disciolto portano a un fenomeno eccitante noto come "cavitazione acustica". In breve, i nuclei di gas disciolti oscillano sotto l'influenza del campo acustico a causa della pressione fluttuante intorno a loro. Durante le oscillazioni, il gas disciolto e il vapore di solvente si diffondono dentro e fuori le bolle oscillanti. A causa del processo di diffusione, la quantità di gas/vapore che si diffonde nelle bolle durante la fase di espansione è maggiore della quantità che si diffonde fuori dalla bolla durante la fase di compressione dell'oscillazione della bolla. Ciò porta alla crescita delle bolle verso un intervallo di dimensioni di risonanza. Quando le bolle raggiungono l'intervallo delle dimensioni di risonanza, raggiungono una dimensione massima entro un ciclo acustico e poi collassano violentemente, generando condizioni di temperatura molto elevate all'interno delle bolle che collassano (Chandrapala *et al.*, 2012).

In questa tecnica quindi, l'agitazione ultrasonica, mediante onde sonore con una frequenza superiore a 20 kHz, rompe le goccioline grossolane in nanoemulsioni. Le onde sonore applicate dal sonotrodo producono vibrazioni meccaniche e cavitazione acustica e, con il collasso delle cavitazioni, le forti onde d'urto generate rompono le goccioline grossolane (Behrend *et al.*, 2000) (Figura 1.6). Le onde acustiche e d'urto creano alta pressione e turbolenza che fanno collassare le goccioline.

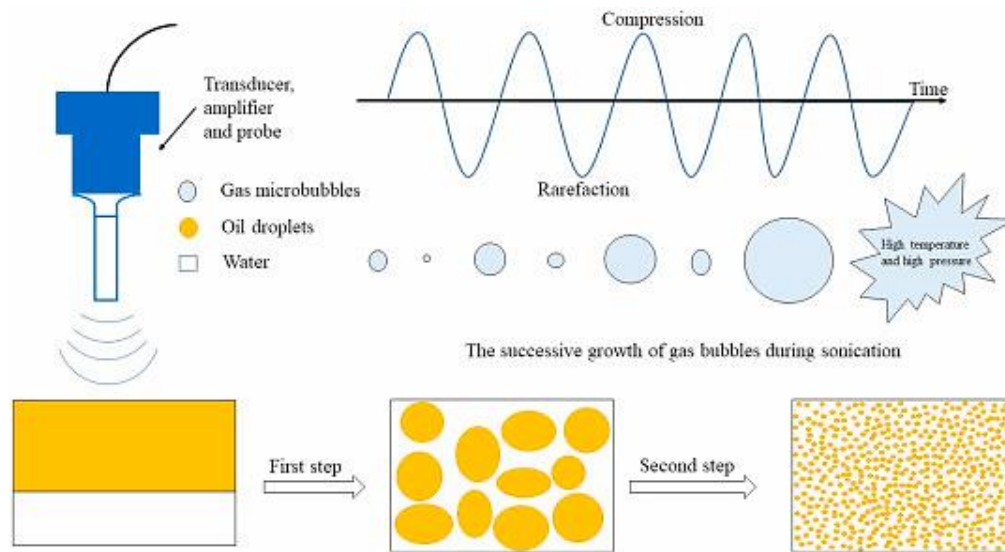


Figura 1.6: rappresentazione emulsione ultrasonica (Gosh *et al.*, 2013)

Il dispositivo è costituito da una camera ad ultrasuoni con una sonda ad ultrasuoni. Le forze dirompenti create dalla sonda ultrasonica in combinazione con la cavitazione, la turbolenza e le onde interfacciali rompono le emulsioni grossolane che scorrono nella camera ultrasonica in fini nanoemulsioni (Kentish *et al.*, 2008). Allo stesso modo, il sonicatore da banco viene utilizzato per la produzione di nanoemulsioni su piccola scala. La sonda di cristallo piezoelettrico nel sonicatore genera intense onde di pressione. È necessario un livello ottimale di energia in ingresso affinché la sonificazione raggiunga il diametro delle goccioline più piccolo. All'aumentare del tempo di sonicazione, c'è anche un aumento dell'energia in ingresso che tende a distruggere un numero maggiore di goccioline e a ridurre le dimensioni (Jafari *et al.*, 2007).

Gli altri fattori che influenzano la formazione di nanoemulsioni sono la concentrazione dell'emulsionante, il rapporto di viscosità della fase dispersa e continua e le ampiezze delle onde applicate (Nakabayashi *et al.*, 2011). È stato osservato che le nanoemulsioni preparate mediante ultrasuoni ad alta intensità da olio di semi di lino e tensioattivo non ionico (Tween 40) avevano un raggio di goccioline inferiore a 70 nm (Kentish *et al.*, 2008). Allo stesso modo, gli ultrasuoni ad alta intensità sono stati utilizzati anche per ottenere nanoemulsioni con raggio di goccioline di 20 nm. Questi sono stati preparati utilizzando emulsionanti di qualità, tra cui olio di girasole, Tween 80 e Span 80 (Leong *et al.*, 2009).

L'aumento del tempo di ultrasonicazione e la diminuzione della concentrazione di tensioattivo hanno portato a nanoemulsioni con un diametro delle goccioline di 29,3 nm. Le nanoemulsioni sono state preparate con olio di basilico ed emulsionante non ionico (Tween 80 e acqua) e avevano un'elevata stabilità intrinseca con un tempo di ultrasuoni di 15 minuti (Ghosh *et al.*, 2013).

Per quanto riguarda l'effetto battericida degli ultrasuoni invece, sappiamo che esso è dato dal riscaldamento localizzato e dalla produzione di radicali liberi, infatti gli ultrasuoni possono danneggiare le pareti cellulari e le membrane citoplasmatiche delle cellule microbiche (Wu *et al.*, 2015), possono produrre effetti dannosi sulle capsule batteriche, e sui componenti intracellulari (Takuo *et al.*, 2005), ed infine possono denaturare gli enzimi cellulari (Kapturowska *et al.*, 2012).

Oltre all'effetto batteriostatico, la sonicazione utilizzata nel processo di produzione del gelato ha molteplici vantaggi, tra questi:

1. Migliore emulsione e omogeneizzazione: la sonicazione è nota per favorire l'emulsione stabile e l'omogeneizzazione dei componenti nel gelato. Uno studio condotto da Barba *et al.* (2015) ha dimostrato che l'applicazione della sonicazione durante la produzione del gelato migliora l'omogeneità e la distribuzione dei componenti, tra cui grassi e emulsionanti. Ciò porta a una migliore texture e stabilità del prodotto finito.
2. Riduzione della dimensione dei cristalli di ghiaccio: questo metodo può contribuire a ridurre la dimensione dei cristalli di ghiaccio nel gelato, migliorando così la sua consistenza. Uno studio ha dimostrato che l'applicazione della sonicazione durante il congelamento del gelato può ridurre la dimensione dei cristalli di ghiaccio, favorendo una struttura più fine e una consistenza più cremosa.
3. Migliore incorporazione dell'aria: la sonicazione può migliorare l'incorporazione dell'aria nel gelato, influenzando la sua struttura e consistenza. La cavitazione acustica migliora la qualità della schiuma grazie alla formazione di bolle di ridotte dimensioni, uniformi e più stabili. Le schiume di natura proteica, come quelle ottenute a partire dalle proteine del latte, dell'albume d'uovo e della soia, hanno manifestato maggiore stabilità nel tempo ed una grana molto più fine. Questo comportamento può essere attribuibile alla parziale denaturazione delle proteine

a seguito della cavitazione, che, srotolate e denaturate, migrano più velocemente all'interfaccia aria/liquido, creando un film sottile ed elastico attorno alla bolla, stabilizzandola. Inoltre, l'effetto combinato della temperatura e degli ultrasuoni ha promosso la formazione di schiume molto stabili (Morales *et al.* 2015).

4. Riduzione del tempo di produzione: La sonicazione può contribuire a ridurre il tempo di produzione del gelato grazie alla sua capacità di emulsionare, omogeneizzare e ridurre la dimensione dei cristalli di ghiaccio in modo rapido ed efficiente. L'applicazione della sonicazione può ridurre significativamente il tempo di congelazione del gelato senza compromettere la qualità del prodotto.

2. OBIETTIVI

Considerata la scarsa documentazione scientifica legata all'applicazione degli ultrasuoni alla produzione del gelato, questo progetto si pone l'obiettivo di confrontare il gelato ottenuto mediante l'utilizzo di questa nuova metodica, che chiamiamo "prodotto innovativo" rispetto a quello "tradizionale". La cavitazione, promossa dagli ultrasuoni, modifica la struttura dei globuli di grasso in termini di dimensione e stabilità; questo effetto si ottiene anche grazie all'applicazione dell'omogeneizzatore, che, grazie all'azione meccanica e alla pressione di esercizio, disgrega tutta la matrice della miscela del gelato, compresi i globuli di grasso e i polisaccaridi.

L'effetto degli ultrasuoni sulla matrice del mix del gelato verrà confrontato con quello dell'omogeneizzatore, per studiare come viene modificato il prodotto, se si possono ottenere risultati simili, in termini di dimensioni delle *droplets*, oppure effetti diversi sulla struttura.

Inoltre, visti i parametri chimico-fisici che lo caratterizzano e per il processo di produzione di questo prodotto, occasionalmente potrebbe essere contaminato da differenti popolazioni microbiche, tra batteri, lieviti e muffe. Alcune di queste popolazioni possono essere degli alteranti per il prodotto, mentre alcune altre possono comportare pericoli per la salute umana, in quanto agenti di malattia alimentare. Tra i principali microrganismi agenti di malattia alimentare la cui presenza è stata segnalata nel gelato possiamo citare *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum*. In bibliografia di settore abbiamo rinvenuto risultati di studi sperimentali che documentano l'efficacia batteriostatica e/o battericida degli ultrasuoni nei confronti delle popolazioni microbiche che possono albergare negli alimenti e ciò può avere riscontri interessanti anche nei confronti della flora microbica presente nei gelati (Huang G., *et al.*, 2016; Bevilacqua A., *et al.*, 2019).

Per valutare l'efficacia antimicrobica di un qualunque trattamento applicato agli alimenti è opportuno ricorrere a prove analitiche specifiche che prevedono l'inoculazione programmata e intenzionale di specifiche popolazioni microbiche in una matrice alimentare per poi verificare l'effetto che il trattamento ha nei confronti di dette popolazioni. Tali prove sperimentali sono indicate come *challenge test*.

Per progettare tali prove abbiamo fatto riferimento alla norma ISO 20976-2:2022 che detta linee guida per progettare e realizzare prove del genere. Il campione studiato sarà un gelato a base latte, mediante un preparato standard, fior di latte.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Analisi microbiologiche

Challenge test

Come detto in precedenza, è stato svolto un challenge test per valutare l'efficienza antimicrobica della sonicazione. I *challenge test* sono analisi microbiologiche utilizzate nel settore alimentare per studiare la capacità di crescita di un microrganismo patogeno (o deteriorante) in un alimento in un determinato processo o condizioni di conservazione. Fare un *challenge test* significa inserire una determinata quantità di un microrganismo o (di un composto chimico) sulla superficie o all'interno di un prodotto alimentare e valutare cosa avviene durante le fasi di manipolazione e/o di conservazione.

I challenge test che si possono effettuare sono di due tipi:

1. di processo;
2. di prodotto.

Nel nostro caso si parla di un challenge test di processo in cui viene inoculato nella materia prima, in condizioni controllate, un numero rilevante di microrganismi (determinato dalla ISO 20976) oggetto dello studio e si valuta lo stato del microrganismo durante il processo produttivo.

L'esecuzione di un challenge test è sempre preceduta da una fase di pianificazione, nel corso della quale vengono studiati ed elaborati una serie di fattori relativi all'alimento e al microrganismo oggetto del test di cui bisognerà tenere conto nell'impostare la prova stessa. Lo scopo del *challenge test* che abbiamo progettato era di inoculare intenzionalmente vari ceppi di batteri agenti di malattia alimentare in differenti lotti di una specifica preparazione di gelato denominato "cremizia", sottoporre la matrice inoculata a trattamento di sonicazione e valutarne gli effetti sulla popolazione batterica residua.

3.1.1 Preparazione terreni di crescita per l'inoculo

Per quantificare le cariche dei singoli batteri oggetto di *challenge test* nelle unità di prova (sia quelle non trattate sia quelle ottenute dopo l'applicazione dei vari trattamenti) abbiamo sottoposto 10 g di ciascuna unità di prova ai rispettivi metodi analitici quantitativi, utilizzando gli opportuni terreni di coltura specifici e le adeguate condizioni di incubazione per tempi e temperature ottimali per le singole specie batteriche oggetto di *challenge test*.

Preparazione del terreno di crescita per Salmonella enterica

È stato utilizzato il terreno XLT4 di Merck. La selezione di nutrienti e vitamine adeguati (peptoni, estratto di lievito) consente una crescita ottimale delle salmonelle. Allo stesso tempo il tensioattivo NIAPROOF-4 inibisce ampiamente la flora associata.

Le salmonelle, a causa della formazione di H₂S, possono essere facilmente rilevate come colonie nere su sfondo rosso-violetto e differenziate dalla flora residua.

La preparazione viene fatta sospendendo 59 g in 1 litro di acqua demineralizzata, aggiungendo 4,6 ml di soluzione XLT4 Agar Supplement e riscaldando il terreno in un lotto di acqua bollente. Infine si fa raffreddare a circa 50°C e si versa nelle piastre petri (merckmillipore.com).

Preparazione del terreno di crescita per Listeria monocytogenes

È stato utilizzato il terreno ALOA con selective supplements di Biolife Italia. ALOA è un terreno cromogeno e selettivo per la ricerca ed il conteggio *L. monocytogenes* e *Listeria* spp. per la sua capacità di differenziare *L. monocytogenes* dalle altre specie di *Listeria*, anche in presenza di una flora mista. I peptoni e l'estratto di lievito forniscono azoto, carbonio, vitamine ed oligoelementi per la crescita microbica. Il glucosio costituisce una fonte di energia, il sodio cloruro mantiene l'equilibrio osmotico, il sodio fosfato bibasico è incluso come sistema tampone. Il sodio piruvato ed i sali di magnesio stimolano la crescita di *Listeria* spp. L'azione selettiva è dovuta alla presenza nel terreno di base del litio cloruro ed all'aggiunta della miscela antimicrobica del supplemento selettivo. L'azione differenziale è dovuta alla presenza nel terreno del composto cromogenico X-glucoside, quale substrato per l'evidenziazione dell'enzima β-

glucosidasi, comune a tutte le specie di *Listeria*. L'azione differenziale specifica è ottenuta con un substrato per la fosfolipasi C.

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica le colonie si presenteranno di colore blu-verde circondate da un alone opaco (colonie tipiche).

La preparazione avviene secondo i seguenti step:

1. Sospendere 35,3 g in 500 ml di acqua distillata fredda;
2. portare ad ebollizione sotto agitazione;
3. sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti;
4. raffreddare fino al raggiungimento della temperatura di 47-50°C, e aggiungere il contenuto di una fiala di ALOA Enrichment Supplement, preriscaldato a 47-50°C ed il contenuto di una fiala di ALOA Selective Supplement ricostituito con 5 ml di una miscela alcool etilico/acqua distillata sterile (1:1).
5. Mescolare bene e distribuire in piastre sterili (merckmillipore.com).

Preparazione del terreno di crescita per Staphylococcus aureus

È stato utilizzato il terreno Baird-Parker agar con emulsione di tuorlo d'uovo e tellurite di Merck. La crescita degli stafilococchi è favorita dal piruvato di sodio e dalla glicina. La microflora associata è inibita dal litio cloruro e dal potassio tellurite, oltre che da una elevata concentrazione di glicina. L'arricchimento con tuorlo d'uovo favorisce l'identificazione dei microrganismi evidenziando l'azione della lecitinasi.

Si svilupperanno nella piastra delle colonie nere o grigie dovute alla riduzione del tellurite a telluride, circondate da aloni di chiarificazione.

La preparazione avviene secondo i seguenti step:

1. Sospendere 58,0 g di terreno disidratato in 950 mL di acqua distillata o deionizzata.
2. Portare lentamente a ebollizione, agitando fino a completa soluzione.
3. Distribuire in flaconi da 150 mL, dispensando 95 mL di terreno per flacone, se usato con Egg Yolk Tellurite Enrichment.
4. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.
5. Asetticamente, aggiungere 5 mL di Egg Yolk Tellurite Enrichment a 95 mL di Baird-Parker Agar Base e, facoltativamente 1 mL di Sulfamethazine Selective Supplement.

6. Mescolare rapidamente e con cura, versare in piastre Petri sterili, lasciare solidificare
7. Asciugare la superficie dell'agar ponendo le piastre in termostato con i coperchi parzialmente aperti per il tempo strettamente necessario.
8. Trasferire 0,1 mL del campione in esame e le sue diluizioni seriali nelle piastre contenenti il terreno; seminare l'inoculo sulla superficie dell'agar con una spatolina di vetro sterile.
9. Incubare a 37°C per 48 ore (merckmillipore.com).

Preparazione del terreno di crescita per Bacillus cereus

È stato utilizzato il terreno selettivo Cereus sec. MOSSEL di Merck. La preparazione avviene sospendendo 21,5 g in 450 ml di acqua demineralizzata e autoclavando per 15 minuti a 121 °C. Si lascia raffreddare il terreno a 45°-50 °C. Successivamente si fa sciogliere il supplemento aggiungendo 1 ml di acqua distillata sterile e si miscela in modo omogeneo nel terreno di coltura raffreddato. Infine si aggiungono 50 ml di emulsione di tuorlo d'uovo, che è stata precedentemente riscaldata a temperatura ambiente, al terreno di coltura, distribuire in modo omogeneo e versare nelle piastre petri (merckmillipore.com).

Preparazione del terreno di crescita per Clostridium sporogenes (forma vegetativa)

È stato utilizzato il terreno Agar SPS di Merck. Tra i principali nutrienti del terreno vi sono l'idrolisato enzimatico di caseina e l'estratto di lievito come fonti di azoto, ma anche il complesso della vitamina B ed altri nutrienti essenziali per la crescita *Clostridium*. Quest'ultimo infatti riduce il solfito a solfuro che reagisce con il ferro del citrato ferrico dando un precipitato visibile perché nerastro. Al contempo, la presenza delle sulfadiazine e della polimixina B inibisce lo sviluppo della maggior parte degli altri batteri Gram positivi e negativi.

Per la preparazione è necessario disciogliere 40,03 g di polvere in 1 l di acqua distillata. Il tutto va portato all'ebollizione per un completo scioglimento delle polveri, dopodiché il terreno andrà autoclavato per 15 minuti a 121°C.

Fatto ciò, potrà essere colato all'interno di piastre Petri sterili e lasciato raffreddare fino a solidificazione. Il pH finale del mezzo deve essere di 7,0 +/-0,2 (merckmillipore.com).

Preparazione del terreno di crescita per Clostridium sporogenes (forma sporale)

Il terreno utilizzato è il reinforced clostridial medium broth. L'RCB è un terreno di coltura arricchito non selettivo formulato da Hirsch e Grinstead per migliorare la crescita dei clostridi da un piccolo inoculo. La caseina, l'estratto di manzo e l'estratto di lievito costituiscono la base nutritiva che fornisce una fonte di carbonio, azoto, vitamine e minerali. Il destrosio viene aggiunto come fonte di carboidrati. La L-cisteina è inclusa come agente riducente. L'amido solubile è un disintossicante dei sottoprodotti metabolici mentre l'acetato di sodio funge da tampone. La resazurina viene aggiunta come indicatore di una significativa esposizione all'ossigeno ai media (merckmillipore.com).

3.1.2 Preparazione dell'inoculo

Le prove sono state progettate seguendo fedelmente le linee guida dettate dalla norma ISO 20976-2:2022.

I batteri prescelti per l'inoculazione sperimentale sono i seguenti:

1. *Salmonella enterica* sierotipo Typhimurium (ceppo di riferimento ATCC 14028 associato a un ceppo selvaggio di nostra collezione),
2. *Listeria monocytogenes* (ceppo di riferimento ATCC 13932 associato a un ceppo selvaggio di nostra collezione),
3. *Staphylococcus aureus* (ceppo di riferimento ATCC 6538 associato a un ceppo selvaggio di nostra collezione),
4. *Bacillus cereus* (ceppo di riferimento ATCC 11778 associato a un ceppo selvaggio di nostra collezione),
5. *Clostridium sporogenes* (ceppo di riferimento ATCC 19404) sia come forma vegetativa sia come spora. In questo caso specifico, questa specie batterica è stata inserita nel *challenge test* come valido surrogato per studiare di *Clostridium botulinum*, come documentabile da specifici riferimenti bibliografici.

Ciascuno dei ceppi batterici sopra indicati è stato coltivato in adeguate condizioni alle temperature ottimali per favorirne la crescita esponenziale nell'arco di 24 ore. A seguire, ogni ceppo è stato trapiantato in uguale substrato di coltura e incubato per 3 giorni a 10°C in modo da indurre le forme vegetative a entrare in fase di crescita stazionaria, diventando così più resistenti alle condizioni ambientali avverse (condizione scelta di *worst case scenario*).

Per ottenere adeguate quantità di spore di *B. cereus* e *C. sporogenes*, il ceppo prescelto è stato coltivato in adeguate condizioni per 15 giorni, tempo necessario per ottenere la maggiore carica sporale possibile.

Al momento delle prove, abbiamo realizzato una miscela di *B. cereus* e *C. sporogenes* (forme vegetative + spore) e rispettivamente una miscela di *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* e *S. aureus*, in volumi uguali fra loro per ottenere una carica batterica complessiva bilanciata tra le varie specie batteriche.

La miscelazione dei ceppi avveniva immediatamente prima dell'inoculazione nella massa della preparazione di gelato da saggiare.

Seguendo le linee guida dettate dalla norma ISO 20976-2:2022, per ognuna delle due miscele di batteri abbiamo inoculato una massa iniziale di 4 kg di gelato. Per ogni prova sperimentale abbiamo inoculato nella massa del gelato un volume di sospensione pari a 40 ml che equivale all'1% della massa di gelato. Ciò per non modificare in misura eccessiva i parametri chimico-fisici della matrice alimentare, come peraltro indicato dalla norma ISO 20976-2:2022.

3.1.3 Analisi dei campioni

Dopo aver inoculato la miscela con una carica batterica nota, aver prodotto il gelato e aver effettuato i campionamenti in maniera adeguata, sono state svolte analisi microbiologiche quantitative in modo da individuare la carica microbica presente nei campioni e verificare quindi l'efficacia dei trattamenti svolti.

Per quantificare le cariche dei singoli batteri oggetto di *challenge test* nelle unità di prova (sia quelle non trattate sia quelle ottenute dopo l'applicazione dei vari trattamenti) abbiamo sottoposto 10 g di ciascuna unità di prova ai rispettivi metodi analitici quantitativi, utilizzando gli opportuni terreni di coltura specifici e le adeguate condizioni di incubazione per tempi e temperature ottimali per le singole specie batteriche oggetto di *challenge test* che son state descritte precedentemente. Nel complesso, abbiamo sottoposto ad analisi n.55 unità di prova.

I risultati ottenuti sono stati espressi un Unità Formanti Colonia (UFC) per grammo di alimento saggiato. Nelle tabelle e nei grafici allegati a questa relazione le cariche microbiche registrate sono state anche indicate (in base alla necessità) sotto forma di valori in logaritmi decimali).

Diluizioni seriali

Il materiale necessario per l'allestimento della prova comprende: portaprovette, provette da 16x150mm di polistirene sterili, micropipette di diverso volume, soluzione fisiologica (SF), bunsen, pennarello, e carta asciugatutto. Nelle diluizioni seriali (figura 3.1) si utilizza come diluente la soluzione fisiologica sterile.

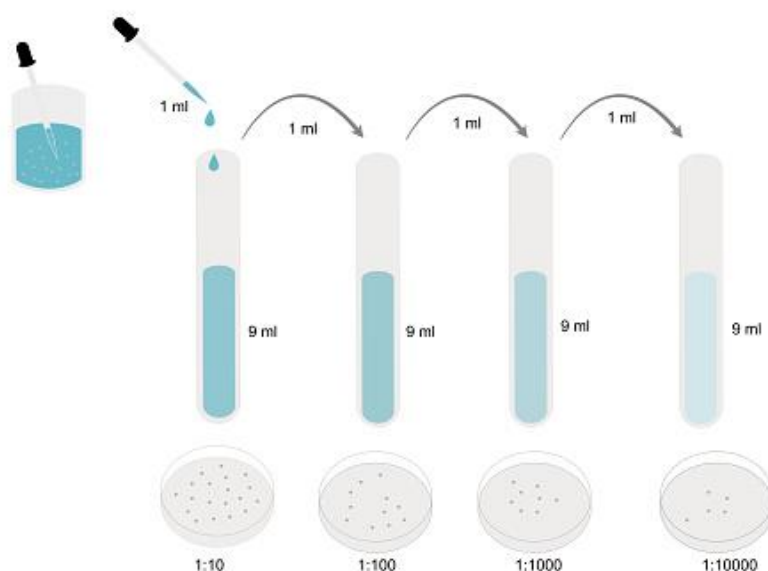


Figura 3.1: rappresentazione schematica diluizioni seriali.

Le operazioni sono:

- 1- Inserire 1ml di campione in una provetta sterile contenente 9 ml di SF.
- 2- Preparare le diluizioni decimali successive aggiungendo sempre 1 ml della diluizione precedente a 9 ml di diluente sterile presente in una provetta sterile, per ottenere la diluizione 10^{-n} .
- 3- Le diluizioni decimali successive necessarie sono state allestite sulla base delle caratteristiche microbiologiche della matrice analizzata.
- 4- Effettuare le diluizioni usando una pipetta sterile da 1 ml (gialla). Omogeneizzare con cura tramite vortex per provetta per 20". Eliminare la pipetta tutte le volte ad ogni passaggio.
- 5- La conclusione della preparazione del campione deve avvenire entro 45 minuti
- 6- Il tempo massimo tra l'allestimento della prima diluizione e le successive deve essere di 30 minuti

L'operazione verrà ripetuta tante volte quante sono le diluizioni necessarie al corretto svolgimento dell'analisi.

Tecniche di semina - inclusione

Dopo aver accuratamente siglato le piastre nella parte inferiore con un pennarello vetrografico, si procede, ponendo 1 ml di un'opportuna diluizione del campione in piastre Petri sterili vuote; quindi, il terreno, preparato in precedenza (sciolto mediante microonde), una volta raggiunta la temperatura di 48°C, è versato in ciascuna delle piastre seminate in ragione di 15 ml.

Al fine di distribuire la sospensione microbica nel modo più omogeneo possibile in tutto il terreno addizionato, si effettuano delicati movimenti rotatori, orizzontali e verticali della piastra (o a 8 orizzontale) per 30". Quando il terreno è solidificato si procede all'aggiunta di un secondo strato dello stesso (circa 3-5 ml, fino a copertura completa della superficie) e si lascia solidificare (figura 3.2).

La crescita delle colonie avviene in profondità.

Alla fine delle semine, si versa il terreno specifico avanzato in una piastra nell'ordine di 12 ml dove non è stato messo il campione diluito (bianco) a verifica del non inquinamento del terreno (si fa un solobianco per bottiglia di terreno).

Questo sistema è utilizzato per i microrganismi anaerobi facoltativi e per ciascun terreno si dispongono 3 diluizioni consecutive.

I risultati ottenuti sono stati espressi in Unità Formanti Colonia (UFC) per grammo di alimento saggiato.

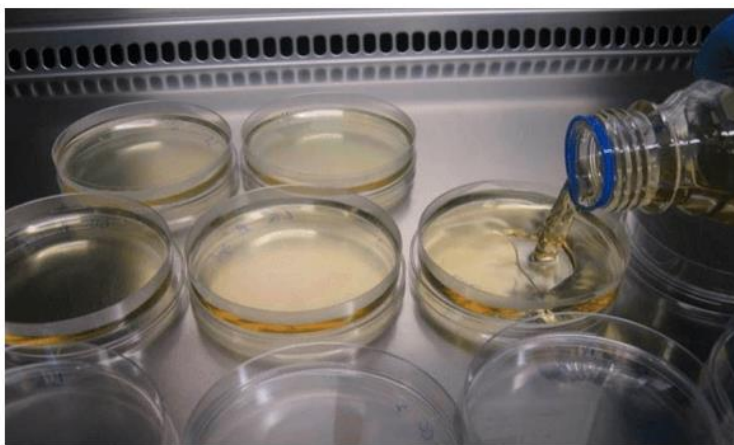


Figura 3.2: piastre petri i in cui si sta versando il terreno di crescita specifico al microrganismo di interesse necessario alla tecnica di semina per inclusione (fonte: chimica-online.it).

3.2 Produzione del gelato

3.2.1 Macchinario utilizzato

Il gelato è stato prodotto utilizzando un macchinario prodotto dall'azienda Bravo S.p.a. ovvero il Trittico 305 Executive EVO V4 N. 3253913 (Figura 3.3). Questa macchina nasce nel 1974 grazie a Genesio Bravo e detiene il brevetto in quanto si tratta della prima macchina multifunzione per la gelateria, la pasticceria e la cioccolateria. Il Trittico ha dimensioni di circa 1 mq, è in grado di pastorizzare e mantecare il gelato, e riesce a controllare in modo automatico molte altre lavorazioni grazie ad un software complesso e una tecnologia avanzata.



Figura 3.3: Trittico 305 Executive EVO V4 (fonte: bravo.it).

Questo macchinario ha le seguenti caratteristiche:

- 1) una tensione di 400 Volt, da una classe climatica N (normale, ossia da +16 a +32°C);
- 2) un gas refrigerante R 449A (refrigerante a basso potenziale di riscaldamento globale a base di idro-fluoro-olefine);
- 3) è dotato di un software che gestisce i processi di cottura, raffreddamento ed emulsione dei prodotti;
- 4) è costituito da un Sistema Ionico®, che valuta la consistenza e il giusto volume del gelato rilevando, attraverso delle sonde posizionate nel cilindro di mantecazione, la quantità d'acqua cristallizzata presente nella miscela.

Il Trittico presenta numerosi vantaggi in quanto permette di risparmiare tempo durante la fase di produzione, è possibile utilizzarlo come pastorizzatore, realizza sempre una crema vellutata senza grumi, e possibile ottenere un notevole risparmio energetico utilizzando la vasca al 50%.

3.2.2 La preparazione e gli ingredienti

La prima fase della preparazione del gelato è data dalla pesatura della miscela. Quest'ultima è chiamata "cremizia" ed è una base di tipo industriale, dal sapore neutro e già utilizzata dall'azienda per test interni. Le proporzioni utilizzate, rispetto al peso finale, sono 39% miscela e 61% acqua. Il peso finale del gelato utilizzato nelle prove era di 4 kg per quanto riguarda le prove microbiologiche, e di 6 kg per quelle reologiche. Per standardizzare le prove ed evitare complicazioni legate all'eccessiva durezza dell'acqua di rubinetto, si è optato per l'utilizzo di acqua in bottiglia San Benedetto. La miscela contiene già tutti gli ingredienti necessari per il gelato.

La "cremizia" è composta da:

- a) Saccarosio;
- b) Latte spray magro;
- c) Grassi vegetali non idrogenati (cocco);
- d) Destrosio;
- e) Glucosio disidratato;
- f) Emulsionanti: E471, E472a, E472b, E472c, E477;
- g) Stabilizzanti: farina di semi di carrube, farina di semi di Guar;
- h) Panna di latte spray;
- i) Maltodestrina;
- j) Cloruro di sodio.

L'emulsionante E471 (monogliceridi e digliceridi degli acidi grassi) è usato per emulsioni O/W e W/O, prodotti da forno, gelati, margarine, creme spalmabili e consente la regolazione di proprietà tecnico-funzionali come viscosità, cremosità, stabilità dell'emulsione e della schiuma (Norn, 2015; Munk *et al.*, 2013; Méndez-Velasco & Goff, 2012). L'emulsionante E472a (esteri dell'acido acetico dei monogliceridi) è usato per prodotti da forno e dessert. L'emulsionante E472b (esteri lattici di monogliceridi e digliceridi) è usato per prodotti da forno e dessert. L'emulsionante E472c (esteri

dell'acido citrico di monogliceridi e digliceridi) è usato per emulsioni O/W e W/O, margarine e prodotti a base di carne. L'emulsionante E477 (esteri del glicole propilenico degli acidi grassi) è usato per torte e altri dessert.

Nell'etichetta del semilavorato sono riportati i valori nutrizionali per 100 g: energia 438,48 Kcal, grassi 13,23 g, di cui saturi 11,77 g, carboidrati 73,72 g, di cui zuccheri 67,37 g, proteine 6,53 g, sale 0,04 g.

La miscela è stata preparata all'interno di un becher omogeneizzando la "cremizia" (contenuta in sacchi di 20 kg) e l'acqua per 5 minuti, attraverso un frullatore ad immersione. Il tempo è stato cronometrato con l'utilizzo di un cronometro digitale, e una volta terminata questa operazione è stato aggiunto l'inoculo. A questo punto, al fine di eseguire le successive analisi microbiologiche, prima di iniziare il trattamento di sonicazione/pastorizzazione abbiamo prelevato in asepsi una unità di prova da 100 g di miscela gelato per calcolare la dose batterica iniziale inoculata.

Successivamente la miscela sarà versata all'interno del Trittico dal coperchio posto nella parte superiore e sarà subito avviato il programma a caldo ("Pastorizzazione a 65°C"). La pastorizzazione è usata per la distruzione di batteri patogeni dal gelato ma anche perché svolge un ruolo utile di solubilizzazione di alcuni componenti (proteine e stabilizzanti).

A questo punto la miscela è mandata nel mantecatore, dove la mantecazione avverrà alla temperatura di -10°C.

Come ultimo passaggio della produzione del gelato, abbiamo l'estrusione. Una volta raccolto il gelato in una bacinella, è stato bloccato il macchinario, ed infine, è stato pulito e disinfettato con una soluzione clorata al 5% preparata al momento per evitare la dispersione in aria.

Dopo l'estrusione sono stati prelevati 10 campioni di gelato da circa 100 g ciascuna, sulle quali abbiamo poi determinato la carica batterica specifica residua per effettuare l'analisi microbiologica.

Per valutare l'efficacia battericida del solo trattamento termico vs. il solo trattamento con ultrasuoni sui batteri oggetto di saggio, abbiamo programmato e realizzato ulteriori prove di inoculazione identiche alle precedenti (controlli positivi).

Oltre a questi passaggi, per eseguire le prove reologiche, Il prodotto è stato "abbattuto", per mezzo di un abbattitore di temperatura e portato a -20 °C, in 30 min.

3.2.3 Sonicatore

In questo caso studio è stato utilizzato il modello di sonicatore UP400St dell'azienda tedesca Hielscher (Figura 3.4). Questo sonicatore possiede un display, un timer, e una regolazione automatica della frequenza (W). Sono presenti anche un sensore di temperatura, una scheda SD integrata per la registrazione automatica dei dati (ampiezza, potenza, tempo e temperatura) e una sonda/puntale in titanio 0,18 mm con ampiezza di 40 μ m. Il dispositivo è adatto per la sonicazione di volumi di campione da 5 a 4000 ml. La superficie sonicante è rappresentata dalle due superfici piatte presenti prima dell'anello di giuntura, partendo dal basso. Nelle prove effettuate per lo studio, è stato abbassato il puntale in titanio all'interno della vasca di miscelazione/pastorizzazione, prima dell'avvio del programma. In particolare, le due superfici sonicanti sono state ben immerse nella miscela, passando per il foro presente nel coperchio posto nella parte superiore. Nelle prove sono state utilizzate potenze pari a 40W, e il sonicatore è stato acceso durante il processo di pastorizzazione.



Figura 3.4: sonicatore modello UP400St Hielscher (fonte: hielscher.it).

3.2.4 Omogeneizzatore

L'omogeneizzatore è stato utile alla realizzazione del gelato che poi è stato analizzato a livello reologico (non microbiologico). Il mix iniziale è stato pastorizzato e sottoposto ad omogeneizzazione. La miscela, dopo essere stata pastorizzata è stata versata con un imbuto sulla parte superiore dello strumento, passava attraverso un orifizio e spinto ad alta pressione attraverso una valvola. Le pressioni di esercizio studiate sono state di 150

bar e 250 bar. Il campione prelevato veniva aliquotato, in parte per le analisi sulla miscela trattata e il resto reintrodotta nel mantecatore per ottenere il gelato.

I campioni analizzati sono i seguenti:

1. Campione ottenuto dopo la miscelazione col miscelatore (frullatore);
2. I campioni liquidi dopo trattamento a 85 °C (controllo).
3. I campioni ottenuti a 65 °C per 5 minuti.
4. I campioni ottenuti a 65 °C per 30 minuti.
5. I campioni ottenuti a 65 °C per 5 minuti e sonicatori a 40 W e 22KHz per 2 minuti.
6. I campioni ottenuti a 65 °C per 5 minuti ed omogeneizzati a 150 bar di pressione.
7. I campioni ottenuti a 65 °C per 5 minuti ed omogeneizzati a 250 bar di pressione

Per alcuni test fisici i campioni sono stati misurati al tempo iniziale, T0, e dopo 24 ore, T1.

3.3 Analisi reologiche

3.3.1 Il reometro

Lo studio della dinamica dei sistemi idrocolloidali fluidi, sottoposti allo stress del reometro, permette di analizzare la viscosità apparente nel tempo e di ricavare diversi parametri che ne delineano il comportamento reologico. Il comportamento è stato monitorato con un reometro rotazionale (*Malvern Kinexus pro+*), montante una geometria conica (figura 3.5). La geometria viene agganciata al rotore, posto in movimento da un motore supportato da cuscinetto ad aria compressa, che permette di ottenere un movimento privo di attrito. Il sistema di misura dello strumento è costituito da un piatto inferiore fisso, sul quale viene posto il campione da analizzare, e una parte superiore mobile su cui viene fissata la geometria, collegata all'albero motore della macchina.



Figura 3.5: reometro rotazionale Malvern Kinexus pro+ montante geometria conica.

(Fonte: www.instrumat.ch)

Per le analisi di reologia fluida, è stata utilizzata una geometria a cono di diametro 75 mm e 1° d'inclinazione. Lo shear stress è stato variato da 0,001 a 5 Pa. Mentre lo shear rate da 0,1 a 300 s⁻¹.

I dati ottenute dalle analisi reologiche, sono stati acquisiti con il software rSpace for Kinexus (1.61.1998) e poi elaborati secondo la formula di Cross, che meglio sembra interpolare i dati:

$$\eta_a = \eta_\infty + \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_c)^m}$$

dove la viscosità apparente è il risultato della viscosità iniziale η_0 , della viscosità tendente all'infinito η_∞ , al gradiente di velocità $\dot{\gamma}$ e al $\dot{\gamma}_c$ che indica il momento in cui il plateau iniziale comincia a decrescere con pendenza m .

3.3.2 Microscopio ottico

I campioni delle tesi a confronto sono stati sottoposti ad analisi microscopica con microscopio ottico (*Leica DM 2000 LED*) ed osservati a 100X, 200X e 400X. Per ogni campione sono state eseguite 20 acquisizioni d'immagine con il *software Leica Application Suite X (1.1.0.12420)*. Lo scopo era di avere un numero elevato e statisticamente rilevante di elementi da analizzare, con il *software Axiovision Zeiss*. Grazie all'analisi delle immagini, sono stati elaborati i dati relativi alla struttura interna del mix del gelato e alla distribuzione dei globuli di grasso e degli aggregati.

3.3.3 Dinamometro

Per quanto riguarda il presente studio, ci siamo avvalsi di un dinamometro TA.XT dell'azienda Stable Micro Systems, leader nelle analisi della texture (figura 3.6). Si tratta di un dinamometro a singola colonna collegato ad un software proprietario: presenta numerose sonde che possono essere agevolmente cambiate per poter misurare, numerose caratteristiche fisiche di un prodotto, come durezza, friabilità o collosità.

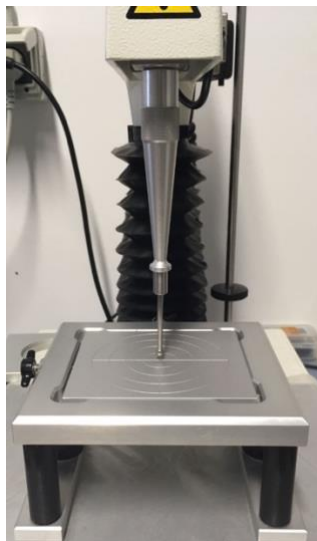


Figura 3.6: panoramica del piano di lavoro del dinamometro con sonda a sfera installata.

Per le analisi prefissate, si è scelto di utilizzare le seguenti sonde:

- Sonda a sfera
- Cilindro da estrusione, foro da 5 mm

Per ogni tesi si è prodotto un lotto di gelato del peso di 6 kg, suddiviso poi in vaschette più piccole della capienza di 0.5 kg.

Durante le prove, i campioni di gelato sono stati mantenuti in un range di temperatura fra i -9 e i -13 °C, tramite una cassetta isolante riempita con ghiaccio: la temperatura è stata verificata costantemente con termometro ad immersione, inserito in una vaschetta da 0.5 kg di gelato non utilizzato per le successive analisi, ma solo come controllo di temperatura.

I parametri di settaggio delle sonde, riportati di seguito, sono stati individuati arbitrariamente dopo una ricerca in letteratura e delle prove, precedenti alle analisi riportate in questa tesi, per capire come impostare i parametri del reometro.

3.3.4 Sonda a sfera

Le misurazioni effettuate con la sonda a sfera sono state 9 per ogni tesi: con le prime misurazioni, poi scartate, si è notato che il campione, disposto in vaschette a parallelepipedo mostrava notevoli differenze tra l'esterno e il centro. Per limitare l'effetto bordo, e rendere le misure più rappresentative, sono state fatte quattro misure agli angoli ed una al centro, ripetendo questo schema anche per il cono. Il gelato ai bordi si presentava sempre più sciolto e caldo, essendo maggiormente esposto a scambi termici. I parametri della macchina sono stati individuati dopo alcune prove, precedenti alla tesi, svolte su gelato commerciale. Vengono riportati per completezza, seguendo lo schema proposto dalle impostazioni del software (tabella 3.1 e figura 3.7).

Tabella 3.1: Parametri di settaggio della sonda a sfera e a cono

Caption	Value	Units
Test mode	Compression	
Pre-test speed	1,00	mm/sec
Test speed	2,00	mm/sec
Post-test speed	10,00	mm/sec
Target mode	Distance	
Distance	20,00	mm/sec
Trigger type	Auto (force)	
Trigger force	5,0	g
Break mode	Off	
Stop plot at	Start position	
Tare mode	Auto	
Advanced options	On	
Control oven	Disabled	
Frame deflection correction	Off (XT2 compatibility)	

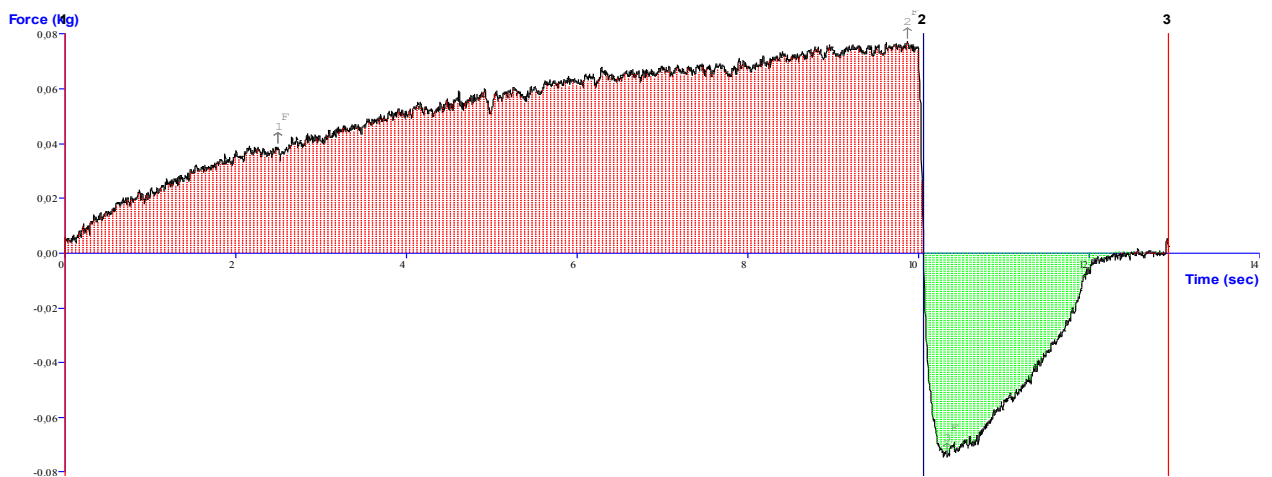


Figura 3.7: Grafico tipo dell'analisi effettuata con sonda a cono

3.3.5 Cilindro di estrusione

La misurazione con cilindro di estrusione è stata senza ombra di dubbio la più complessa: il caricamento del gelato, infatti, ha presentato alcune problematiche legate, in particolare, alla presenza di spazi vuoti. Caricare il gelato nel cilindro lasciando spazi tra le porzioni di campione implica avere delle zone in cui il pistone del dinamometro non incontrerà alcuna resistenza, causando quindi picchi improvvisi nel grafico restituito, inquinando così i risultati ottenuti.

Si è scelto dunque di caricare il gelato quasi fino alla sommità del cilindro, abbassare il pistone manualmente fino all'altezza di 7.5 cm e far partire da quel punto l'analisi: la compressione manuale riesce ad eliminare parzialmente i vuoti, fornendo dunque un campione di gelato compatto da analizzare. Vengono riportati per completezza, seguendo lo schema proposto dalle impostazioni del software (tabella 3.2 e figura 3.8).

Tabella 3.2: parametri di settaggio del cilindro di estrusione

Caption	Value	Units
Test mode	Compression	
Pre-test speed	1,00	mm/sec
Test speed	2,00	mm/sec
Post-test speed	10,00	mm/sec
Target mode	Distance	
Distance	50,00	mm
Trigger type	Auto (force)	
Trigger force	400,0	g
Break mode	Off	
Stop plot at	Start position	
Tare mode	Auto	
Advanced options	On	
Control oven	Disabled	
Frame deflection correction	Off (XT2 compatibility)	

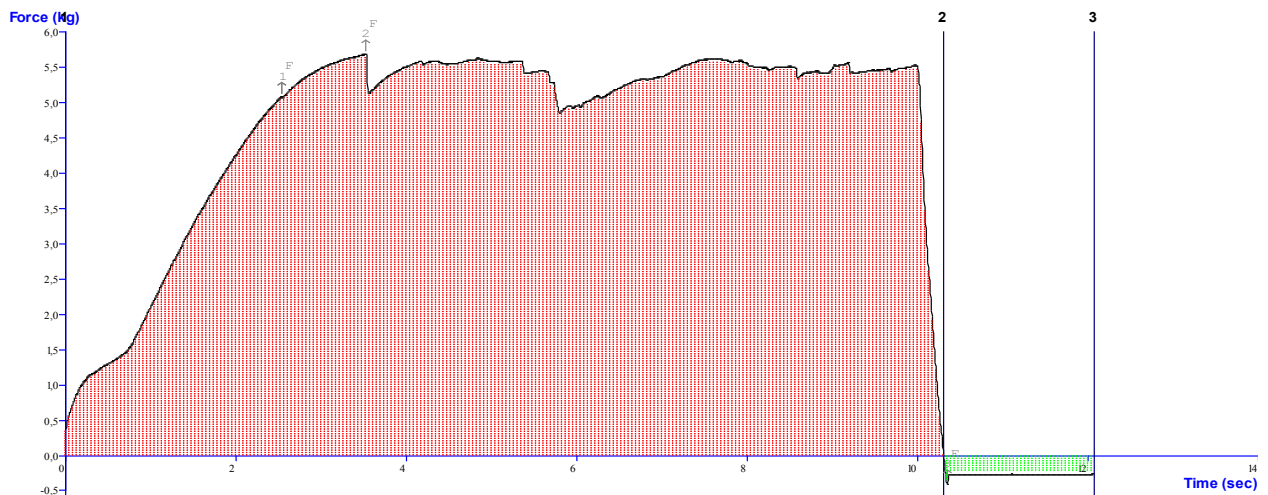


Figura 3.8: Fi Grafico tipo dell'analisi effettuata con cilindro di estrusione

3.3.6 Analisi statistica

Tutti i dati raccolti sono stati analizzati sia mediante statistica descrittiva che inferenziale. Per ogni prova si sono eseguite 3 ripetizioni. I test statistici utilizzati sono stati Tuckey test ($p < 0.05$), box plot, distribuzioni, calcolo delle medie ed intervalli di confidenza al 95%. Sono stati utilizzati il programma StatGraphic Centurium, ORIGIN (ADALTA) e ExCell.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 Microbiologia

I risultati ottenuti nel corso delle prove sperimentali sono stati sintetizzati nelle figure da 4 a 8. Va detto che i risultati relativi alle unità di prova dopo il trattamento sono la media dei 10 valori puntuali originariamente quantificati.

Nella prima parte delle prove, abbiamo sperimentato l'efficacia battericida di due differenti trattamenti di sonicazione, condotti per 2 minuti e, rispettivamente, per 4 minuti, a parità di trattamento termico a 65°C.

4.1.1 *Listeria, Salmonella e Staphylococcus*

Si registrano quasi gli stessi valori di riduzione decimale tra il 1° e il 2° trattamento dove è stata eseguita rispettivamente la sonicazione per 2 minuti vs sonicazione per 4 minuti entrambi a 65°C (figura 4.1 e figura 4.2).

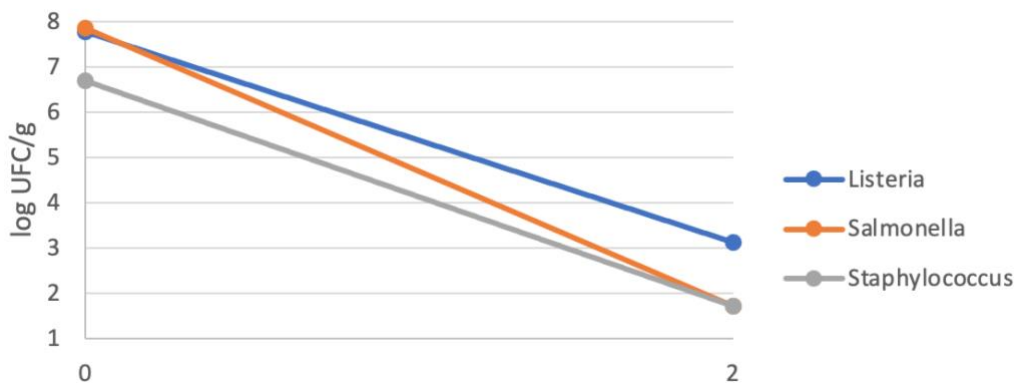


Figura 4.1: grafico che rappresenta l'effetto battericida del trattamento 1 eseguito a 65°C con 2' di sonicazione a 40W.

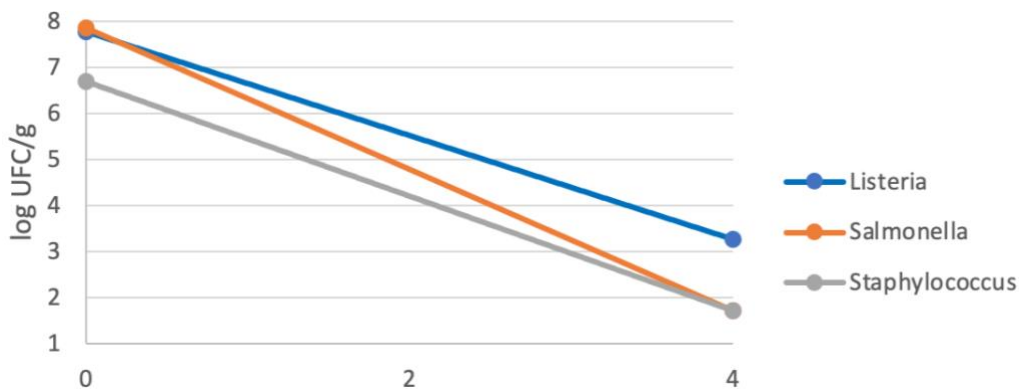


Figura 4.2: grafico che rappresenta l'effetto battericida del trattamento 2 eseguito a 65°C con 4' di sonicazione a 40W.

L. monocytogenes ha fatto registrare una riduzione di oltre 4 gradi logaritmici; per *Salmonella enterica* la riduzione decimale è pari a oltre 6 logaritmi; per *S. aureus* la riduzione decimale registrata è di 5 logaritmi. In sintesi, quindi, i due trattamenti hanno fatto segnare effetti battericidi praticamente identici.

4.1.2 *Bacillus cereus* e *Clostridium sporogenes*

Anche per quanto riguarda *B. cereus* e *C. sporogenes* le prove sono state condotte a uguale temperatura di pastorizzazione (65°C) a uguale potenza di sonicazione (40 W) ma per tempi di sonicazione differenti, il primo di 2 minuti e il secondo di 4 minuti (figura 4.3 e 4.4). Le forme vegetative di *B. cereus* nel primo trattamento (2 minuti di sonicazione) si riducono di circa 1,3 logaritmi; le stesse forme vegetative nel secondo trattamento (4 minuti di sonicazione) si riducono di 0,9 logaritmi.

Per quanto riguarda le spore di *B. cereus*, l'effetto dei due trattamenti è di circa 0,3 logaritmi.

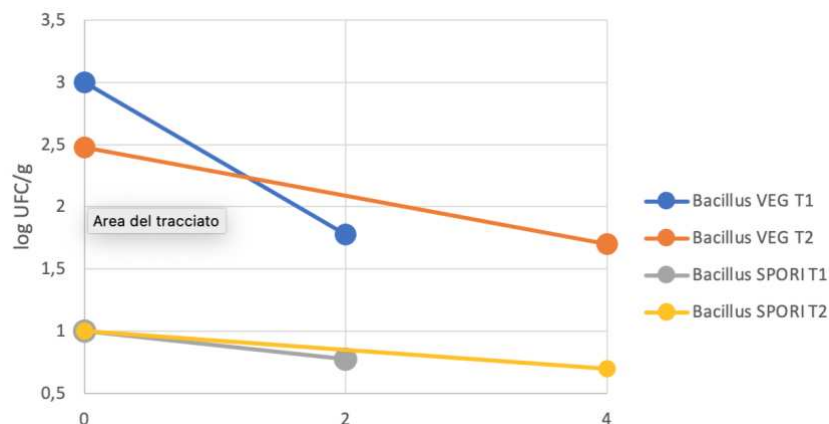


Figura 4.3: grafico che rappresenta l'effetto battericida del trattamento 1 (T1) su *Bacillus cereus* in forma vegetativa (VEG) e in forma sporale (SPORI) eseguito a 65°C con 2' di sonicazione a 40W, e del trattamento 2 (T2) eseguito a 65°C con 4' di sonicazione a 40W.

Per quanto riguarda le forme vegetative di *C. sporogenes* (stesse condizioni di trattamento sopra indicate) il trattamento di sonicazione per 2 minuti produce una riduzione della carica iniziale di circa 1,1 logaritmi; valori praticamente analoghi di riduzione li registriamo per il secondo trattamento (4 minuti di sonicazione).

Per quanto riguarda le spore di *C. sporogenes*, la riduzione ottenuta nei due trattamenti è di poco più o poco meno di 0,5 logaritmi.

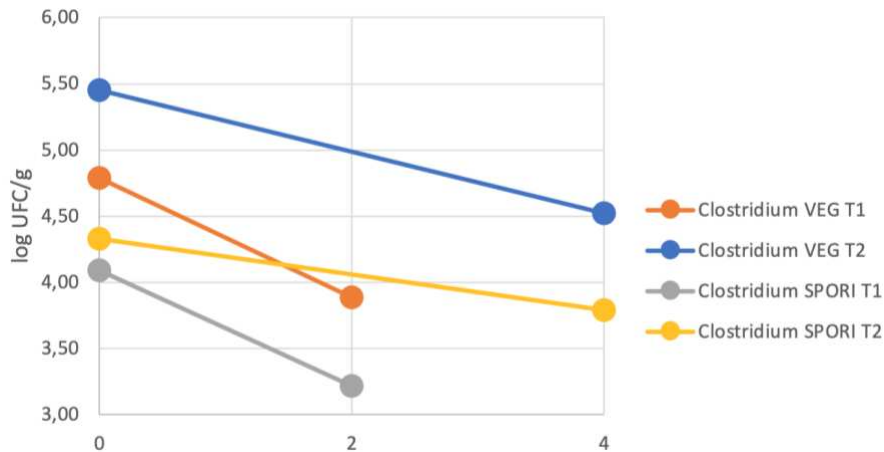


Figura 4.4: grafico che rappresenta l'effetto battericida del trattamento 1 (T1) su *Clostridium sporogenes* in forma vegetativa (VEG) e in forma sporale (SPORI) eseguito a 65°C con 2' di sonicazione a 40W, e del trattamento 2 (T2) eseguito a 65°C con 4' di sonicazione a 40W.

In sintesi, quindi, possiamo dire che gli effetti battericidi dei due trattamenti messi a confronto (2 minuti vs. 4 minuti) sono praticamente uguali.

4.1.3 *Listeria monocytogenes*

Infine, abbiamo condotto prove di *challenge test* con la sola *L. monocytogenes* per valutare su di essa gli effetti battericidi svolti separatamente dal trattamento termico vs. la sola sonicazione (figura 4.5).

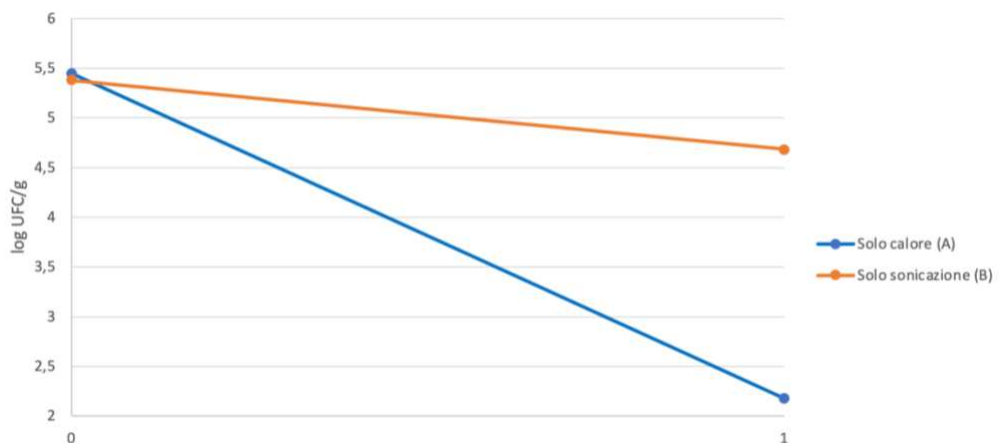


Figura 4.5: grafico che rappresenta l'effetto di due trattamenti diversi. Trattamento A eseguito a temperatura di 65°C per 1" (no sonicazione), trattamento B eseguito con sonicazione per 2' a 40W (no trattamento termico).

Con il solo trattamento termico a 65°C per 1 minuti, abbiamo registrato una riduzione della carica iniziale di circa 3,3 logaritmi.

Con il solo trattamento di sonicazione (condotto a 40 W per 2 minuti a temperatura di circa 30°C) abbiamo registrato una riduzione della carica batterica iniziale di circa 0,6 logaritmi.

4.2 Reologia

4.2.1 Analisi d'immagine

In una prima fase del lavoro di ricerca si sono studiati gli effetti della temperatura di pastorizzazione sulla struttura della miscela. In particolare, i campioni sottoposti a questa prima analisi sono stati:

1. Campione trattato a 65 °C per 5 min, osservato al microscopio al tempo iniziale, T₀: 65° 5min T₀;
2. Campione trattato a 65 °C per 30 min e osservato a T₀: 65° 30min T₀;
3. Campione trattato a 85 °C per 5 min e osservato a T₀: 85° 5min T₀.

Come si evince dalla figura 4.6, i tre trattamenti termici modificano la struttura della matrice (emulsione); in particolare, il campione 85° 5minT₀ presenta *droplets* di varie dimensioni rispetto al campione 65° 5minT₀ che si presenta più uniforme e diverso dal campione 65° 30minT₀.

In molte applicazioni pratiche alimentari è importante sottoporre le emulsioni a trattamenti termici, come cottura, sterilizzazione e pastorizzazione. Le emulsioni stabilizzate da una componente proteica, come quelle del latte, sono particolarmente sensibili al trattamento termico, in quanto le catene polipeptidiche si svolgono (*unfold*) quando la temperatura supera un certo valore critico, esponendo i gruppi reattivi, localizzati, in origine, al loro interno (gruppi apolari, gruppi tiolici). Questi gruppi chimici reattivi aumentano le interazioni attrattive tra le proteine adsorbite sullo stesso globulo o su globuli diversi, rendendo l'emulsione più soggetta alla flocculazione e alla coalescenza dei globuli di grasso.

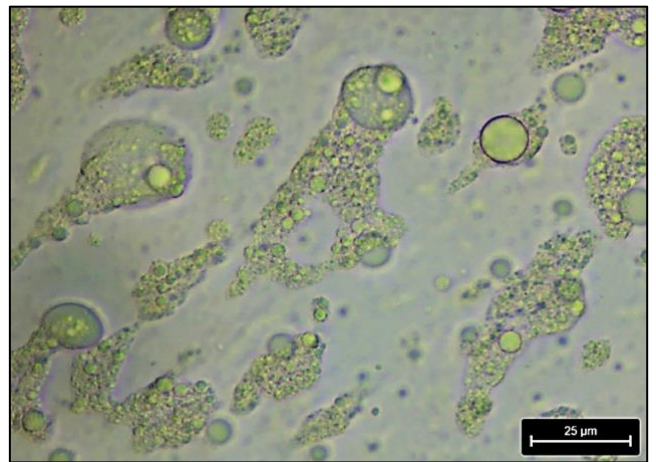
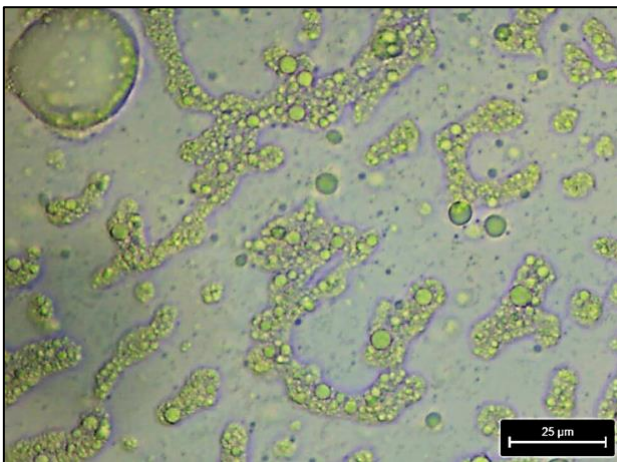
A temperatura ambiente, le proteine del latte, tra cui le β-lattoglobuline, che stabilizzano le emulsioni (a pH 7) e si adsorbono all'interfaccia, risultano più stabili alla flocculazione a causa delle repulsioni elettrostatiche tra i globuli. A temperature relativamente basse

(<65°C), la flocculazione dei globuli è dovuta alla denaturazione superficiale delle proteine globulari dopo l'adsorbimento. Quando le proteine del latte, che stabilizzano le emulsioni, subiscono un trattamento termico con temperature al di sopra della soglia di denaturazione (circa 70 °C), lo svolgimento della catena proteica avviene più velocemente con conseguente flocculazione delle emulsioni. L'entità del fenomeno della flocculazione e la struttura degli aggregati, che si formano quando le proteine del siero del latte vengono sottoposte a processo termico (55-95 °C) (0-2 ore), dipende dal binomio tempo/temperatura e dalla percentuale di proteine non adsorbite.

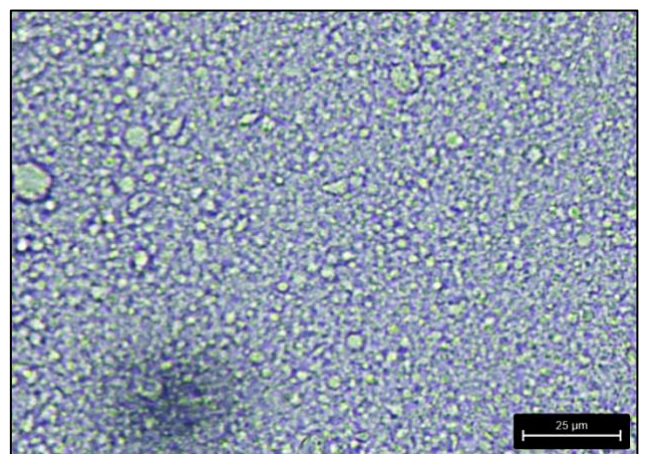
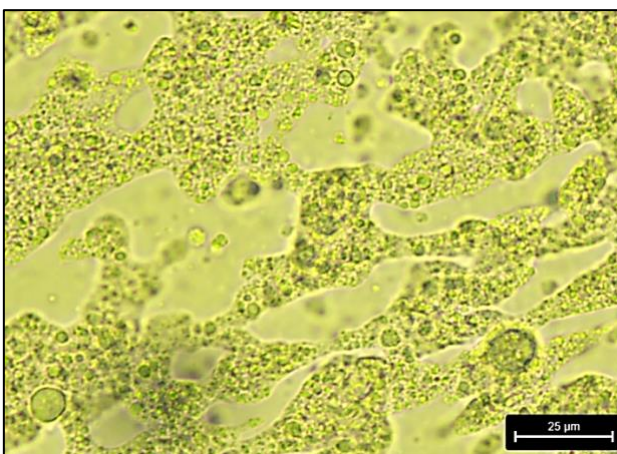
Tempo iniziale T0

Dopo 24 ore a 4 °C

65 °C 5 min di trattamento



65 °C 2 min di trattamento



Tempo iniziale T0

Dopo 24 ore a 4 °C

65 °C 30 min di trattamento

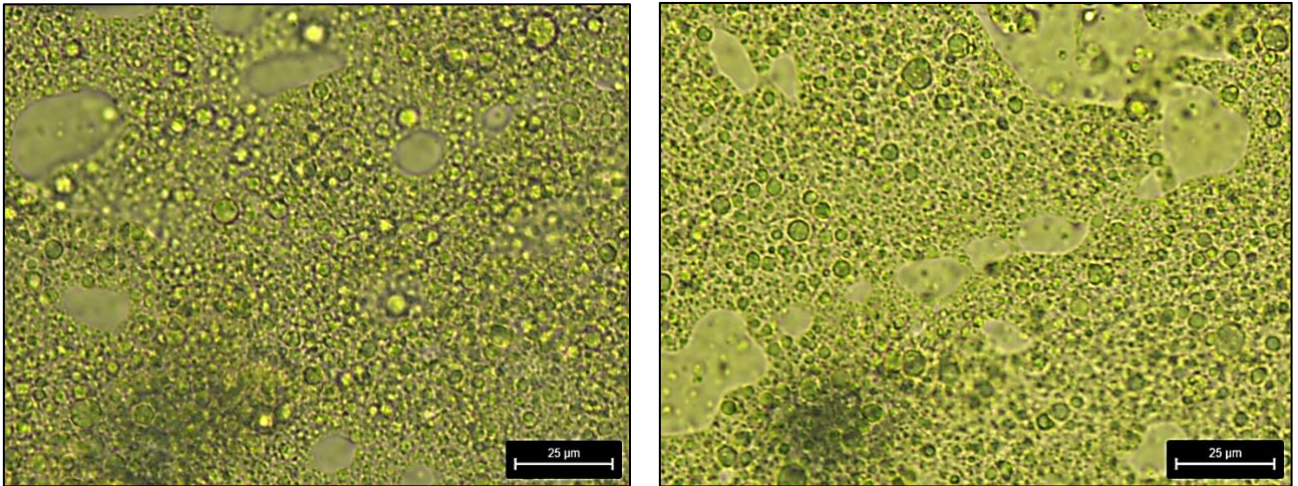


Figura 4.6: le 6 foto rappresentano emulsioni ottenute con diversi trattamenti termici osservati al tempo iniziale T0 e dopo 24 ore a 4 °C.

Tempo e temperatura di trattamento termico sono parametri cruciali nel controllo del fenomeno di flocculazione delle emulsioni e quindi della loro stabilità.

L'aumento di temperatura modifica la viscosità delle emulsioni rendendole meno viscoso e favorendo la coalescenza; la temperatura influisce sulla cinetica di adsorbimento.

Come riportato in figura (vedi emulsioni), dopo 24 ore a 4 °C la struttura delle emulsioni non cambia rispetto all'inizio del trattamento, almeno in maniera apparente.

Si è deciso di continuare la sperimentazione adottando il binomio tempo temperatura 2min/65 °C su tutti i campioni sottoposti rispettivamente ad omogeneizzazione e cavitazione e le emulsioni osservate al tempo iniziale T0 e dopo 24 ore, per evidenziare fenomeni di instabilità.

In particolare, i campioni analizzati sono i seguenti:

- Campione omogeneizzato a 150 bar², a t0 e T24;
- Campione omogeneizzato a 250 bar, a t0 e T24;
- Campione sonicato a 40 W per 2 min durante il trattamento termico a t0 e T24.

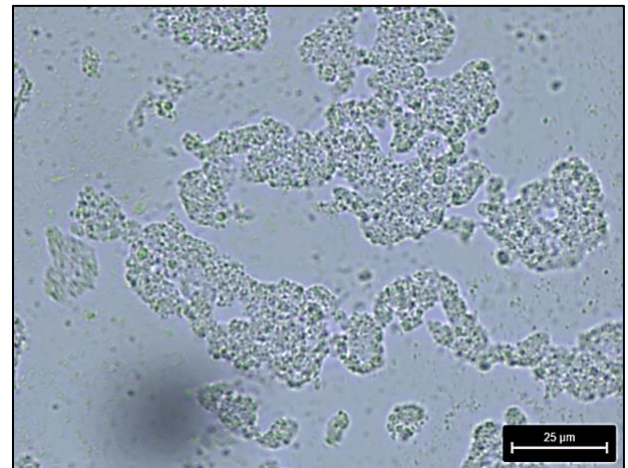
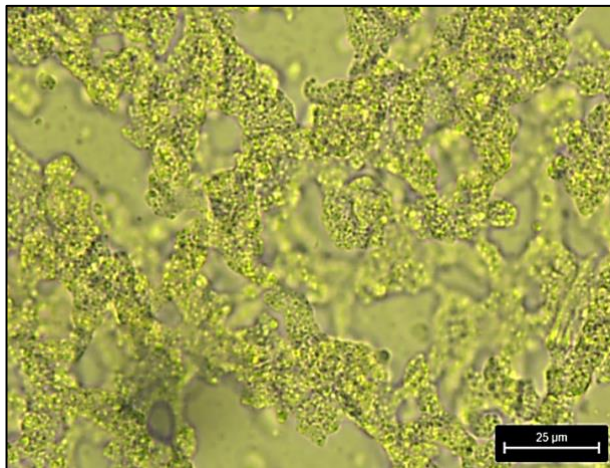
Come si evince dalla figura 20, i campioni trattati con l'omogeneizzatore a 150 e 250 bar presentano droplets di piccolissime dimensioni e, apparentemente, rimangono invariate in termini di forma e dimensione anche dopo 24 ore a 4 °C. A 250 bar la trama dell'emulsione risulta ancora più fine, forse proprio per la maggiore pressione utilizzata

per diminuire la dimensione delle *droplets*. Anche la sonicazione a 22 Khertz e 40 W riduce la dimensione dei globuli di grasso, anche se, dalla figura, si può vedere una grana leggermente più eterogenea rispetto a quella ottenuta con l'omogeneizzatore. Le emulsioni omogeneizzate e sonicate presentano in tutti i casi *droplets* più piccole e più omogenee se confrontate con quelle ottenute solo con i trattamenti termici, sopra riportati. Per rendere più oggettivo l'effetto dei parametri tempo/temperatura, al tempo iniziale e dopo 24 ore, i campioni sono stati digitalizzati per mezzo del software ZEISS e le dimensioni dei globuli analizzati statisticamente.

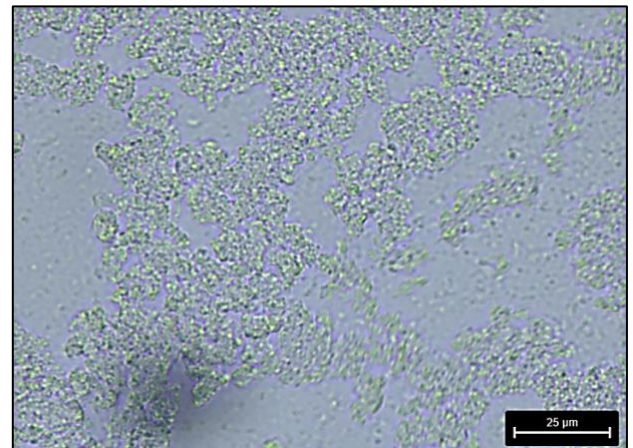
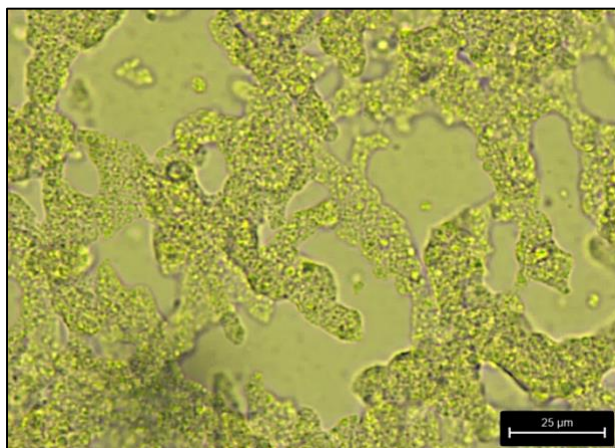
Tempo iniziale T0

Dopo 24 ore a 4 °C

Omogeneizzazione a 150 bar



Omogeneizzazione a 250 bar



Tempo iniziale T0

Dopo 24 ore a 4 °C

Sonicazione a 40 W

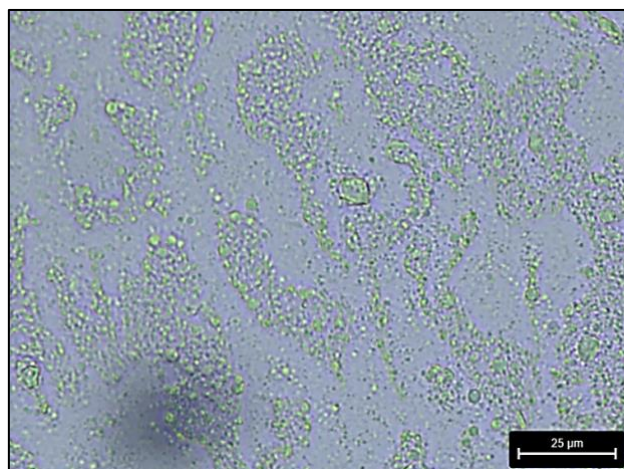
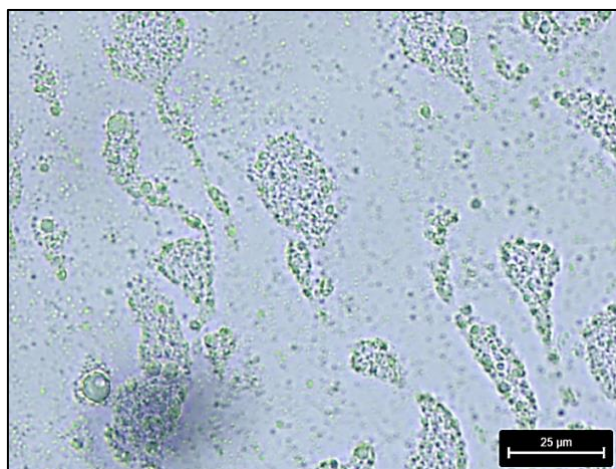


Figure 4.7: Emulsioni ottenute con diversi trattamenti di omogeneizzazione e sonicazione, osservati al tempo iniziale T0 e dopo 24 ore a 4 °C.

Il grafico, riportato qui sotto (figura 4.8), mostra i valori medi dei diametri delle *droplets* ottenuti con i vari trattamenti. Come si evince dal grafico, il diametro delle *droplets* oscilla tra 1 e 2,25 μm ; il mixer, ottenuto col minipimmer e prima di ogni trattamento, risulta con *droplets* dal diametro statisticamente più elevato (2,2 μm). I trattamenti termici a 65 °C mostrano globuli con diametri diversi a seconda della durata del trattamento; in particolare a 2 min risultano più piccoli che a 30 min. Tuttavia, a T1, gli stessi campioni mostrano variazioni nelle dimensioni dei globuli; in particolare, il campione 65°C2mint1 presenta diametri più grandi rispetto allo stesso campione al T0, mentre 65°C30mint1 presenta diametri di dimensioni minori rispetto al t0. In quest'ultimo caso la presenza di *droplets* più piccole potrebbe essere attribuita alla formazione di globuli più grandi dovuta alla maturazione di Oswald e all'ingrandimento dei diametri di quelli più piccoli, avvenuta nelle prime 24 ore. In questo caso viene quindi evidenziato un comportamento piuttosto dinamico delle emulsioni che porta ad un ingrandimento delle *droplets*, segno di instabilità.

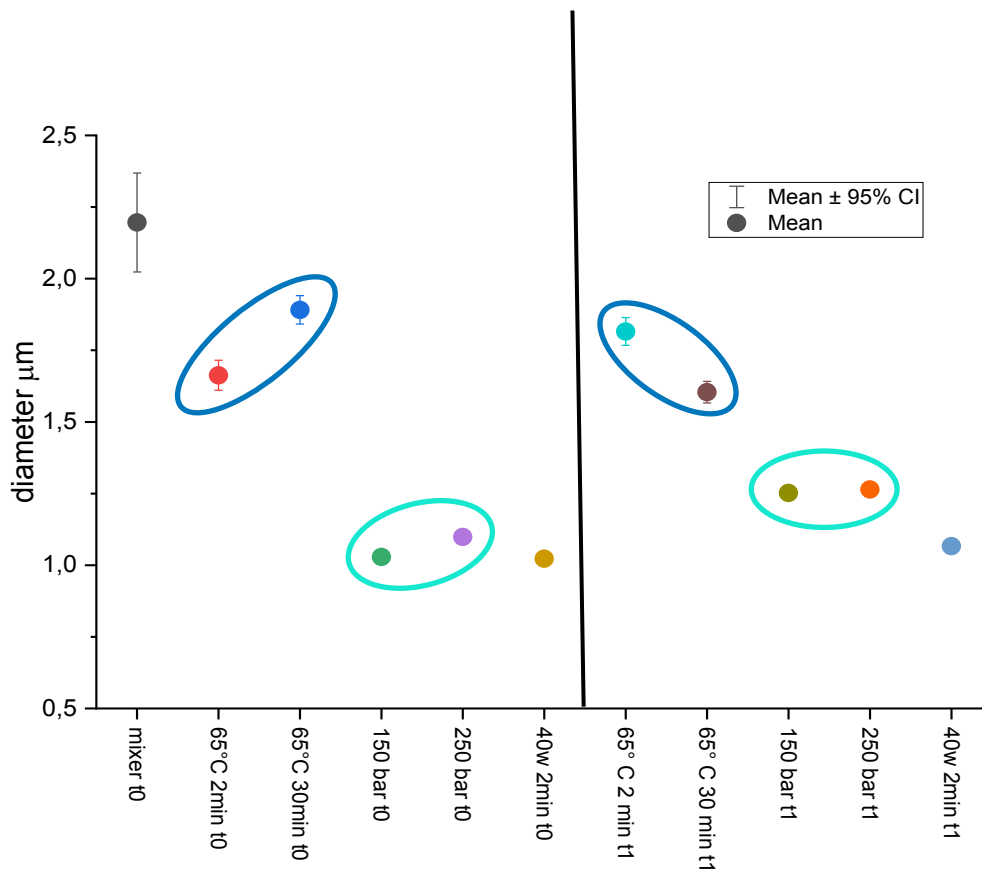


Figura 4.8: Rappresentazione grafica e Tuckey test eseguiti sulla misura dei diametri delle droplets delle emulsioni ottenuti come riportato in ascissa, al T0 e T1 (dopo 24 ore a 4 °C).

Al contrario, le emulsioni omogeneizzate a 150 bar e 250 bar presentano diametri di più piccole dimensioni e più simili tra loro. Dopo 24 ore, gli stessi campioni presentano *droplets* dal diametro leggermente più grande e risultano statisticamente molto simili. In questo caso, il trattamento con l'omogeneizzatore, oltre a ridurre le dimensioni dei diametri, conferisce maggiore stabilità alle emulsioni rispetto ai campioni trattati solo termicamente.

Il trattamento con la sonicazione merita una considerazione a parte; infatti, il campione trattato a 40 W presenta al t0 diametri statisticamente simili al campione trattato a 150 bar con l'omogeneizzazione; inoltre, dopo 24 ore, il campione sonicato risulta molto simile a quello iniziale, contrariamente a quanto osservato in tutti gli altri campioni. Attraverso l'analisi d'immagine, la sua digitalizzazione e lo studio dei diametri delle emulsioni si può affermare che la sonicazione produca *droplets* molto simili al campione sottoposto a omogeneizzazione a 150 bar e che risulta più stabile nel tempo.

È stata studiata la forma delle distribuzioni ottenuta misurando i diametri delle *droplets*, per evidenziare la variabilità, segno di instabilità. Come si evince dal grafico, la curva del mixer si presenta molto appiattita e dalla base ampia, indice di elevata variabilità del dato; ciò significa che nell'emulsione del mixer coesistono *droplets* grandi e piccole. Anche le distribuzioni dei campioni trattati solo termicamente (65°C2mint0 e 65°C30mint0) si presentano appiattite e con una base ampia, anche in questo caso, segno di variabilità e di instabilità. La forma delle curve si mantiene pressoché invariata per il campione 65°C2mint1, dopo 24 ore, mentre il campione 65°C30mint1 presenta valori più concentrati attorno al valore medio, riducendo l'ampiezza della curva. Come osservato sopra, in questa emulsione le *droplets* più grandi si potrebbero essere accresciute in seguito alla maturazione di Oswald e poi scoppiate, lasciando in evidenza quelle più piccole.

I campioni trattati con l'omogeneizzatore, a prescindere dalla pressione adottata, presentano distribuzioni concentrate attorno al valore medio e dall'ampiezza molto ridotta. La forma di queste due distribuzioni (150bart0 e 250bart0) viene mantenuta più o meno invariata anche dopo 24 ore (150bart1 e 250bart1), segno di stabilità. Infine, il campione sonicato a 40 W sia a t0 che a t1 presenta distribuzioni pressoché invariate e con valore medio più basso se confrontato con le altre distribuzioni (figura 4.9).

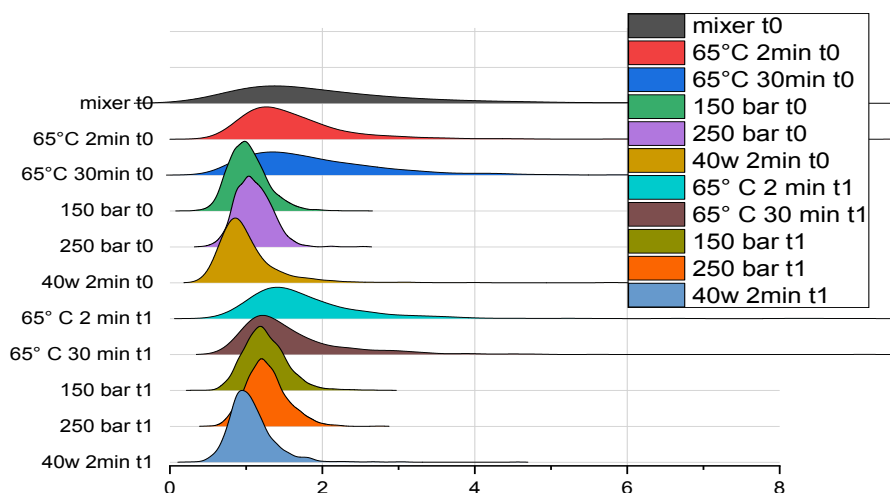


Figura 4.9: Distribuzione delle misure dei diametri delle *droplets* appartenenti alle emulsioni sottoposte ai vari trattamenti.

In generale, le emulsioni esibiscono vari comportamenti che dipendono dalla composizione del mix, dalla loro struttura e dalle interazioni tra *droplets*. Questi elementi determinano il comportamento reologico dei fluidi che possono risultare viscosi e/o viscoelastici. (Waltra 2003; McClemens 2005a). La reologia delle emulsioni diluite viene espressa spesso in termini del parametro “*shear viscosity*” (forza di taglio), determinata in primis dalla viscosità della fase continua (η_c), dalla concentrazione delle *droplets* (Φ) e dalla natura delle interazioni *droplets-droplets* (w) (McClemens 2005):

$$\eta = \eta_c \mathbf{f}(\Phi, w)$$

La viscosità di un'emulsione tende ad aumentare con la concentrazione delle *droplets* e, oltre un certo valore, essa esibisce caratteristiche simil-solido come la viscoelasticità e la plasticità (McClemens 2005a). La viscosità dipende dalla natura delle interazioni tra le *droplets* presenti nel sistema; essa diminuisce a causa di forti interazioni repulsive ed attrattive (McClemens 2005). La viscosità di un'emulsione tende ad aumentare quando le *droplets* sono flocculate in quanto la loro concentrazione aumenta e la fase continua è intrappolata nella struttura “*floc*”. Inoltre, il comportamento “*shear thinning*” si osserva nella fase flocculata a causa della deformazione e della rottura della struttura stessa all'aumentare dello shear stress.

L'impatto delle caratteristiche delle *droplets* sul comportamento reologico dell'emulsione assume una certa importanza a seconda della tipologia di alimento. Alcuni alimenti sono caratterizzati da bassa viscosità, come le bevande e le *droplets* non influenzano la viscosità; altri alimenti, invece, sono altamente viscosi, come i condimenti e i dessert e le loro *droplets* conferiscono viscosità, oltre a concorrere alla formazione del gel.

Nelle emulsioni strutturate, le particelle presentano strutture piuttosto complesse, che possono influenzare la reologia di tutto il sistema. Per esempio, le *droplets* lipidiche possono essere immerse in una struttura polimerica (*filled hydrogel particles*) che causa l'aumento della viscosità.

I campioni di mix di gelato, trattati con diverse tecnologie fisiche, presentano curve reologiche caratteristiche quando sottoposti all'analisi per mezzo del reometro rotazionale. Le curve ottenute sono state interpolate con la funzione/modello di Carreau Yasuda (figura 4.10 e figura 4.11), in quanto si adatta al trend mostrando alti valori del coefficiente di regressione.

Il modello matematico è riportato di seguito:

$$\frac{\eta - \eta_{\infty}}{\eta_0 - \eta_{\infty}} = [1 + (k\dot{\gamma})^a]^{\frac{n-1}{a}}$$

Da cui si ricava la viscosità apparente:

$$\eta_{apparente} = \eta_{\infty} + \frac{\eta_0 - \eta_{\infty}}{1 + (\dot{\gamma}/\dot{\gamma}_c)^m}$$

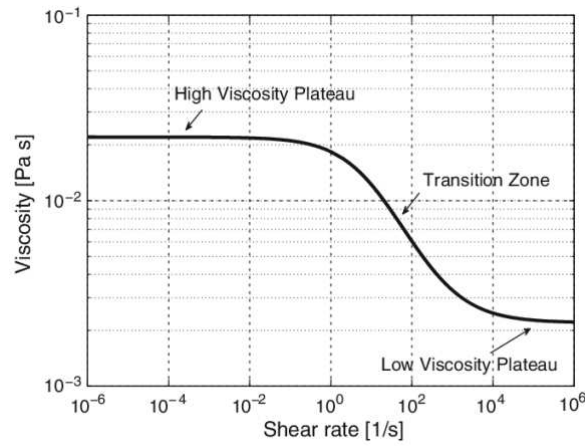


Figura 4.10: Modello Carreau Yasuda.

È stata applicata la versione del modello matematico proposto dal software Origin:

$$y = A_2 + (A_1 - A_2)[1 + (t.x)^a]^{\frac{n-1}{a}}$$

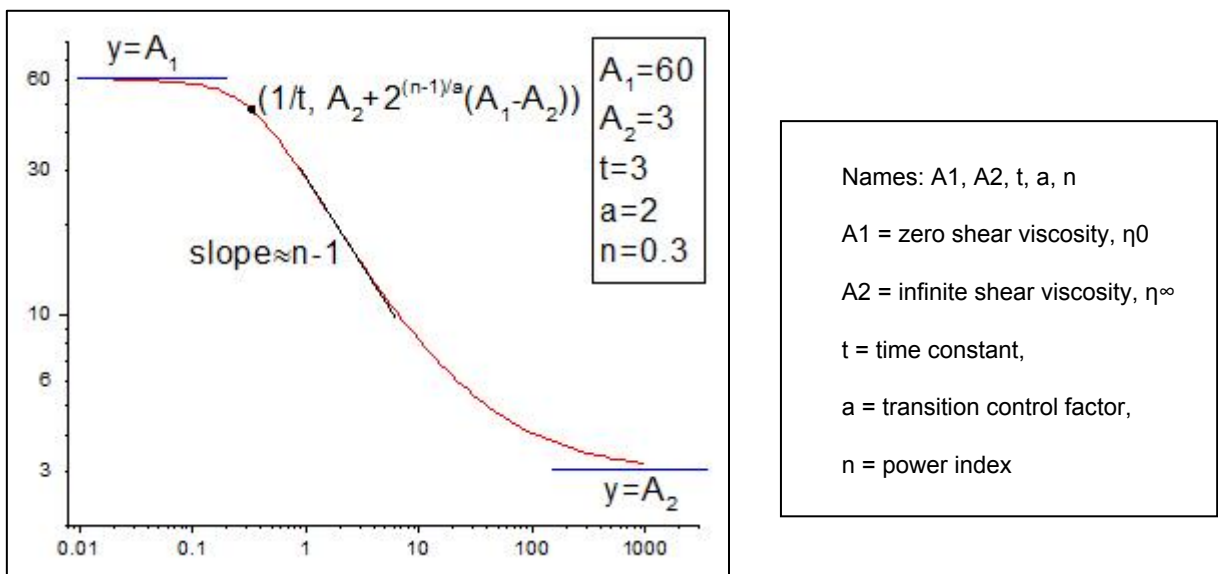


Figura 4.11: Modello Carreau Yasuda proposto dal software Origin.

Il seguente modello propone il comportamento delle droplets quando sottoposte allo shear:

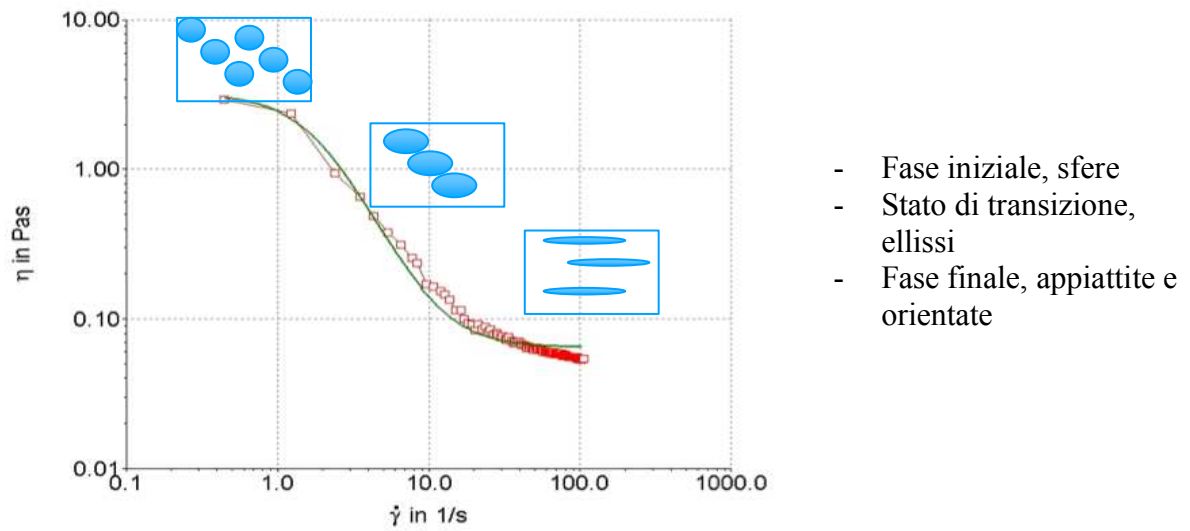


Figura 4.12: rappresentazione del comportamento delle droplets in base al livello di shear.

Le curve reologiche dei mix di gelato hanno mostrato questo comportamento, con differenze legate al trattamento subito, a parità di miscela iniziale.

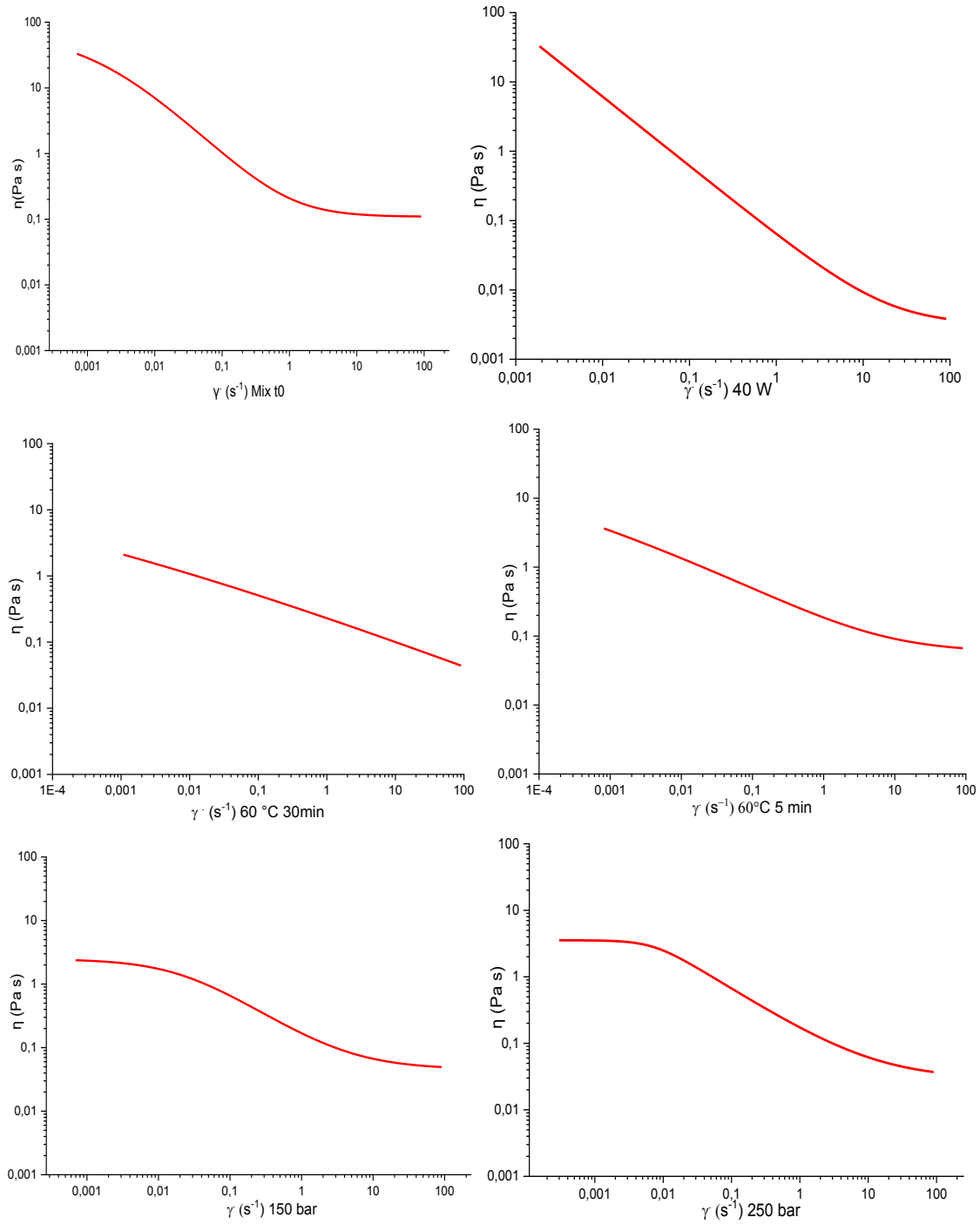


Figura 4.13: Curve reologiche, ottenute sui mix (modello Carreau Yasuda).

PARAMETRI	mix	60 °C30min	60 °C5min	40W US	150 bar	250 bar
A1	67.85±23.8	9.94±2.2	4.63±0.58	66.32±4.0	2.5±0.02	3.54±0.002
A2	0.11±0.1	0.002±0.0001	0.06±0.011	0.003±0.0	0.05±0.006	0.03±0.01
t	666.7±461.9	89188±8.9	599.84±120.8	1081.8±6.5	44.96±7.01	138.23±7.5
a	0.65±0.3	39.15±2.1	0.71±0.16	47.35±1.4	0.86±0.04	1.89±0.13
n	0±0.22	0.666±0.012	0.42±0.05	0±0.06	0.22±0.04	0.35±0.02

Tabella 4.1: Parametri del modello di Carreau Yasuda calcolati sulle curve dei mix di gelato.

Come si evince dalla figura, che riporta i grafici e dalla tabella dei parametri del modello di Carreau Yasuda, il mix di gelato, trattato solo col miscelatore, senza trattamento termico, ha valori di A_1 (η_0) piuttosto elevati e ciò è dovuto alla presenza di *droplets* molto grandi, come riportato in precedenza e flocculate; quindi, strettamente concentrate ed addensate tra di loro come indicato dal valore t (666.69).

I campioni trattati termicamente a 60 °C per 30 min e 5 min presentano valori bassi di A_1 , a indicare una dimensione piccola delle *droplets*; il valore t invece è molto diverso; infatti, dopo 30 min di trattamento termico risulta piuttosto elevato. Ciò potrebbe essere dovuto alla denaturazione termica delle proteine e alla loro gelificazione, fenomeni responsabili della maggiore consistenza del mix. Infatti, il campione ottenuto a parità di condizioni ma per soli 5 min di trattamento, presenta una consistenza minore.

Il campione trattato con cavitazione a 40 W merita una considerazione a parte; esso, oltre a presentare una curva reologica diversa dalle altre, mostra un valore di A_1 pari a 60 Pa e una consistenza piuttosto elevata ($t=1086$). I valori di questo parametro possono essere giustificati dalla presenza di *droplets* piccole (come evidenziato in precedenza dall'analisi d'immagine), unite da forze coesive dovute alla denaturazione termica delle proteine. L'alta temperatura, in sinergia con la cavitazione ha permesso la formazione di un network proteico e polisaccaridico molto coeso attorno alle *droplets*.

I campioni trattati con l'omogeneizzatore, al contrario, mostrano una tendenza e valori reologici molto simili tra di loro. Il campione trattato a 250 bar mostra una consistenza di poco superiore a quello sottoposto a 150 bar. In questi due campioni è evidente il comportamento reologico dovuto alla presenza di *droplets* di piccole dimensioni immerse in una struttura poco coesa (i valori di t sono bassi). Si può ipotizzare che la disgregazione indotta dall'omogeneizzatore sulle *droplets* non abbia permesso la formazione di un *network* di proteine e polisaccaridi attorno ad esse; la struttura risulta poco coesa e frantumata.

4.2.2 Studio dei parametri G' e G'' sui campioni di mix di gelato trattati con metodi fisici

I 6 mix di gelato sono stati sottoposti ad analisi reologica per studiarne il comportamento viscoelastico. Infatti, una struttura gelificata forte è indice di qualità del gelato, espressa in termini di cremosità, texture, overrun e resistenza al melting.

I grafici della figura 4.14 mostrano le curve del modulo G' (elastico) rispetto a quello viscoso G'' . Come mostrato in figura, le curve seguono tendenze diverse a seconda del mix; in particolare, il campione mixer, ottenuto semplicemente col minipimmer, presenta un comportamento elastico, anche se non così evidente, come pure il campione 65°C30min e quello omogeneizzato a 250 bar. Anche se si tratta di campioni trattati diversamente, prevale in tutti e tre i casi la caratteristica reologica della miscela di base; quindi, essi non risentono dell'azione fisica subita.

Il campione sonicato a 40W merita una considerazione a parte; infatti, il modulo elastico G' è superiore a quello viscoso G'' , evidenziando una struttura simil gel ed elastica della miscela ottenuta con l'effetto della cavitazione. Gli ultrasuoni applicati alla miscela, durante il processo di pastorizzazione a 65 °C hanno promosso la formazione di una matrice simil gel. È infatti ipotizzabile che la frantumazione fine delle droplets di grasso sia accompagnata dalla denaturazione termica e meccanica (promossa dalla cavitazione) delle proteine del latte, che migrano all'interfaccia creando strutture più stabili. Inoltre, la gelificazione dei polisaccaridi, operata dal calore, favorisce la formazione di un network elastico che ingloba le droplets di piccole dimensioni.

Al contrario, i due moduli del campione 65 °C5 min risultano quasi sovrapposti; in questo caso, il breve trattamento termico non ha promosso una gelificazione dei polisaccaridi e una denaturazione proteica tale da garantire una maggiore elasticità alla struttura.

Infine, a 150 bar il mix non evidenzia un comportamento elastico; probabilmente la disgregazione delle proteine e dei polisaccaridi del mix è responsabile della mancanza di elasticità.

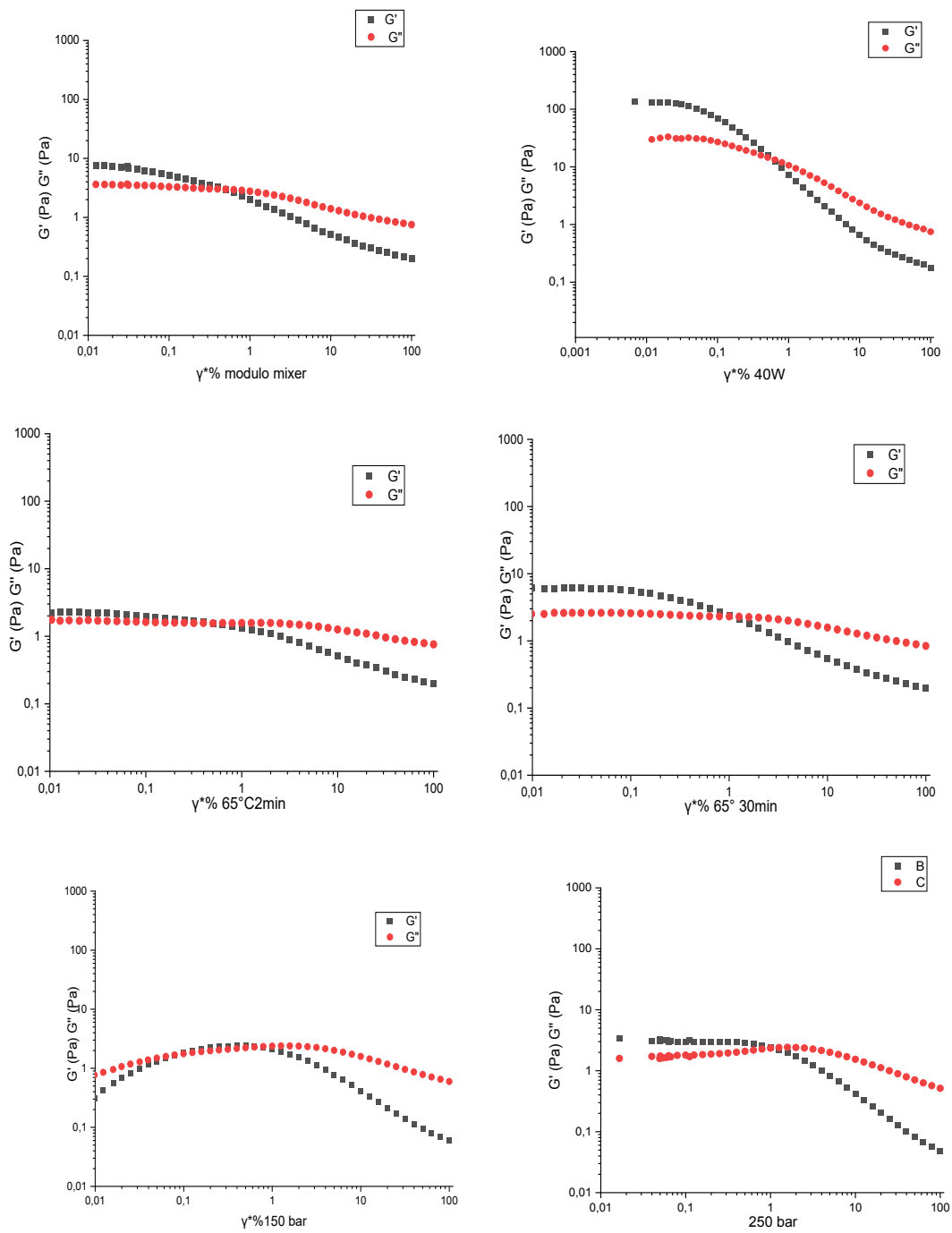


Figura 4.14: curve reologiche del modulo G' e G'' .

4.2.3 Analisi TPA sul gelato

I mix ottenuti, sono stati poi mantecati alla temperatura di $-9\text{ }^{\circ}\text{C}$ e trasformati così in gelato. I campioni di gelato sono stati sottoposti a TPA (texture profile analysis) analisi per studiare la texture del campione solido. I parametri considerati sono: durezza, coesività, spalmabilità e forza di estrusione. I campioni sono: omogeneizzati a 150 bar, 250 bar, sonicati a 40W e infine il campione che ha subito il trattamento termico a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti, che in questo caso corrisponde al controllo.

La durezza di un gelato dipende dai fattori sotto riportati:



Durezza del gelato: analisi con la sonda a sfera

Nella figura 4.15 sono riportati i valori medi del parametro “durezza” ottenuto con l’applicazione della sfera; come si evince dalla figura, i due campioni che presentano valori più alti sono il controllo e 40W. Osservando i parametri reologici del modello Carreau Yasuda si osserva che questi due campioni hanno anche i valori di consistenza t più elevati (rispettivamente: 599 e 1081). Anche se sono molteplici i fattori responsabili della durezza, in questo caso si può affermare che se il mix iniziale ha una struttura più coesa anche il gelato presenterà una matrice più dura. Al contrario, i campioni omogeneizzati, anche se con differenze significative, mostrano valori di durezza più bassi. In particolare, il campione 150 bar si presenta più morbido e la struttura del mix iniziale poco coesa (parametri modello Carreau Yasuda, vedi tabella 4.1), Il campione 250 bar mostra invece valori di durezza superiore a 150 bar e un indice di coesione del mix iniziale leggermente più alto (vedi tabella 4.1 Carreau Yasuda).

Visto che si è osservata una certa corrispondenza tra i valori medi di durezza del gelato e la coesività del mix, si è voluto osservare il parametro adesività del gelato per mezzo della reologia solida.

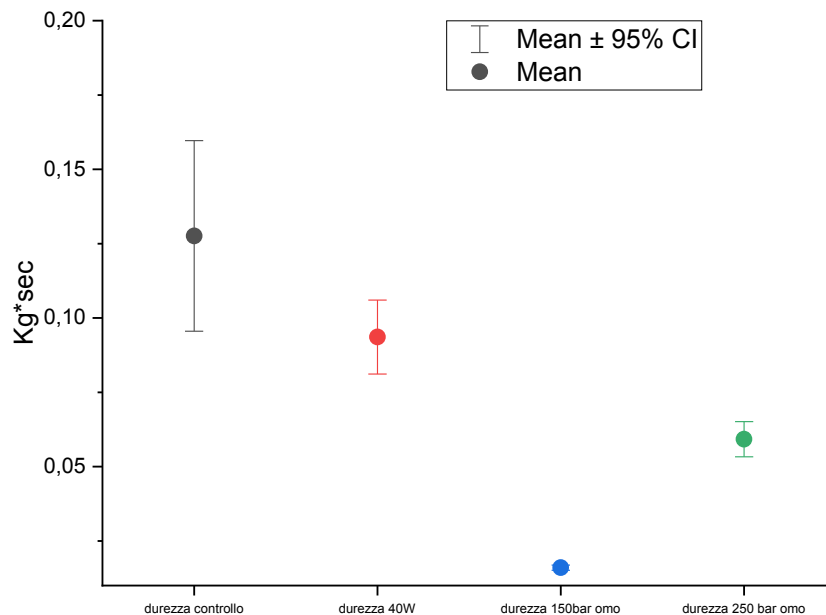


Figura 4.15: grafico che rappresenta i valori medi del parametro durezza valutato con sonda a sfera.

Adesività del gelato

Il grafico in figura 4.16 mostra il parametro “adesività” misurato sui 4 campioni di gelato, mantenuti alla temperatura di -5 °C. In questo caso, più negativo è il valore e più elevato è l’intensità del parametro.

Come si evince dalla figura, il controllo si presenta meno adesivo degli altri campioni; il campione di gelato sonicato a 40W presenta valori elevati di adesività e questo comportamento può essere attribuito alla dimensione piccola delle *droplets*.

Ancora più adesivi sono i campioni omogeneizzati, a prescindere dalla pressione di esercizio. Questo parametro oltre ad essere legato a forze interne alla matrice del gelato, sembrerebbe giustificato dalla dimensione delle *droplets*: più piccole sono e più adesivo risulta il campione. Il parametro può essere legato anche ad altre caratteristiche e non sempre un campione di gelato adesivo viene considerato di qualità in quanto tende a aderire alle superfici di stoccaggio del prodotto e agli strumenti per il porzionamento.

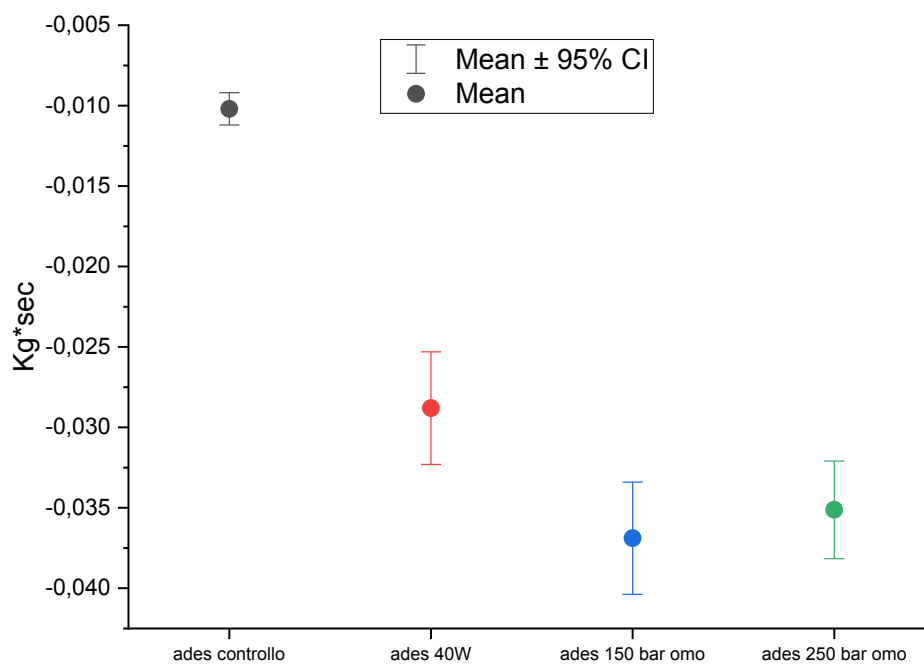


Figura 4.16: grafico che rappresenta il parametro “adesività”

Spalmabilità del gelato

La spalmabilità è una caratteristica positiva per un gelato, infatti permette diverse operazioni pratiche sul prodotto finito (porzionatura, lavorazione sul prodotto solido).

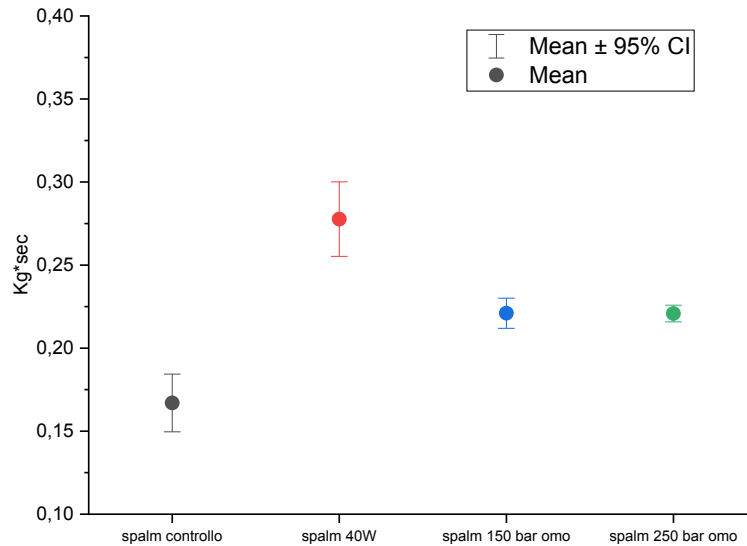


Figura 4.17: grafico che rappresenta il parametro spalmabilità

Come si evince dal grafico in figura 4.17, il controllo ha un valore medio di spalmabilità statisticamente inferiore rispetto agli altri campioni; al contrario, il campione di gelato ottenuto con la cavitazione ha una spalmabilità più elevata, forse dovuta alla compresenza di *droplets* dalle dimensioni ridotte e una migliore gelificazione e denaturazione della componente polisaccaridica e proteica. I campioni di gelato ottenuti con l'omogeneizzazione del mix presentano una spalmabilità intermedia tra il campione controllo e quello sonicato.

Estrusione del gelato

“L’estrusione” è un’analisi reologica del gelato che prevede il passaggio del prodotto attraverso un tubo o un orifizio quando viene applicata una forza. È un parametro importante perché fa parte della lavorabilità del gelato ed è legato alle caratteristiche fisiche della matrice: dimensione delle droplets, coesività, fluidità, adesività e durezza.

Come riportato dal grafico in figura 4.18, i campioni analizzati in base al carattere “estrusione, oltre ad evidenziare una notevole variabilità attorno ai valori medi non mettono in luce alcuna differenza statistica. I campioni, sotto questo aspetto, risultano simili.

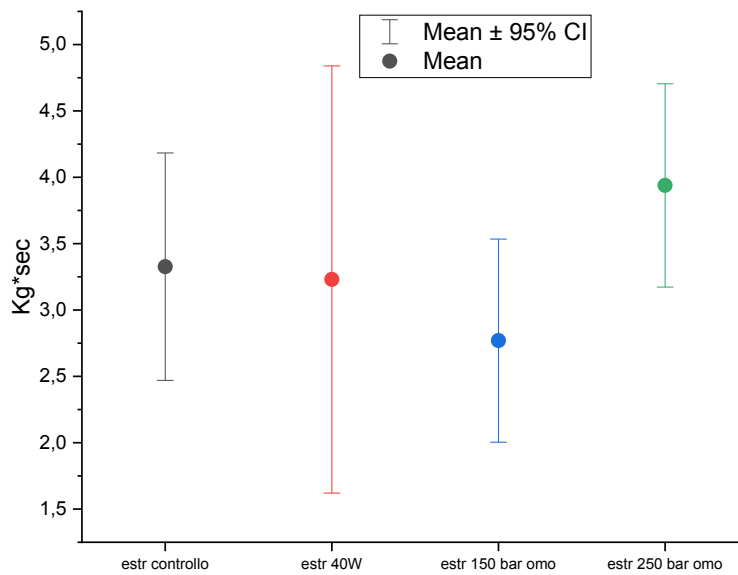


Figura 4.18: Grafico che riporta i valori medi e la deviazione standard della forza di estrusione dei gelati, oggetto di studio.

5. CONCLUSIONI

Questa ricerca ha permesso di mettere in luce alcune differenze strutturali nelle matrici di gelato sottoposte a diversi trattamenti fisici quali il calore, la sonicazione e l'omogeneizzazione a diverse potenze. Da questa indagine scientifica si possono trarre le seguenti conclusioni:

- a) Le matrici di gelato, pastorizzate per tempi diversi mostrano differenze significative in termini di dimensione e disproporzionamento dei globuli di grasso. In particolare, il trattamento prolungato genera globuli più grandi ed instabili dovuto all'effetto del calore sulla viscosità dei lipidi. Nelle condizioni prolungate di alta temperatura, la coalescenza dei globuli di grasso viene favorita con formazione di *droplets* di dimensioni più grandi che tendono a flocculare.
- b) L'omogeneizzazione disgrega i globuli di grasso rendendoli tanto più piccoli quanto più è elevata la pressione utilizzata. La matrice del gelato si presenta "omogenea" senza formazione di aggregati.
- c) Con l'applicazione del sonicatore a 40 W e 22Kh, la matrice di gelato risulta dalla grana molto fine. I globuli sono di piccole dimensioni, paragonabili a quelli ottenuti con l'omogeneizzatore. Tuttavia, si nota una differenza legata alla presenza di strutture di aggregazione all'interno della matrice che appare più coesa.
- d) Il comportamento reologico delle miscele del gelato ha confermato quanto osservato al microscopio relativamente alla struttura dei globuli. In particolare, le miscele omogeneizzate manifestano lo stesso comportamento reologico, a prescindere dalla pressione applicata; i modelli matematici evidenziano un'elevata fluidità della matrice. La miscela sonicata, invece, manifesta una certa resistenza alla forza rotazionale probabilmente dovuta alla presenza di aggregati colloidali che inglobano i globuli di grasso di piccole dimensioni rendendo la matrice più coesa. Le miscele ottenute col trattamento termico, infine, presentano differenze essenzialmente legate alla dimensione dei globuli: l'alta temperatura prolungata genera globuli più grandi che rendono la matrice meno fluida.
- e) L'analisi reologica sui gelati mette in luce alcune caratteristiche dovute ai trattamenti fisici sulle miscele. I gelati omogeneizzati risultano meno duri come conseguenza dell'effetto disgregante della pressione sulla matrice di gelato, che

risulta più destrutturata; al contrario, il controllo e il gelato sonicato sono più duri e coesi. I gelati omogeneizzati, inoltre sono più adesivi rispetto al campione sonicato che risulta anche il più “spalmabile”.

- f) Si può concludere che il campione sonicato presenta caratteristiche strutturali ottimali in termini di dimensione delle *droplets* e della struttura.

Per quanto riguarda le analisi microbiologiche, dall’insieme dei risultati ottenuti possiamo concludere, in prima istanza, che:

- a) con il solo trattamento di sonicazione si ottiene una riduzione della carica di *L. monocytogenes* limitato, ma comunque presente, rispetto al solo trattamento termico (0,6 log vs. 1,1 log);
- b) associando lo stesso trattamento termico con la sonicazione, rileviamo che non si riscontrano differenze significative tra un processo di 2 minuti vs. uno di 4 minuti;
- c) associando il trattamento termico con la sonicazione si ottengono riduzioni molto marcate per *Salmonella enterica* (riduzione di 6 log) e di *S. aureus* (5 log), mentre la riduzione ottenuta è leggermente inferiore per *L. monocytogenes* (4 log);
- d) in ogni caso si arriva alla conclusione che associando al trattamento termico la sonicazione, gli effetti battericidi che otteniamo sono comunque molto efficaci nei confronti di *Salmonella enterica*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*;
- e) le forme vegetative di *B. cereus* e *C. sporogenes* vengono abbattute dalla sonicazione+trattamento termico di circa 1 log;
- f) gli effetti del trattamento di sonicazione associato alla pastorizzazione sono, invece, molto modesti, stimabili in circa 0,5 log.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adesso, K.M. and Kleyn, D.H. (1986). "Development of an acceptable ice cream possessing a reduced sodium content". *J. Food Sci.*, 51, 1467–70.
- Alamprese, C., Pompei, C., & Rossi, M. (2008). "The influence of freezing parameters on ice cream structure and quality". *Journal of Food Engineering*, 88(3), 351-359.
- Aswathanarayan, J. B., & Vittal, R. R. (2019). "Nanoemulsions and their potential applications in food industry". *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 95.
- Awad T.S., Moharram H.A., Shaltout O.E., Asker D., Youssef M.M., (2012). "Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: a review", *Food Res. Int.* 48 410–427.
- Barba, A. A., d'Amore, M., Lamberto, I., & Palermo, A. M. (2015). "High-intensity ultrasound for the production of innovative food products". *Food Engineering Reviews*, 7(3), 1-15.
- Behrend, O., Ax, K., & Schubert, H. (2000). "Influence of continuous phase viscosity on emulsification by ultrasound". *Ultrasonics Sonochemistry*, 7(2), 77-85.
- Berger KG, Bullimore BK, White GW, Wright WB. (1972). "The structure of ice cream: part 1". *Dairy Ind* 37(8):419–25.
- Briars R., Paniwnyk L., (2013). "Effect of ultrasound on the extraction of artemisinin from *Artemisia annua*", *Ind. Crops Prod.* 42, 595–600.
- Caldwell KB, Goff HD, Stanley DW. (1992). "A low-temperature scanning electron-microscopy study of ice cream 1". *Techniques and general microstructure. Food Struct* 11(1):1–9.
- Chandrapala J., Oliver C., Kentish S., Ashokkumar M., (2012). "Ultrasonics in food processing", *Ultrason. Sonochem.* 19 975–983.
- Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., & Kentish, S. (2012). "Ultrasonication of dairy streams: A review". *International Dairy Journal*, 24(1), 1-15.
- Chemat F., Zill-e-Huma, Khan M.K., (2010). "Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction", *Ultrason. Sonochem.* 18 813–835.

- Cook, K.L.K. and Hartel, R.W. (2010). “Mechanisms of Ice Crystallization in Ice Cream Production”. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9: 213-222.
- Donhowe DP, Hartel RW. (1996a). “Recrystallization of ice during bulk storage of ice cream”. *Int Dairy J* 6(11–12):1209–21.
- Donsì, F., Ferrari, G., Lenza, E., & Maresca, P. (2009). “Main factors regulating microbial inactivation by high-pressure homogenization: operating parameters and scale of operation”. *Chemical Engineering Science*, 64(3), 520-532.
- Feng H., (2011). “*Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing*”, Springer, New York.
- Gao S., Hemar Y., Lewis G.D., Ashokkumar M., (2014). “Inactivation of enterobacter aerogenes in reconstituted skim milk by high- and low-frequency ultrasound, *Ultrason*”. *Sonochem.* 21 2099–2106.
- Ghosh V., Mukherjee A., & Chandrasekaran N., (2013). “Ultrasonic emulsification of food-grade nanoemulsion formulation and evaluation of its bactericidal activity”. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 338-344.
- Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2013). “Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: investigation of its bactericidal activity”. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 13(1), 114-122.
- Goff H.D. (2002). “Formation and stabilisation of structure in ice cream and related products”. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 7(5–6):432–7.
- Goff, H.D., Hartel, R.W. (2003). “Ice Cream”. In: *Ice Cream*. Springer, Boston, MA.
- Goff, H.D., Hartel, R.W. (2013). “Ice Cream Structure”. In: *Ice Cream*. Springer, Boston, MA.
- Hagiwara T, Hartel RW. (1996). “Effect of sweetener, stabilizer, and storage temperature on ice recrystallization in ice cream”. *J Dairy Sci* 79(5):735–44.
- Hartel RW. (1996). “Ice crystallization during the manufacture of ice cream”. *Trends Food Sci Technol* 7(10):315–21.

- Huang G., Chen S., Dai C., Sun L., Sun W, Tang Y., (2017). “Effects of ultrasound on microbial growth and enzyme activity”. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, pp. 144-149.
- Inoue K, Ochi H, Taketsuka M, Saito H, Sakurai K, Ichihashi N, Iwatsuki K, Kokubo S. (2008). “Modeling of the effect of freezer conditions on the principal constituent parameters of ice cream by using response surface methodology”. *J Dairy Sci* 91(5):1722–32.
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). “Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification”. *Food hydrocolloids*, 22(7), 1191-1202.
- Joyce E, Phull SS, Lorimer JP, Mason TJ. (2003). “The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus* species”. *Ultrason Sonochem*.
- Kapturowska A.U., Stolarzewicz I.A., Krzyczkowska J., Białecka-Florjanczyk E., (2012). “Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*”, *Ultrason. Sonochem.* 19 186–191.
- Kapturowska, A. U., Stolarzewicz, I. A., Krzyczkowska, J., & Białecka-Florjanczyk, E. (2012). “Studies on the lipolytic activity of sonicated enzymes from *Yarrowia lipolytica*”. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(1), 186-191.
- Kentish, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. (2008). “The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation”. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(2), 170-175
- Koxholt M, Eisenmann B, Hinrichs J. (2000). “Effect of process parameters on the structure of ice cream”. *Eur Dairy Mag* 1:27–30.
- Kusumaatmaja W. (2009). “Effects of mix pre-aeration and product recirculation on ice cream microstructure and sensory qualities” [MSc thesis]. Madison, WI: University of Wisconsin - Madison. 136 p.
- Lanchun S., Bochu W., Liancai Z., Jie L., Yanhong Y., Chuanren D., (2003). “The influence of low-intensity ultrasonic on some physiological characteristics of *Saccharomyces cerevisiae*”, *Colloids Surf. B* 30, 61–66.

- Leong, T. S. H., Wooster, T. J., Kentish, S. E., & Ashokkumar, M. (2009). "Minimising oil droplet size using ultrasonic emulsification". *Ultrasonics sonochemistry*, 16(6), 721-727.
- M. Ashokkumar (2014). "Applications of ultrasound in food and bioprocessing", *Ultrason. Sonochem.* 25 17–23.
- M. Ashokkumar, (2011). "The characterization of acoustic cavitation bubbles – an overview", *Ultrason. Sonochem.* 18 864–872.
- Maali, A., & Mosavian, M. H. (2013). "Preparation and application of nanoemulsions in the last decade" (2000–2010). *Journal of dispersion science and technology*, 34(1), 92-105.
- Mahdi Jafari, S., He, Y., & Bhandari, B. (2006). "Nano-emulsion production by sonication and microfluidization-a comparison". *International journal of food properties*, 9(3), 475-485.
- Marshall RT, Goff HD, Hartel RW (2003) "Ice cream". 6th ed. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 371 p.
- Mason T.J., Paniwnyk L., Lorimer J.P., (1996). "The uses of ultrasound in food technology", *Ultrason. Sonochem.* 3, 253–260.
- Matthias D. Eisner, Hans Wildmoser, Erich J. Windhab (2005). "Air cell microstructuring in a high viscous ice cream matrix". *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 263, Issues 1–3.
- Méndez-Velasco Carlos, Goff H. Douglas, (2012). "Fat structure in ice cream: a study on the types of fat interactions" *Food Hydrocolloids*, 29 (1) pp. 152-159.
- Munk Merete B., Marangoni Alejandro G., Ludvigsen Hanne K., Norn Viggo, Knudsen Jes C., Risbo Jens, (2013). "Stability of whippable oil-in-water emulsions. Effect of monoglycerides on crystallization of palm kernel oil" *Food Res. Int.*, 54 (2), pp. 1738- 1745.
- Nakabayashi, K., Amemiya, F., Fuchigami, T., Machida, K., Takeda, S., Tamamitsu, K., & Atobe, M. (2011). "Highly clear and transparent nanoemulsion preparation under surfactant-free conditions using tandem acoustic emulsification". *Chemical Communications*, 47(20), 5765-5767.
- Norn Viggo (Hg.), (2015). "Emulsifiers in Food Technology" (second ed.), Wiley Blackwell, Chichester, West Sussex, Hoboken, NJ

- O'Donnell C.P., Tiwari B.K., Bourk P. e, Cullen P.J., (2010). "Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance", *Trends Food Sci. Technol.* 21. 358–367.
- Schubert, H., & Engel, R. (2004). "Product and formulation engineering of emulsions". *Chemical Engineering Research and Design*, 82(9), 1137-1143.
- Schultz, S., Wagner, G., Urban, K., & Ulrich, J. (2004). "High-pressure homogenization as a process for emulsion formation". *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-Process Engineering-Biotechnology*, 27(4), 361-368.
- Sofjan RP, Hartel RW. (2004). "Effects of overrun on structural and physical characteristics of ice cream". *Int Dairy J* 14(3):255–62.
- Stang, M., Schuchmann, H., & Schubert, H. (2001). "Emulsification in high-pressure homogenizers". *Engineering in Life Sciences*, 1(4), 151-157.
- Takou Kon, S. Nakakura, K. Mitsubayashi, (2005). "Intracellular analysis of *Saccharomyces cerevisiae* using CLSM after ultrasonic treatments". *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 1 159–163.
- Turchiuli, C., Arnaud, E., Chassaing, C., & Ginies, C. (2008). "Influence of ultrasound on the texture and structure of ice cream". *Food Hydrocolloids*, 22(5), 789-799.
- Vinchhi, P., Patel, J. K., & Patel, M. M. (2021). "High-pressure homogenization techniques for nanoparticles". In *Emerging Technologies for Nanoparticle Manufacturing* (pp. 263-285). Cham: Springer International Publishing.
- Wu T., Yu X., Hu A., Zhang L., Jin Y., Abid M., (2015). "Ultrasonic disruption of yeast cells: underlying mechanism and effects of processing parameters". *Innovative Food Sci. Emerg. Technol.* 28 59–65.
- Wu, T., Yu, X., Hu, A., Zhang, L., Jin, Y., & Abid, M. (2015). "Ultrasonic disruption of yeast cells: Underlying mechanism and effects of processing parameters". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 59-65.

7. SITOGRAFIA

- <https://books.google.it/books?hl=it&lr=&id=DN9Ju6oiSWkC&oi=fnd&pg=PA1&dq=what+is+ice+cream&ots=plapghBSxv&sig=ulb1ywlniN07IIFxHco5h4r8QK8#v=onepage&q=what%20is%20ice%20cream&f=false>
- www.instrumat.ch
- www.chimica-online.it
- www.merckmillipore.com