



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia Animali Alimenti Risorse Naturali
e Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

Validazione sperimentale di un critical control
point di processo: esempio di applicazione nella
pasta fresca farcita

Relatore

Prof. Stefano Zardetto

Laureando:

Jacopo Zabeo

Matricola n.
1108517

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

*A mio padre,
che in questo giorno importante
non può essere presente fisicamente
ma nel pensiero è sempre vicino a me.*

Indice

Riassunto	7
Abstract	8
1. La pasta fresca farcita.....	9
1.1. La pasta fresca dal punto di vista della legge italiana	9
1.2. La pasta fresca farcita, presenza del microrganismo Clostridium botulinum	10
2. Il sistema HACCP linee generali.....	12
3. Il processo produttivo	26
4. Il critical control point di processo: aggiunta di sale nel ripieno.....	34
5. Validazione di un critical control point.....	37
6. Il parametro attività dell'acqua	39
6.1. L'influenza dell'acqua libera negli alimenti e nei metabolismi batterici (Clostridium botulinum).....	43
6.2. Tecniche per la misurazione dell'attività dell'acqua	50
6.3. Metodi per abbassare l'acqua libera negli alimenti	59
7. Materiali e metodi.....	62
7.1. Piano sperimentale.....	62
7.2. Le ricette.....	62
7.3. Preparazione dei campioni.....	65
7.4. Trattamento dei campioni.....	67
7.5. I metodi di analitici	68
7.5.1. Determinazione dell'attività dell'acqua	68
7.5.2. Determinazione dell'umidità totale a 103°C.....	70
7.5.3. Determinazione delle ceneri	71
7.5.4. Determinazione del Sodio mediante metodica GF-AAS.....	73
7.6. Analisi statistica	79
8. Risultati e discussione	81
9. Conclusioni	89
Bibliografia.....	90

Riassunto

Questo studio è basato sulla validazione del *critical control point* di processo relativo all'aggiunta dell'ingrediente sale con lo scopo di ridurre la quantità di acqua libera nel semilavorato ripieno utilizzato per la produzione della pasta fresca farcita e gestire quindi il pericolo derivante da alcuni microrganismi sporigeni come il *Clostridium botulinum* non proteolitico.

Le prove sono state eseguite simulando tre ricette semplificate per la produzione del ripieno attualmente in uso all'interno dell'azienda (carne mista, pomodoro e ricotta e spinaci), variando in queste i livelli di sale aggiunto e altri ingredienti, valutando inoltre anche l'apporto di sale dovuto alle materie prime.

Si è giunti quindi alla conclusione che i quantitativi di sale utilizzati durante le prove non hanno portato ad una riduzione dell'attività dell'acqua a valori inferiori a 0.97 (valori idonei per il controllo del microrganismo target), e che solo in un caso è stato possibile osservare una riduzione tale dei valori di attività dell'acqua da rientrare nel limite.

Dall'analisi statistica dei dati, si è potuto notare che: esiste una correlazione significativa tra il contenuto di sale aggiunto e il valore di attività dell'acqua; la variazione del valore di attività dell'acqua all'aumentare della concentrazione di sale dipende dalla formulazione e che esiste un effetto sinergico tra il sale e le materie prime oggetto della sperimentazione (fibra vegetale e proteine del latte) sul valore di attività dell'acqua finale.

Abstract

This study is based on the validation of the critical control point of process for the addition of the salt with the aim of reducing the amount of free water in the semi-finished filling used to produce the fresh filled pasta and thus managing the hazard deriving from some sporogeneous microorganisms how can it be non-proteolytic *Clostridium botulinum*.

The tests were performed by simulating three simple recipes for the production of the filling currently in use in the company (mixed meat, tomato, ricotta cheese and spinach), varying in these levels of added salt and other ingredients, also evaluating the salt input due to raw materials.

It has thus been concluded that the quantities of salt used during the tests did not lead to a reduction in water activity below 0.97 (values suitable for target microorganism control), and that only in one case it was possible to observe such a reduction of water activity values to be within the limit.

From the statistical analysis of the data, it has been noted that: there is a significant correlation between the added salt and the value of water activity; the change in the value of water activity as the concentration of salt increases depends on the formulation and that there is a synergistic effect between the salt and the raw materials subject of experimentation (vegetable fiber and milk protein) on the value of water activity final.

1. La pasta fresca farcita

Il gruppo Voltan Spa è un'azienda alimentare che produce diverse tipologie di pasta fresca farcita e altri prodotti tra cui gnocchi e paste fresche all'uovo e senza e altre gamme di prodotti surgelati.

La pasta fresca farcita è il risultato dell'unione di molteplici materie prime (anche 25-30), tra queste ve ne sono alcune come ad esempio le uova che costituiscono il substrato d'elezione per la crescita di molteplici microrganismi, questo prodotto presenta un elevato contenuto di umidità (fino al 35%) e valori di attività dell'acqua compresi tra 0.93 e 0.97 (Zardetto S. 2014). Per i motivi appena descritti la pasta fresca farcita viene considerata quindi un alimento facilmente deperibile e per la sua commercializzazione oltre al trattamento termico devono essere attuati una serie di accorgimenti tecnologici volti ad impedire il decadimento microbiologico e sensoriale del prodotto e garantirne quindi la salubrità durante la shelf-life.

1.1. La pasta fresca dal punto di vista della legge italiana

Dal punto di vista legislativo italiano, la pasta fresca farcita viene normata attraverso la Legge del 4 luglio 1967, n. 580 s.m.i., al cui articolo 33 viene consentita la produzione di paste alimentari fresche, a patto che nella produzione di queste vengano osservate le prescrizioni presenti nell'articolo 31 relativo alla pasta all'uovo e cioè che la pasta deve essere prodotta con l'impiego di uova fresche, deve inoltre essere prodotta esclusivamente con semola e con l'aggiunta di almeno 4 uova intere, prive di guscio, per un peso complessivo non inferiore a grammi 200 di uova per ogni chilogrammo di semola. Questo concetto viene poi ripreso nel Decreto del Presidente della Repubblica 9 febbraio 2001, n. 187 s.m.i., agli articoli 8 e 9 dove viene consentito l'uso di una corrispondente quantità di ovoprodotto liquido fabbricato esclusivamente con uova intere di gallina per la produzione delle paste fresche alimentari il quale deve rispondere ai requisiti prescritti dal decreto legislativo 4 febbraio 1993, n. 65 e viene inoltre consentito l'impiego di farine di grano

tenero e stabilendo anche i requisiti per le paste alimentari fresche poste in vendita in imballaggi preconfezionati deve possedere i seguenti requisiti;

- Possedere un tenore di umidità non inferiore al 24%;
- Avere un'attività dell'acqua non inferiore a 0.920 e non superiore a 0.970;
- Devono essere state sottoposte ad un trattamento termico equivalente almeno alla pastorizzazione;
- E devono essere conservate dalla produzione alla vendita a temperature non superiori a +4°C con una tolleranza di 2°C.

1.2. La pasta fresca farcita, presenza del microrganismo *Clostridium botulinum*

Per quel che concerne il prodotto pasta fresca farcita, da una ricerca eseguita all'interno del portale informatico del *Rapid Alert System for Food and Feed (RASSF)*, prendendo in esame un ampio lasso di tempo, è emerso che per questo alimento non sono presenti notifiche per presenza di *Clostridium botulinum*. Da un'altra ricerca è emerso che anche in letteratura non ci sono notizie riguardanti casi di malattia o decessi dovuti a tale microrganismo per questa tipologia di prodotto.

Il fatto che non ci siano stati finora casi dovuti a questo microrganismo per questa tipologia di prodotto non vuol dire che non bisogna porre attenzione a questo potenziale pericolo e che risulta indispensabile porre la massima attenzione per evitare che questo si verifichi, questo perché si tratta pur sempre un prodotto alimentare a rischio.

Da un attento esame del prodotto si può affermare che il ripieno rappresenta il punto sfavorito alla penetrazione del calore durante il trattamento termico e per questo si dovrà effettuare un trattamento termico che garantisca la sicurezza del prodotto attraverso la distruzione dei vari microrganismi tra cui le forme vegetative e le tossine di *Clostridium botulinum* non proteolitico eventualmente presenti. Per ostacolare lo sviluppo delle spore di *Clostridium botulinum* durante le varie fasi post trattamento termico e distributive si agisce in modo sinergico alla pastorizzazione con le cosiddette *hurdle technology* attraverso la

riduzione del pH per mezzo di additivi acidificanti e dell'attività dell'acqua attraverso l'aggiunta di sale oppure mediante l'essiccamento parziale del prodotto, ecc.

2. Il sistema HACCP linee generali

Il sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) raffigura uno strumento consolidato ed indispensabile per l'elaborazione del piano di autocontrollo aziendale per analizzare e prevenire i rischi che caratterizzano tutta la filiera produttiva degli alimenti allo scopo di garantirne la salubrità e la sicurezza.

La base di un sistema di autocontrollo è infatti la conoscenza approfondita del prodotto e del processo produttivo dal punto di vista igienico-sanitario attraverso la dimostrazione di quanto effettivamente viene messo in atto all'interno dall'azienda alimentare, per fare questo si deve seguire una regola ovvero: *“scrivere quello che si deve fare e fare ciò che c'è scritto”*. Il sistema di autocontrollo deve quindi essere specifico per una singola realtà aziendale e l'individuazione dei punti critici di controllo non deve essere effettuata a priori ma bensì dopo un'attenta analisi del processo produttivo e deve prevedere una continua evoluzione nel tempo per mirare ad una sempre maggiore efficacia (Magnani U. 1999).

Il sistema di autocontrollo si rifà ad una serie di principi abbastanza intuitivi i quali sono suddivisibili in tre tappe che vedono coinvolte una sequenza logica di attività. Questi principi sono per convenzione raccolti in cinque fasi preliminari chiamati prerequisiti (figura1):

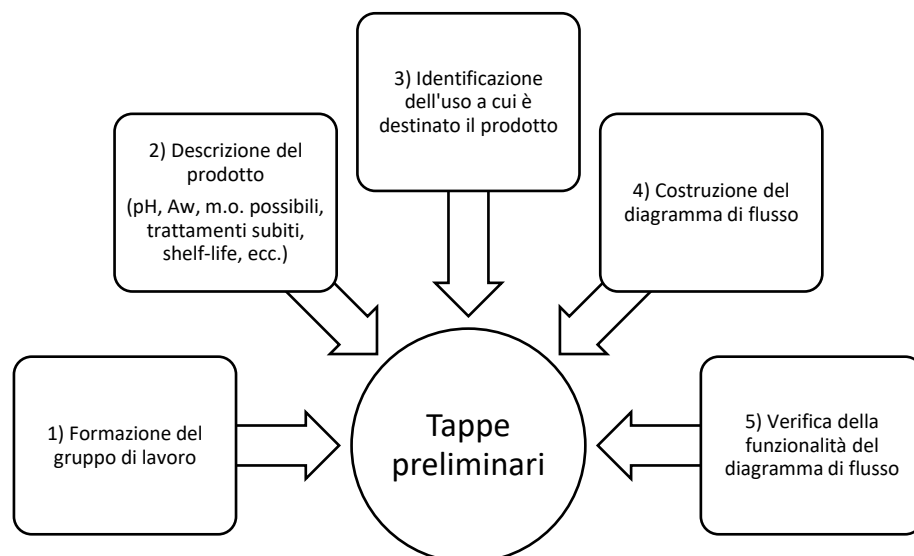


Figura 1: Tappe preliminari del sistema HACCP.

La necessità di applicare le tappe preliminari deve essere valutata in funzione della complessità del ciclo produttivo e sulla base dei sette principi dettati dal *Codex Alimentarius* (figura 2), questi sette punti vengono ripresi assieme ad altre importanti nozioni in tema di sicurezza alimentare dalla normativa europea (regolamenti del pacchetto igiene).

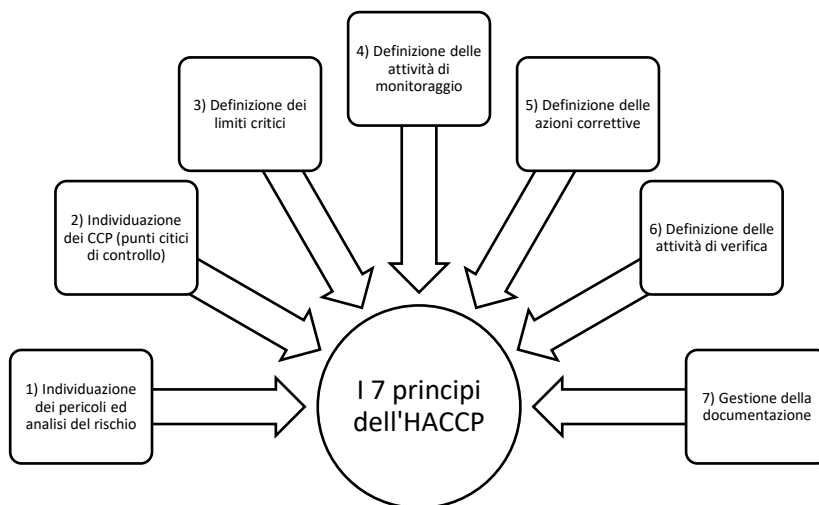


Figura 2: I sette principi dell'HACCP.

Oltre all'applicazione dei sette punti dettati dal *Codex Alimentarius*, devono essere previste altre due fasi ulteriori denominate tappe realizzative (figura 3).

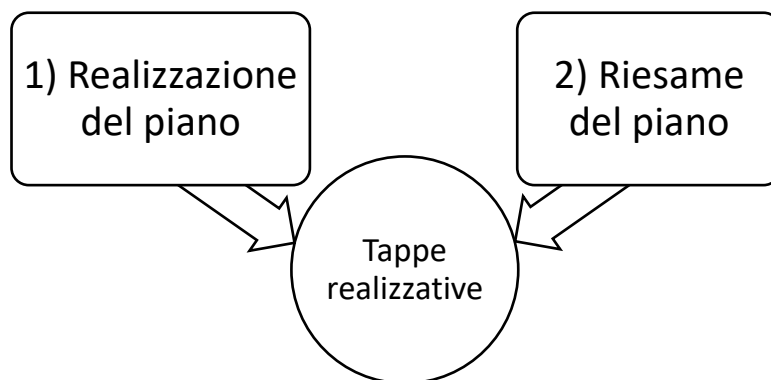


Figura 3: Le tappe realizzative del sistema HACCP.

In sintesi dunque il sistema HACCP è dato dalla somma di tre processi parziali rappresentati dalle tappe preliminari, dalla fase esecutiva e dalle tappe realizzative che agendo in sinergia tra loro vanno a costruire il piano di autocontrollo aziendale

Per la progettazione di un piano di autocontrollo è indispensabile prima di tutto verificare la messa in essere e l'applicazione delle norme di buona prassi igienica (GMP) identificate nei regolamenti facenti parte del cosiddetto "pacchetto igiene" ed in particolar modo nel Regolamento CE 852/2004 sull'igiene dei prodotti alimentari (tra cui: requisiti strutturali, *pest control*, attrezzature e strumenti utilizzati, procedure di pulizia e disinfezione, formazione del personale, approvvigionamento delle materie prime e la loro lavorazione). Se tutto questo è attuato si può procedere all'elaborazione del piano a partire dai cinque punti preliminari.

Si inizia quindi costituendo il **gruppo di lavoro HACCP** e per fare ciò si deve per prima cosa identificare un coordinatore che deve avere la necessaria competenza ed autorevolezza per guidare ed organizzare i lavori, all'interno del gruppo vi deve essere anche un rappresentante dell'azienda o comunque una figura con poteri decisionali che possa mettere a disposizione le risorse economiche e strutturali necessarie e se si ritiene necessario si può ricorrere alla consulenza da parte di professionisti esterni all'azienda per ampliare alcune conoscenze.

Bisogna tener presente che per formare la squadra di lavoro non è necessario un numero elevato di persone, ma bastano solamente gli individui che sulla base dell'esperienza, della conoscenza dell'azienda, dei prodotti e del processo produttivo e dei rischi da esso derivanti siano indispensabili ai fini della buona riuscita del lavoro posto in essere.

Costituito il gruppo di lavoro si passa alla fase di descrizione del **processo produttivo** per fare ciò si devono identificare i vari parametri che concorrono a mantenere la sicurezza igienico-sanitaria del prodotto e che quindi possono influire positivamente sui pericoli individuati, inoltre si deve prestare particolare attenzione alle condizioni che possono influenzare i pericoli microbiologici e chimici ponendo in evidenza le situazioni alle quali sarà sottoposto il prodotto nelle fasi di post produzione, distribuzione e consumo.

Per ogni prodotto si dovranno quindi definire:

- La composizione (tipo e percentuale di utilizzo delle materie prime, additivi, ecc.);

- I parametri chimico-fisici (pH, a_w , concentrazione di soluti), la composizione microbica (flora batterica competitiva compresa), ed i livelli di additivi con azione preservante se presenti nelle formulazioni;
- Lo stato fisico del prodotto finito (solido, liquido, ecc.);
- Le procedure di produzione utilizzate (trattamenti termici od altro);
- Il sistema di confezionamento (materiali utilizzati, tecnologie di imballaggio: sottovuoto, atmosfera modificata, ecc.);
- Le modalità di stoccaggio (refrigerato, temperatura ambiente, ecc.);
- La *shelf-life*;
- Le istruzioni per la conservazione e l'uso;
- La tipologia dei consumatori ai quali il prodotto è destinato se questo è destinato a delle categorie particolari di consumatori.

Definiti i punti qui sopra si può passare alla “storia” del prodotto relativamente ai parametri igienico-sanitari delle materie prime e dei semilavorati guardando non solo al prodotto finito ma tenendo conto anche nelle situazioni di distribuzione e consumo e questo serve per fornire al gruppo di lavoro una completa conoscenza del prodotto.

Tale operazione è possibile organizzando una serie di campionamenti per costruire i vari profili dei prodotti cercando di ottenere un ampio numero di parametri chimico-fisici e microbiologici descrittivi di ogni singola referenza oggetto di studio; inoltre per costruire la storia dei prodotti risulta di fondamentale importanza la rintracciabilità dei vari lotti allo scopo di evidenziare le varie non conformità accadute nel tempo e cercare quindi di colmare le mancanze da queste evidenziate. Si deve **identificare la modalità d'uso del prodotto** prevedendo dunque l'utilizzo normale dell'alimento una volta commercializzato e, sulla base di questi si devono calcolare i rischi ad esso collegati.

A questo punto si procede alla **stesura del flow chart** o diagramma di flusso, dove verranno descritte in maniera chiara, intuitiva ed esauriente tutte le fasi della filiera produttiva a partire dalla ricezione delle materie prime fino alla spedizione al cliente del prodotto finito. Nel fare questo è meglio allegare alla documentazione una piantina dettagliata e aggiornata dello stabilimento comprensiva del *lay out* degli impianti e delle attrezzature assieme

all'indicazione dell'uso funzionale dei vari locali e delle celle frigorifere questo per facilitare l'identificazione da parte del gruppo di lavoro dei luoghi in cui vengono effettuate le varie fasi produttive. Costruito, il diagramma di flusso questo deve essere **verificato** da tutta la squadra di lavoro per effettuare un confronto tra quanto scritto e le effettive operazioni svolte.

Terminata la fase definita preliminare si passa alla fase esecutiva rappresentata **dall'individuazione dei pericoli e dall'analisi dei rischi**, questa è volta quindi ad identificare i pericoli e prevedere quale livello di rischio dà origine ad un pericolo inaccettabile per la sicurezza del consumatore per un determinato alimento.

Per fare ciò si devono seguire alcuni punti come:

- **Identificare i pericoli**, per fare ciò le azioni che si possono intraprendere sono:
 - Identificare per ogni materia prima, ingrediente o fase di produzione evidenziata nel diagramma di flusso i pericoli potenziali definendone un elenco;
 - Effettuare la valutazione del pericolo valutandone la probabilità di insorgenza e assegnando a questo una classe di rischio (alto, medio, basso minimo o assente) e la relativa gravità (elevata, severa o lieve);
 - Individuare le misure preventive da mettere in atto per evitarne l'insorgenza.

Si può affermare dunque che un buon piano HACCP deve focalizzare la propria attenzione in maniera selettiva sui pericoli significativi che hanno quindi una forte probabilità di dare origine ad un rischio inaccettabile per la salute del consumatore e che devono essere ridotti o eliminati.

Per identificare un pericolo si può ricorrere a degli schemi ad albero decisionale (figura 4), dove rispondendo a delle domande si riesce a determinare se quel determinato punto rappresenta o meno un pericolo.

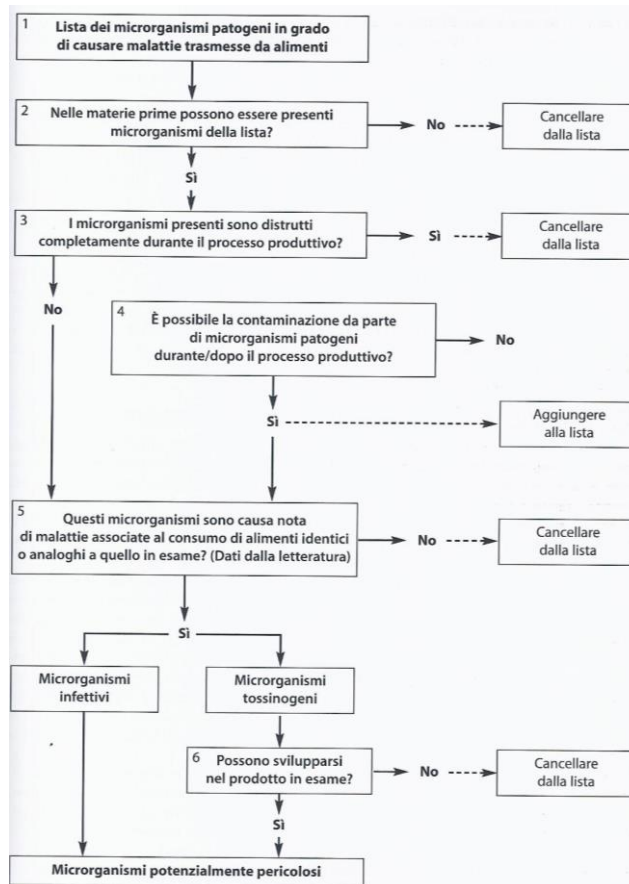


Figura 4: Esempio di albero decisionale per l'identificazione dei pericoli di natura microbica nei prodotti alimentari (immagine tratta da: Gardini F., Parente E. 2013).

I pericoli possono essere suddivisi in tre tipologie: biologici, chimici o fisici.

Il pericolo biologico è rappresentato da vari microrganismi siano essi sporigeni o meno, tossine batteriche, miceti e loro micotossine, virus e parassiti. Questi pericoli possono essere minimizzati adottando le buone prassi igieniche e attraverso degli idonei trattamenti al prodotto come ad esempio la pastorizzazione, sterilizzazione, e attuando le procedure volte al *pest control*.

I pericoli chimici possono essere rappresentati da sostanze farmacologiche come farmaci veterinari o sostanze ormonali ad azione anabolizzante, contaminanti ambientali come metalli pesanti e antiparassitari, contaminanti di processo quali disinfettanti e detergenti, contaminanti derivanti dal *packaging*, sostanze di

neoformazione prodotte dalle tecnologie trasformative applicate agli alimenti quali benzopirene, metaboliti, ecc.

Le azioni volte a minimizzarne l'insorgenza di questi pericoli possono essere la selezione dei fornitori, la formazione del personale addetto alle operazioni di pulizia e l'uso di prodotti idonei.

I pericoli fisici sono rappresentati da: vetro, metallo, ossa, legno, insetti, gomme e plastiche. Questi possono derivare dall'ambiente, dalle attrezzature, dal personale o dalle materie prime quindi si può intuire che adottando misure preventive come programmi di controllo delle materie prime e dei fornitori, dell'ambiente di lavoro e del personale addetto si possa minimizzare questo rischio.

Un ruolo fondamentale per tenere sotto controllo alcuni di questi pericoli la svolge il personale operante e quindi questo deve essere opportunamente formato.

Identificati i pericoli si passa all'**analisi del rischio** per fare ciò devono essere presi in considerazione diversi punti effettuando ad esempio la valutazione del livello di esposizione dei potenziali consumatori all'alimento, nel caso ad esempio di rischio microbiologico questa si può attuare attraverso: a) la stima delle cariche microbiche e della loro distribuzione grazie a studi di tipo sperimentale come il *Challenge test* e modelli matematici predittivi volti a valutare la crescita o la sopravvivenza dei microrganismi a diverse condizioni di pH, a_w , tempo/temperatura, concentrazione di sale o altro, b) valutando il rapporto dose/risposta determinando quindi la carica infettante del microrganismo in esame o del livello minimo di tossina capace di provocare sintomi clinici, c) caratterizzando il rischio ed individuando la soglia di accettabilità (la caratterizzazione del rischio è data dalla somma delle probabilità di contaminazione derivante dalle materie prime, dall'ambiente di lavorazione, dal processo di confezionamento, ecc. mentre la soglia di accettabilità dipende dalla gravità del pericolo e dalla frequenza del verificarsi di quest'ultimo oltre che dalle risorse economiche necessarie per ridurlo). I fattori utilizzabili per svolgere l'analisi del rischio possono essere suddivisi in generali o specifici (tabella 1).

Fattore di rischio/pericolo	Generale	Specifico
Indicazioni epidemiologiche sulle matrici, luoghi, processi	X	
Indicazioni microbiologiche sulle matrici	X	
Requisiti di qualità dei fornitori		X
Ingredienti		X
Fattori intrinseci		X
Procedure di processo		X
Contenuto microbico dell'alimento		X
Disegno dei locali, percorsi ed attrezzature		X
Confezionamento		X
Salute, igiene ed educazione del personale		X
Tipologia di utenti del prodotto		X
Indicazioni per l'uso rivolte al consumatore		X

Tabella1: Fattori per effettuare l'analisi del rischio (modificata da Magnani U. et al 1999).

Identificati i pericoli ed eseguita l'analisi dei rischi, si possono **definire i Punti Critici di Controllo**. Un punto critico di controllo (CCP), è un punto, una fase o procedura in corrispondenza del quale è possibile esercitare un'azione di controllo che si rivela essenziale al fine di prevenire, eliminare o ridurre ad un livello accettabile un pericolo. Il punto o la fase così individuata deve essere controllata e monitorata in continuo e devono essere stabiliti dei limiti critici da non superare.

Tipici esempi di CCP possono essere: il trattamento termico le cui combinazioni tempo-temperatura devono essere rispettate per garantire la distruzione della flora microbica patogena; il mantenimento del pH e dell'attività dell'acqua a valori che ostacolino la proliferazione dei microrganismi patogeni e non; l'uso della refrigerazione che svolge la sua azione rallentando o inibendo lo sviluppo microbico, è importante considerare che quando si usa la refrigerazione bisogna porre attenzione ai gruppi di microrganismi che sono in grado di svilupparsi a temperature inferiori a 5°C come ad esempio *Clostridium botulinum* non

proteolitico, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*.

Il concetto base del sistema HACCP è rappresentato dal presupposto che, quando tutti i CCP di un processo produttivo sono tenuti sotto stretto controllo, le variazioni che possono verificarsi nella produzione degli alimenti sono sempre di modesta entità e di conseguenza non sono in grado di compromettere la sicurezza del prodotto o dei vari lotti (Brunelli et al. 2005). Il gruppo di lavoro può identificare i punti critici di controllo rispondendo a delle domande (Magnani U. et al, 1999):

- Domanda 1:

Esistono misure preventive per il rischio identificato?

- Risposta: «SI» sono in atto misure preventive → Procedere alla domanda 2.
- Risposta: «NO» non sono in atto misure preventive, si deve determinare se sia necessario un controllo in questa fase per assicurare la sicurezza del prodotto. Le domande 3 e 4 possono aiutare in questa determinazione. Se è necessario il controllo di questa fase, il gruppo deve proporre una modifica al processo/prodotto che sia accettabile e che venga messa in pratica.

- Domanda 2:

La fase è destinata ad eliminare o ridurre la probabilità del verificarsi di un rischio ad un livello accettabile? (per rispondere a questa domanda bisogna tener conto dei dati tecnici rilevanti come pH, a_w , conservanti, ecc.)

- Risposta: «SI» la fase è considerata un CCP, il gruppo deve identificare più precisamente cosa sia critico: la fase del processo, la modalità operativa, la procedura, gli ingredienti, ecc.
- Risposta: «NO» → procedere alla domanda 3.

- Domanda 3:

Può una contaminazione con un rischio identificato verificarsi superando un limite accettabile o il rischio può aumentare fino ad un livello inaccettabile? (Considerare se

gli ingredienti usati, le persone, le attrezzature, ecc. possano essere fonte di rischio e possano quindi contaminare il prodotto. Il gruppo deve rispondere SI a meno che non sia certo che la risposta è NO. Bisogna anche considerare l'effetto cumulativo di tappe successive del processo quando si risponde a questa domanda).

- Risposta: «NO» la fase del processo non è un CCP
- Risposta: «SI» → procedere alla domanda 4.

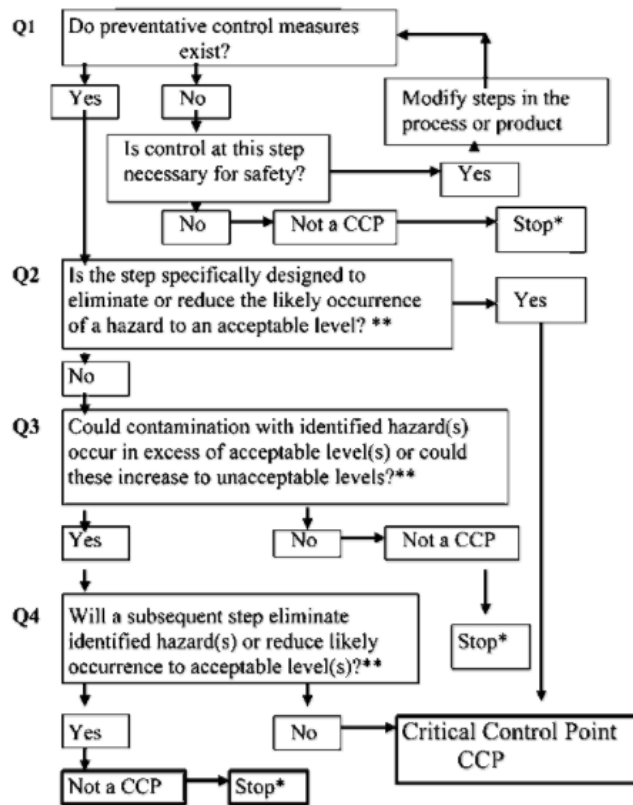
- Domanda 4:

Una fase successiva sarà in grado di eliminare i rischi identificati o di ridurre le probabilità che si verifichino ad un livello inaccettabile?

Se la risposta alla domanda 3 è stata «SI», il gruppo deve esaminare in sequenza le tappe successive del processo indicate nel diagramma di flusso e determinare se qualche fase successiva eliminerà il rischio o lo ridurrà ad un livello accettabile. Le domande 3 e 4 sono da utilizzare insieme.

- Risposta: «NO» si è identificato un CCP e bisogna a questo punto determinare cosa è critico: un ingrediente, una fase del processo, una procedura.
- Risposta: «SI» la fase del processo considerata non è un CCP.

Queste domande possono essere inserite all'interno di un albero decisionale per facilitare le operazioni di individuazione (figura 5).



*Proceed to next hazard
 **Acceptable levels needs to be defined

Figura 5: Albero delle decisioni da prendere per individuare un CCP (www.fao.org).

Tutto quello che non rientra come *critical control point* si definisce come prerequisito operativo (PRPs). I prerequisiti operativi sono definiti dalla norma ISO 22000:2005 come quei punti che sono identificati dall’analisi dei pericoli come essenziali per controllare la probabilità che un particolare pericolo per la sicurezza alimentare venga introdotto, questi sono rappresentati quindi da delle condizioni o da delle attività di base necessarie per mantenere l’igiene ambientale ad un livello tale da favorire la sicurezza del prodotto (De Gregorio A. et al 2010). I prerequisiti operativi non necessitano di un monitoraggio in continuo, ma comunque sono oggetto di monitoraggio.

I prerequisiti operativi devono essere documentati e nel farlo si devono includere le seguenti informazioni:

- Pericolo/i per la sicurezza alimentare da controllare attraverso il programma di autocontrollo;
- Metodi di misura e controllo;

- Procedure di monitoraggio che dimostrino la loro attuazione;
- Correzioni ed azioni correttive da intraprendere se il monitoraggio mostra che i requisiti operativi non sono sotto controllo;
- Responsabilità ed autorità;
- Registrazione dell'avvenuto monitoraggio.

Una volta che si sono stabiliti i vari punti critici di controllo si devono definire per ognuno di essi dei **limiti critici** che devono essere rispettati per assicurare che il pericolo venga controllato efficacemente. Questi limiti devono essere misurabili e la spiegazione della loro scelta deve essere opportunamente documentata; per quel che riguarda i limiti critici basati su dati soggettivi come può essere l'ispezione visiva del prodotto, del processo, della manipolazione, ecc. devono essere supportati da istruzioni specifiche e/o formazione e addestramento del personale.

Per tenere sotto controllo i vari punti critici di controllo devono essere stabilite per ognuno di essi delle **procedure di monitoraggio** mediante una sistematica osservazione dei parametri stabiliti per garantire il rispetto dei limiti prefissati. Il sistema di monitoraggio deve essere in grado di rilevare una qualsiasi perdita di controllo e deve fornire informazioni in maniera tempestiva agli operatori per poter intraprendere le adeguate misure correttive. Le varie procedure di monitoraggio messe in atto devono fornire la prova del loro effettivo funzionamento grazie a segnalazioni acustiche o visive nel caso di deviazioni dai limiti imposti, inoltre ogni procedura di monitoraggio deve fornire una documentazione a prova dell'effettivo svolgimento del controllo, la quale può essere una registrazione su supporto cartaceo o informatico di tutti i dati raccolti, grazie alla quale poi si potranno effettuare delle eventuali **azioni correttive** ovvero quelle procedure preventivamente stabilite che devono essere seguite quando si presentano delle deviazioni dai limiti imposti (non conformità), volte ad eliminare il pericolo che si è generato e quindi riportare sotto controllo il CCP. Alcuni esempi di monitoraggio dei CCP possono essere:

- La misurazione *on-line*, queste forniscono una risposta immediata come ad esempio il metal detector, misurazioni tempo/temperatura, ecc.;

- Misurazioni off-line, per avere una risposta in un tempo variabile come ad esempio le misurazioni dell'attività dell'acqua, sale, le analisi chimiche o microbiologiche.

Queste si possono ulteriormente suddividere in:

- Misurazioni in continuo (termografi, pH-metri, ecc.);
- Misurazione non in continuo, la frequenza deve essere stabilita ed il sistema deve assicurare che il campione sia rappresentativo del lotto prodotto.

Se il monitoraggio non è effettuato in continuo la sua frequenza deve essere stabilita e messa per iscritto nel piano di autocontrollo, dove dovranno essere indicate le eventuali analisi microbiologiche o strumentali eseguite.

Arrivati a questo punto si passa alla verifica e alla validazione del piano di autocontrollo, la norma ISO 20000:2005 definisce con il concetto di **verifica** il controllo mediante esame e considerazione di prove obiettive, volte a stabilire se son stati soddisfatti requisiti specifici (De Gregorio A. et al 2010). Con l'operazione di verifica si va a vedere nel dettaglio se si stanno facendo bene le cose stabilite, questa si può effettuare attraverso l'applicazione dei metodi, procedure, test e altre valutazioni in aggiunta al monitoraggio, per accertare la conformità con il piano di autocontrollo stabilito. La verifica è in primo luogo una responsabilità dell'industria, anche se alcune attività di verifica possano essere intraprese anche dai vari organi di controllo.

La verifica può includere alcune attività quali: a) la calibrazione degli strumenti utilizzati per il monitoraggio la quale deve avere una frequenza specificata, b) l'osservazione diretta dell'attività di monitoraggio e dell'adozione delle azioni correttive, c) la revisione delle registrazioni effettuate anche in caso di non conformità (Matteucci D, Rabazzi S, 2009).

Con il termine **validazione** si definisce l'ottenimento dell'evidenza che le misure di controllo gestite da piano HACCP e dai prerequisiti operativi siano efficaci (De Gregorio A. et al 2010).

Attraverso la validazione si va a vedere se si stanno facendo bene le cose stabilite e se queste sono giuste, si accerta l'efficacia del sistema. La validazione consiste nel raccogliere e

nel valutare delle informazioni tecniche e scientifiche per determinare se il piano di autocontrollo tiene effettivamente sotto controllo i rischi.

La validazione può essere considerata anche come il processo tecnico e scientifico per determinare che i CCP ed i limiti a loro associati siano adeguati e sufficienti a controllare i pericoli significativi e quindi gestire il processo di produzione. L'operazione di validazione può essere effettuata solo internamente all'azienda e i dati per validare un piano HACCP possono derivare da varie fonti quali letteratura scientifica, risultati delle analisi effettuate internamente, risultati delle sperimentazioni e linee guida ufficiali (Matteucci D, Rabazzi S 2009). Questo argomento verrà ripreso in maniera esaustiva nel capitolo 5.

Tutta la documentazione così ottenuta deve essere mantenuta aggiornata attraverso un piano di **gestione della documentazione** garantendo quindi la conservazione di tutte le procedure e dei rapporti sotto forma di registro permanente, questo registro deve essere presentato qualora richiesto dall'autorità competente.

La gestione della documentazione è molto importante perché la gioca un ruolo fondamentale nel dimostrare a terzi l'effettiva osservanza delle regole e delle varie procedure volte a prevenire i rischi che l'azienda ha messo in atto. Tutta la documentazione prodotta deve essere sottoposta ad una accurata verifica per controllare la coerenza con quanto specificato nel manuale di autocontrollo, il documento così approvato è quello dichiarato applicabile e il suo aggiornamento è rappresentato dalla sua **revisione** (Magnani U et al, 1999).

3. Il processo produttivo

La produzione della pasta fresca farcita prevede che la sfoglia ed il ripieno siano preparati separatamente e solo successivamente questi vengano uniti.

Gli ingredienti per l'ottenimento della sfoglia sono: a) semola e/o farina di grano tenero: ottenuta dal frumento duro, la cui destinazione d'uso principale è la pastificazione, come riportato nel D.P.R. 09 febbraio 2001, n.187; b) uovo intero, la cui azione principale è quella di legare e donare colore all'impasto grazie all'elevata presenza di pigmenti in particolare carotenoidi nel tuorlo; c) acqua proveniente dalla rete idrica opportunamente filtrata.

Le modalità operative che si eseguono per ottenere la sfoglia vengono qui descritte nel diagramma di flusso (figura6).

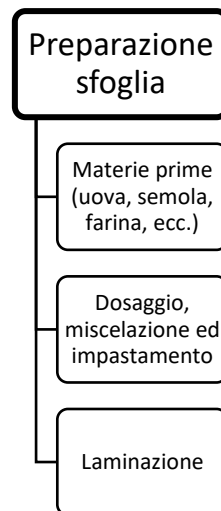


Figura 6: Fasi per la produzione della sfoglia.

La produzione della sfoglia avviene prima dosando e successivamente miscelando i vari ingredienti all'interno dell'impastatrice, durante il periodo di impastamento si verificano delle modificazioni a carico dell'impasto in quanto si ha l'idratazione delle particelle di amido della farina con il loro rigonfiamento e una parziale formazione del reticolo glutinico ovvero il complesso proteico dovuto all'interazione con l'acqua delle glutenine e delle gliadine, e l'interazione tra i lipidi e le proteine. L'impastatrice è costituita da una vasca orizzontale semicilindrica al cui interno è presente un albero rotante nel cui asse sono presenti delle

palette orientabili disposte ad elica, l'orientabilità delle palette facilita l'operazione di scarico dell'impasto all'interno della tramoggia del laminatoio. Ottenuto l'impasto si passa alla fase successiva di laminazione dello stesso per ottenere la sfoglia, questa fase è svolta da un laminatoio ovvero un macchinario composto da una serie di coppie di rulli cilindrici che lavorano a temperatura ambiente, questo per evitare danni termici alle componenti dell'impasto. La prima coppia di rulli del laminatoio è composta da due cilindri ondulati ed effettua la fase di gramolatura, qui l'impasto ancora grezzo viene compattato e l'aria in eccesso viene eliminata, inoltre questa operazione consente l'orientazione della maglia glutinica dell'impasto; la fase successiva alla gramolatura prevede il passaggio dell'impasto attraverso una seconda coppia di rulli lisci che danno l'inizio alla fase di formatura della sfoglia producendo un primo semilavorato dello spessore di circa 1 - 1.5 cm e successivamente questo passa attraverso un'altra coppia di rulli che ne delinea lo spessore finale. Successivamente la sfoglia passa alla macchina formatrice posta in linea.

Gli ingredienti per la produzione del ripieno sono molteplici, alcuni esempi possono essere:

- Sale fino;
- Carne cotta mista bovino-suini;
- Ricotta industriale;
- Doppio concentrato di pomodoro;
- Spinaci surgelati tritato o secchi;
- Salumi;
- Prodotti ittici;
- Spezie;
- Pane grattugiato;
- Latte in polvere parzialmente scremato;
- Inulina;
- Additivi acidificanti;
- Altri ingredienti.

Le modalità operative che si eseguono per La preparazione del semilavorato ripieno vengono qui descritte nel diagramma di flusso (figura 7).



Figura 7: Fasi della produzione del semilavorato ripieno.

La preparazione del semilavorato ripieno avviene in un locale separato dalla zona dove viene preparata la sfoglia, come prima fase si ha la preparazione degli ingredienti seguendo scrupolosamente la ricetta, quindi i vari ingredienti vengono pesati all'interno di appositi carrelli in acciaio; ad eccezione del sale e degli additivi acidificanti che vengono pesati su una bilancia apposita e successivamente aggiunti agli altri ingredienti, questo perché questi due ingredienti rappresentano il primo *critical control point* per la produzione della pasta fresca farcita.

Effettuate le pesate dei vari ingredienti questi vengono inseriti all'interno della vasca di miscelazione, che è composta da una vasca semicilindrica al cui interno vi è un albero in acciaio dotato di palette disposte ad elica che girando miscelano i vari ingredienti dopodiché questi tramite una coclea vengono spinti attraverso un estrusore dotato di una trafilatura con dei fori di dimensioni idonee per ottenere un impasto omogeneo.

Ottenuto l'impasto questo viene stoccato all'interno di appositi carrelli in acciaio i quali vengono ricoperti con un film plastico di color blu ed identificati mediante l'apposizione su quest'ultimo di un'etichetta riportante lotto, data di produzione e codice univoco che

identifica la tipologia di ripieno e il tutto viene posto nella cella frigo ad una temperatura di $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ in attesa del loro utilizzo.

Una volta che il semilavorato ripieno è stato approvato dall'addetto al controllo qualità si passa alla fase successiva dove la sfoglia appena laminata arriva alla macchina formatrice la quale presenta una tramoggia dove viene versato al suo interno il ripieno, la tramoggia ha un sistema di dosatura del ripieno e attraverso una serie di operazioni svolte ad alta velocità questa macchina riceve la sfoglia dal laminatoio, la taglia per ottenere una superficie dalle dimensioni idonee per ottenere il prodotto in lavorazione ed estrude il ripieno attraverso il dosatore il quale viene porzionato e collocato dall'alto sopra alla sfoglia che solo a questo punto viene chiusa dando al prodotto l'aspetto finale. Successivamente avvengono tutte le altre fasi successive alla fase di formatura del pezzo (figura 8).

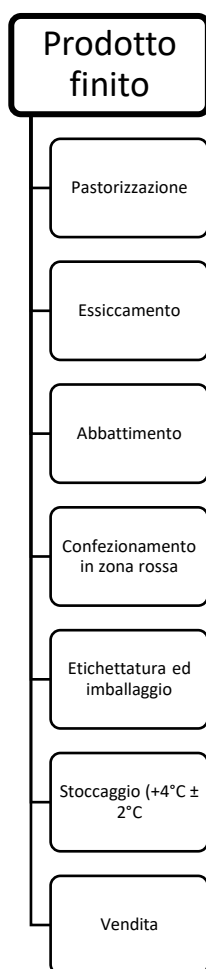


Figura 8: Fasi successive alla formatura della pasta fresca farcita.

La fase successiva alla formatura prevede il trattamento termico di pastorizzazione, il prodotto passa dalla formatrice per mezzo di un nastro trasportatore al nastro di carica del pastorizzatore costruito in acciaio inox.

Il pastorizzatore è una camera semichiusa satura di vapore caldo che viene percorsa al suo interno dal nastro metallico nel quale vengono adagiati i prodotti in un singolo strato. Il vapore caldo che è presente all'interno della camera si va condensare sul prodotto trasferendo così il suo calore prima alla superficie del prodotto e successivamente nel tempo penetra all'interno di esso determinando così l'effetto letale desiderato su tutta la massa trattata.

La velocità del nastro trasportatore del pastorizzatore è tarata in modo tale da consentire l'uscita del prodotto non prima che questo abbia subito un trattamento termico stabilito, in questo caso specifico il trattamento termico è impostato per essere equivalente ad un trattamento a 90°C minimo per 10 minuti questo per distruggere le forme vegetative e le tossine botuliniche del *Clostridium botulinum* non proteolitico.

Il trattamento di pastorizzazione eseguito presso gli stabilimenti del gruppo Voltan è di tipo singolo, questo a differenza di un ipotetico schema di produzione della pasta fresca farcita che prevedrebbe un doppio trattamento termico, uno effettuato sul prodotto sfuso e uno a confezionamento avvenuto. Al giorno d'oggi il doppio trattamento per la pasta fresca risulta superato, in quanto il secondo trattamento ha lo scopo di eliminare la possibile ricontaminazione del prodotto nella fase di confezionamento post prima pastorizzazione, il secondo trattamento viene ancora attuato nella produzione di un'altra categoria di prodotto ovvero la pasta stabilizzata.

L'abbandono del secondo trattamento termico per la tipologia pasta fresca è stato effettuato per preservare le qualità organolettiche e nutrizionali della pasta oltre che l'immagine di prodotto "fresco". Nonostante questo affinché il prodotto che subisce la singola pastorizzazione sia sicuro dal punto di vista igienico-sanitario sono necessari degli accorgimenti relativi alla gestione di tutte le fasi successive alla tappa di pastorizzazione ponendo notevole attenzione alle condizioni igieniche ambientali a valle del trattamento

termico e questo è possibile passando per un confezionamento in una zona considerata ad alto rischio dove di solito vengono utilizzati ambienti con aria filtrata e sterilizzata (Zardetto S. 2014).

Terminata la fase di pastorizzazione si passa all'essiccamento parziale del prodotto, l'essiccatore è composto da un nastro trasportatore che fa avanzare il prodotto nel tunnel di essiccazione dove all'interno di questo viene forzata dell'aria calda, la velocità e le condizioni di processo possono variare a seconda del prodotto (pezzatura e tipologia di ripieno), per esempio l'aria può avere una temperatura di circa 70°C, il tempo di trattamento può essere fissato nell'intorno di 20 minuti.

L'effetto essiccante si ottiene dalla circolazione dell'aria calda la quale permette la rimozione dell'acqua che per capillarità passa dalle porzioni interne del prodotto alla superficie di esso. Nel svolgere questa operazione bisogna porre attenzione a non essiccare eccessivamente la parte superficiale del prodotto per evitare la formazione della crosta superficiale.

Questo trattamento permette: a) la riduzione dell'attività dell'acqua consentendo quindi un aumento della conservabilità del prodotto; b) l'asciugatura della superficie del prodotto evitando i fenomeni di adesione tra i vari pezzi e favorire le successive operazioni di pesatura; c) Inattivare alcuni complessi enzimatici come le ossidasi consentendo così il mantenimento del colore del prodotto.

A questo punto la pasta viene convogliata attraverso il un nastro trasportatore dell'essiccatore al reparto di confezionamento in MAP (*Modified Atmosphere Packaging*), nella zona *high risk* la cosiddetta "zona rossa". Questo è un luogo ad elevato standard igienico isolato dal restante ambiente produttivo dove l'aria presente al suo interno viene filtrata e sterilizzata, in questo locale si lavora con una pressione positiva dell'aria sterile, questo per evitare flussi di aria non sterile proveniente dall'esterno. Gli operatori che vi operano sono opportunamente formati e per accedere a questa zona l'operatore deve passare attraverso un'anticamera di decontaminazione dove è obbligato ad indossare degli indumenti che rimangono in essa confinati.

All'interno di quest'area *open food* vi è l'uscita dell'essiccatore che immette il prodotto nel caricatore delle bilance multi testa che pesano con precisione il giusto quantitativo di prodotto da confezionare e lo versano sulla vaschetta appena prodotta dalla termoformatrice posta al di sotto della bilancia, il prodotto immesso nella confezione ancora aperta procede verso la confezionatrice che dopo aver sostituito l'aria con una miscela di gas cosiddetti gas di imballaggio tra cui: elio, argon, anidride carbonica, azoto, ecc. la sigilla con un film plastico termosaldabile.

L'uso della tecnologia MAP non deve essere considerata come un mezzo di risanamento o di miglioramento di un prodotto alimentare bensì come un coadiuvante alla conservazione degli alimenti che lavorando in sinergia con altri fattori ne prolunga la *shelf-life*. Scopi di questo tipo di confezionamento sono: a) la diminuzione della quota di ossigeno per limitare i fenomeni ossidativi a carico principalmente delle sostanze grasse; b) il rallentamento dello sviluppo microbico, questo fattore viene favorito e potenziato dalla sinergia MAP/ basse temperature se si utilizza l'anidride carbonica grazie ai fenomeni di assorbimento di quest'ultima nel prodotto che consentono un'ulteriore acidificazione dell'alimento rendendo quindi ancor più efficace l'azione inibente nei confronti dei microrganismi.

La confezione così sigillata viene portata per mezzo di nastri trasportatori al reparto di etichettatura dove viene apposta l'etichetta e vengono eseguiti i controlli di fine linea, ovvero il passaggio attraverso il metal detector per scongiurare il pericolo fisico dato dalla accidentale presenza di corpi metallici, questo opera scartando le eventuali confezioni non conformi e successivamente attraverso una bilancia che misura in continuo il peso di ogni singola confezione scartando anch'essa le confezioni non conformi.

Altri controlli vengono svolti a campione e sono: a) il controllo della miscela di gas all'interno della confezione mediante una strumentazione apposita e b) il controllo dell'effettiva sigillatura della confezione.

Superati questi controlli le confezioni vengono imballate a seconda dell'ordine del cliente, gli imballi poi vengono palettizzati e i pallet così ottenuti vengono stoccati in cella frigo ad una temperatura di $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, in attesa della spedizione al cliente.

Per avere una visione completa della produzione della pasta fresca farcita si riporta il diagramma di flusso descrittivo del processo produttivo (figura 9), le fasi tratteggiate ed in carattere grassetto rappresentano i vari *critical control point* di processo.

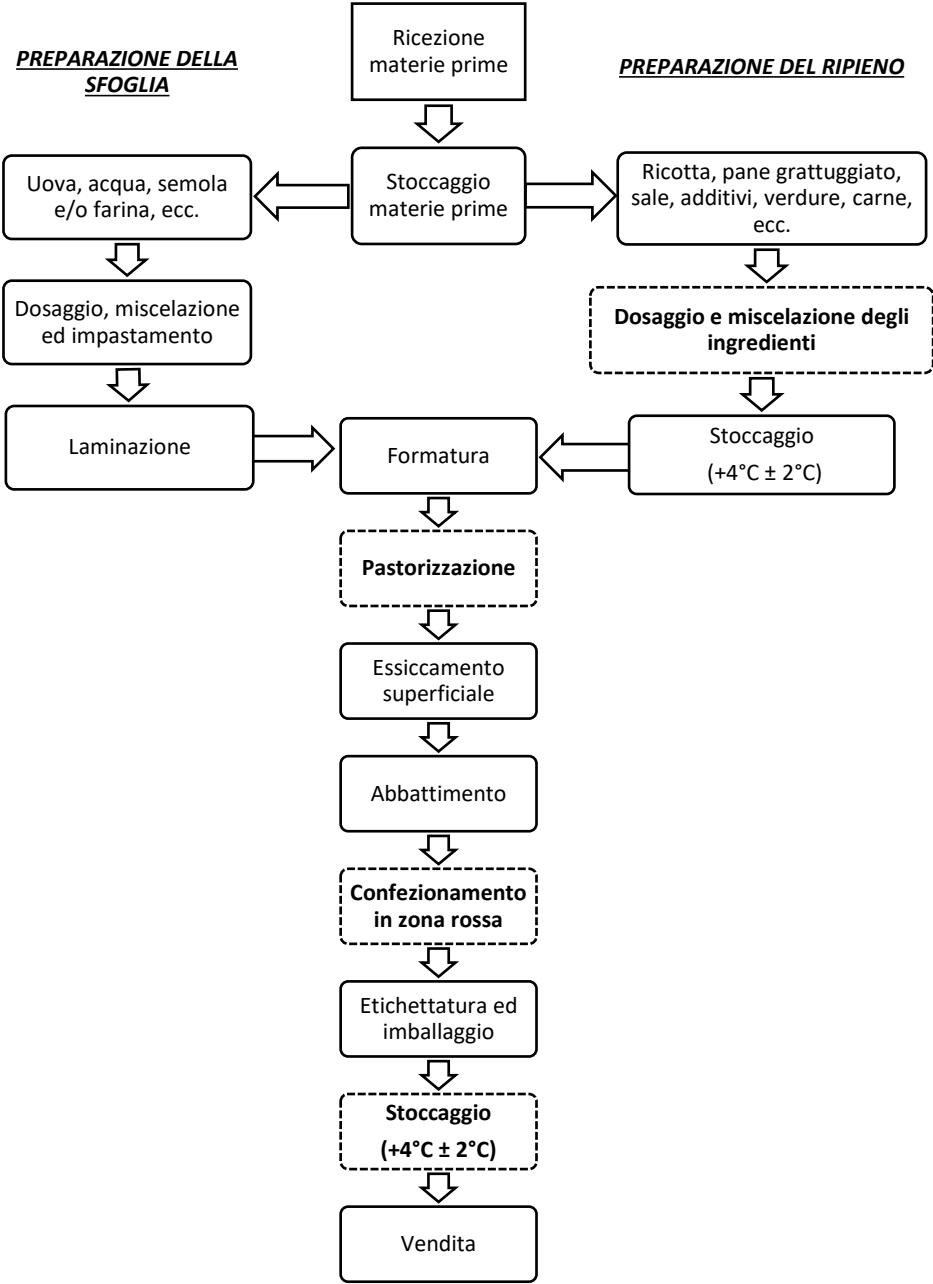


Figura 9: Diagramma di flusso per la produzione della pasta fresca farcita.

4. Il *critical control point* di processo: aggiunta di sale nel ripieno

L'aggiunta dell'ingrediente sale fino assieme agli additivi acidificanti rappresenta il primo *critical control point* di processo per la produzione del semilavorato ripieno. Questo perché l'addizione di questo ingrediente permette la riduzione dell'acqua libera che in combinazione con i bassi valori di pH contrastano lo sviluppo della flora microbica patogena durante la *shelf-life*, permettendo così il controllo del pericolo microbiologico dato dallo sviluppo di microrganismi sporigeni e dalla produzione delle loro tossine (*Clostridium botulinum* non proteolitico e *Bacillus cereus*).

Il pericolo riguardante il CCP in questione è rappresentato da un'aggiunta di sale inferiore a quella stabilita dalla ricetta questo perché se questo si verificasse non si otterrebbe la giusta riduzione dell'acqua libera capace di garantire l'inibizione dei microrganismi sporigeni ($a_w \leq 0.970$).

Allo stato attuale all'interno dell'azienda Voltan, per il controllo del CCP sale si applica un monitoraggio non in continuo utilizzando nel reparto cucina, luogo in cui viene preparato il semilavorato ripieno, una bilancia digitale avente una portata massima di 12 kg ed un errore di pesata di ± 2.0 g.

L'operatore che all'interno del locale cucina si appresta a pesare questa materia prima deve utilizzare solo ed esclusivamente questa bilancia per effettuare le varie pesate del sale.

L'utilizzo esclusivo di questo strumento è dovuto al fatto che questo subisce una taratura con frequenza annuale da un ente esterno e con frequenza settimanale viene svolta una taratura dal personale interno all'azienda utilizzando un peso certificato da 1,0 kg per garantire l'effettiva precisione di pesata.

La bilancia è molto controllata perché con questa si effettua il controllo del primo *critical control point* del processo produttivo del semilavorato ripieno "aggiunta manuale di ingredienti: sale" come si può notare nel diagramma (figura10), la fase tratteggiata e in grassetto evidenzia il *critical control point* in questione.

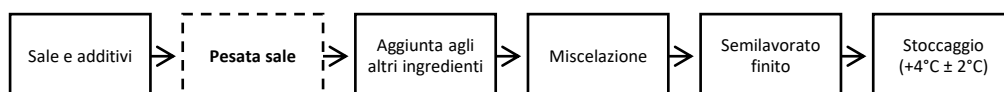


Figura 10: Aggiunta sale e additivi acidificanti.

La procedura operativa che l'operatore deve eseguire per pesare l'ingrediente sale si articola in: a) recupero dal magazzino della materia prima sale, b) pesata della materia prima trascrizione del valore nella distinta di produzione e stampa del rapporto di pesata adesivo che verrà allegato alla medesima, c) miscelazione con le altre polveri, d) miscelazione con gli altri ingredienti con il conseguente ottenimento del semilavorato ripieno.

A questo punto il semilavorato così ottenuto viene riposto all'interno di carrelli in acciaio inox e viene conservato ad una temperatura di $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, in attesa dell'approvazione da parte dell'addetto al controllo qualità, il quale provvede al controllo del rispetto dei limiti stabiliti nel manuale di autocontrollo igienico, per quanto riguarda la pesata del sale effettuata dall'operatore e se i valori sono conformi procede all'approvazione del semilavorato che potrà quindi essere utilizzato, oppure, in caso di non conformità attua l'azione correttiva di eliminazione della pesata effettuando il "blocco" del lotto di semilavorato che verrà quindi sottoposto ad un collaudo da parte dell'assicuratore qualità, il quale mediante la determinazione dell'attività dell'acqua i cui valori devono rientrare tra $0.950 \div 0.970$, ed eventuali analisi microbiologiche, può decidere se "sbloccare" il semilavorato e quindi farlo procedere alla lavorazione oppure eliminare in toto il prodotto non conforme.

Limiti di attenzione e limiti critici di questo *critical control point* sono: a) limite di attenzione stabilito per questo punto critico di controllo è un quantitativo di sale aggiunto inferiore al 10% rispetto a quanto previsto dalla ricetta, b) limite critico è pari ad un quantitativo di sale aggiunto inferiore al 20% rispetto a quanto previsto dalla ricetta.

Per avere una visione più completa del *critical control point* in questione si riporta la tabella descrittiva (tabella 2) nella pagina seguente.

Fase	Pericolo	Gravità del pericolo	Rischio	Misure di controllo del pericolo	CCP	Limiti	Procedure di monitoraggio		Azioni correttive	Registrazioni
							metodologia	frequenza		
Produzione semilavorato ripieno, aggiunta manuale degli ingredienti (sale).	<u>Microbiologico:</u> Proliferazione microrganismi sporigeni (<i>Clostridium botulinum</i> non proteolitico e <i>Bacillus cereus</i>) dovuta ad aggiunta di sale inferiore a quella stabilita dalla ricetta.	Elevato	Basso	Rispetto del dosaggio degli ingredienti di riduzione dell'umidità con abbassamento dell' $a_w \leq 0.970$. Rispetto delle temperature di refrigerazione. GMP locali, attrezzature, personale, controllo infestanti.	SI	<u>Limite di accettabilità:</u> sale aggiunto < del 10% rispetto a quello stabilito. <u>Limite critico:</u> sale aggiunto < del 20% rispetto a quello stabilito.	Determinazione peso mediante bilancia apposta opportunamente tarata con stampa del rapporto di pesata dell'ingrediente.	Ogni pesata.	Blocco del semilavorato da parte del CQ e successivo collaudo da parte dell'AQ. Eliminazione dell'intero lotto non conforme.	Distinta di lavorazione.

Tabella 2: Identificazione del CCP per la produzione del semilavorato ripieno.

5. Validazione di un critical control point

La norma ISO 22000:2005 definisce il termine validazione come: avere l'evidenza che le misure di controllo gestite dal piano HACCP e dall'*operational* PRPs (prerequisiti operativo) sono efficaci (De Gregorio A. et al 2010). La *Food and Drug Administration* (FDA) definisce il processo di validazione come l'evidenza documentata in grado di dimostrare con un elevato grado di garanzia che uno specifico processo produrrà con consistenza un prodotto in accordo con le sue specifiche prestabilite ed attributi di qualità (FDA, 1987); nell'anno 2011 la stessa FDA definisce con il termine di validazione di processo la raccolta e la valutazione dei dati, che inizia con la fase di disegno del processo e prosegue con il processo commerciale, che fornisca evidenza scientifica che un processo è capace di erogare con consistenza prodotti di qualità (FDA, 2011).

Come viene descritto da De Gregorio A. et al 2010, lo scopo della validazione è quindi assicurare che le misure di controllo previste risultino efficaci nel garantire il controllo dei pericoli per la sicurezza alimentare individuati al fine di ottenere dei prodotti finiti conformi ai livelli accettabili stabiliti all'interno del piano aziendale o da limiti di legge. La specifica tecnica ISO/TS 22004:2005 relativa ai Sistemi di gestione per la sicurezza alimentare-Guida all'applicazione della norma ISO 22000:2005 individua una serie di attività che possono essere utilizzate per condurre la validazione e queste sono:

- a) Fare riferimento a validazioni eseguite da altri o a quanto riportato nella letteratura scientifica o a conoscenze storiche;
- b) Eseguire prove sperimentali per simulare le condizioni di processo;
- c) Registrare i dati relativi ai rischi biologici, chimici e fisici nelle normali condizioni operative;
- d) Fare riferimento ai modelli matematici;
- e) Utilizzare delle guide approvate dalle autorità competenti;
- f) Eseguire delle prove per determinare le caratteristiche chimico-fisiche del prodotto (pH, attività dell'acqua, contenuto salino, quantificazione dei conservanti, sistema di confezionamento, ecc.), tenendo presente delle condizioni di processo e di conservazione oltre che della possibilità di contaminazione e della conservabilità prevista.

Oltre ai punti appena citati, gli elementi oggetto della validazione sono:

- a) L'identificazione del pericolo;
- b) L'identificazione del risultato atteso, ovvero quello che ci si aspetta di ottenere dalla modifica apportata oggetto di validazione;
- c) L'identificazione della misura di controllo che deve essere validata (Importanza; capire se è già stata oggetto di validazione e se è consolidata per il controllo di quel determinato punto; ed infine la se è o meno una priorità).
- d) Decidere le modalità o le combinazioni di modalità da usare (letteratura scientifica, dati storici, conoscenze pregresse; raccogliere dati sperimentali significativamente validi; raccogliere dati durante la produzione; utilizzare modelli matematici; e visionare i sondaggi);
- e) Definire i parametri ed i criteri da utilizzare.

La validazione dunque si focalizza sulla raccolta e la valutazione di informazioni scientifiche, tecniche e sperimentali per determinare se le misure di controllo sono capaci di raggiungere il loro scopo in termini di controllo del pericolo.

Di fondamentale importanza è il fatto che ad ogni cambiamento avvenuto all'interno dell'azienda, questa deve provvedere a validare che: a) le misure di controllo apportate siano in grado di ottenere il controllo previsto dei pericoli per la sicurezza alimentare, b) che l'eventuale combinazione di diverse misure di controllo siano efficaci ed in grado di assicurare il controllo dei pericoli identificati per garantire la sicurezza alimentare ed ottenere quindi prodotti finiti che rispondano ai livelli accettabili definiti.

6. Il parametro attività dell'acqua

L'acqua è una componente indispensabile per gli esseri viventi ed è un importante costituente dei cibi, nella metà del secolo scorso, molti studiosi hanno scoperto l'esistenza di una relazione tra l'acqua presente all'interno degli alimenti e la loro tendenza al deterioramento iniziando dunque a rendersi conto che l'attività dell'acqua è molto più importante per la stabilità degli alimenti rispetto alla quantità totale di acqua presente negli stessi.

Scott WJ negli anni 1953 e 1957 ha chiaramente identificato che l'attività dell'acqua di un mezzo è ben correlata con il peggioramento della stabilità degli alimenti a causa della crescita dei microrganismi. Grazie a questi ed a molti altri studi, è stato possibile stabilire delle regole generali per fissare dei limiti relativamente alla stabilità degli alimenti utilizzando il parametro dell'attività dell'acqua piuttosto che utilizzare il parametro dell'acqua contenuta negli alimenti e per questo motivo molti studiosi dei fenomeni degradativi degli alimenti hanno iniziato ad enfatizzare per questo parametro (Rahman MS, 2007).

L'attività dell'acqua infatti influenza non solo la crescita ed il metabolismo dei microrganismi ma determina anche le caratteristiche chimiche e fisiche in quanto supporta le reazioni chimiche ed enzimatiche che si sviluppano nei prodotti alimentari, determinandone le proprietà sensoriali e la loro conservabilità.

L'attività dell'acqua deve quindi essere presa in considerazione in quanto è un parametro importante per la trasformazione dei prodotti alimentari; il valore di questo parametro per i cibi freschi è stato fissato nell'intorno di 0.970 e 0.996 da Chirife J e Fontan CF nel 1982.

Per il controllo di questo parametro è importante considerare le capacità che possiedono i soluti di abbassare la quota di acqua libera negli alimenti. Questo fattore deve essere preso in considerazione quando si selezionano gli ingredienti e gli additivi per la creazione delle formulazioni per la produzione degli alimenti, risulta indispensabile anche conoscere le proprietà dei materiali di imballaggio utilizzati perché questi possono concorrere nell'influenzare questo parametro perché possono verificarsi dei fenomeni di trasferimento di umidità dall'alimento all'ambiente e viceversa (Rahman MS, 2007).

L'attività dell'acqua assieme ad altri parametri concorre a formare la categoria dei fattori intrinseci degli alimenti, questo è un parametro termodinamico e varia nell'intorno di valori compresi tra 0.000 ÷ 1.000 è adimensionale e non coincide con l'umidità. Esiste però una correlazione tra l'umidità relativa percentuale dell'alimento e l'attività dell'acqua che permette di usare questi due parametri indipendenti ponendoli in reciproco rapporto tra loro tramite l'isoterma di assorbimento. L'isoterma di assorbimento è specifica per ogni alimento ed è calcolata ad una specifica temperatura. Le isoterme di assorbimento sono generalmente presentate in forma grafica o di equazione; Braunauer S et al nel 1940, hanno classificato le isoterme di assorbimento in cinque tipologie generali (figura 11), dimostrando che se all'interno degli alimenti sono presenti dei componenti cristallini solubili in acqua come ad esempio zucchero e sale le isoterme appaiono concave (figura 11: III), mentre per la maggior parte degli alimenti queste presentano una forma sigmoideale (figura 11: II).

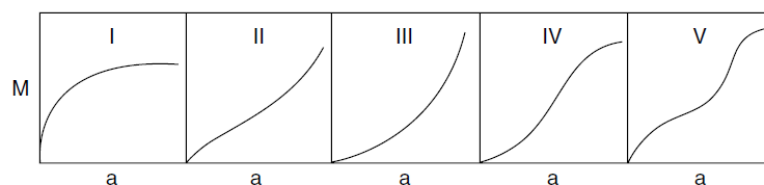


Figura 11: Cinque tipi di isoterme di assorbimento proposte da Braunauer et al, negli assi (a) rappresenta l'attività dell'acqua mentre (M) l'umidità (Rahman MS, 2007).

Il punto di inflessione delle isoterme è indicato dal cambiamento della capacità di legare l'acqua o dall'ammontare relativo dell'acqua libera e dell'acqua legata. Per scopi pratici le isoterme sono presentate come equazioni di modelli empirici o teorici e nessun modello di isoterma presente in letteratura è valido per l'intera scala di valori dell'attività dell'acqua negli alimenti. Tra questi il modello maggiormente accettato per l'ampia gamma di valori di attività dell'acqua che comprende tra 0.10 ÷ 0.90 è il modello Guggenheim-Anderson-de Boer (GAB) (Rahman MS, 2007).

Altro parametro importante è rappresentato dall'isteresi che è data dalla differenza del contenuto umido all'equilibrio tra le curve di adsorbimento e desorbimento (figura 12) in questa immagine si possono notare tre regioni, la prima regione è rappresentativa degli alimenti con alto tenore di zuccheri o essiccati all'aria dove il fenomeno dell'isteresi si presenta principalmente nello strato monomolecolare dell'acqua al di sotto del punto di inflessione dell'isoterma, nella seconda regione l'acqua è tenuta meno stretta e di solito è

contenuta in piccoli capillari, mentre nella terza regione l'acqua è sciolta e contenuta in larghi capillari o risulta libera.

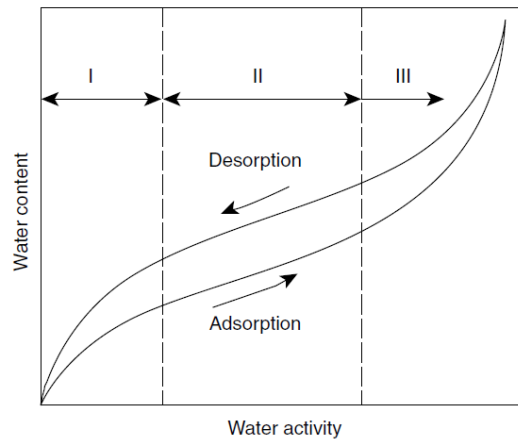


Figura 12: Tipica isoterma di assorbimento dei prodotti alimentari che mostra il fenomeno dell'isteresi (Rahman MS, 2007).

L'implicazione pratica degli effetti dell'isteresi nei fenomeni di deterioramento microbiologico e chimico degli alimenti è importante nelle categorie a bassa ed intermedia umidità e come descritto da Strasser J nel 1969 e successivamente da Wolf M et al nel 1972 questo fenomeno potrebbe essere usato empiricamente come indice di deterioramento della qualità degli alimenti (Rahman MS, 2007).

Altro fattore da tenere presente è che l'attività dell'acqua è dipendente dalla temperatura e questo fenomeno può essere descritto attraverso la forma modificata dell'equazione di Clausius-Clapeyron:

$$\ln \frac{a_{w2}}{a_{w1}} = \frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T2} - \frac{1}{T1} \right]$$

Dove ΔH è il calore di assorbimento isosterico netto in corrispondenza del contenuto di umidità dell'alimento ($J \text{ mol}^{-1}$) cioè il calore necessario per rimuovere un certo quantitativo di acqua; man mano che la quantità d'acqua nell'alimento diminuisce questo valore aumenta perché ci si avvicina sempre di più alla regione dell'acqua legata e quindi sarà necessaria molta energia per togliere ulteriore acqua dalla massa; R è la costante dei gas e T1 e T2 sono due temperature espresse in Kelvin.

Esiste una relazione lineare tra a_w e $1/T$; la pendenza della retta è equivalente a $\Delta H/R$ e grazie a questa relazione è possibile dalla formula precedente risalire a diversi valori di attività

dell'acqua a temperature differenti conoscendo i valori di a_{w1} , T_1 e T_2 e del coefficiente angolare $\Delta H/R$ attraverso la formula:

$$a_{w2} = a_{w1} \exp \frac{\Delta H}{R} \left[\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right]$$

Tipici esempi di variazione dell'attività dell'acqua dovuta alla temperatura con un contenuto umido costante sono le isoterme (figura 13). Il cambiamento dell'attività dell'acqua causato dalla temperatura è dovuto principalmente dalla modificazione dei legami dell'acqua, dalla dissociazione e dallo stato fisico dell'acqua e dall'aumentare della solubilità dei soluti nell'acqua dovuta alla temperatura. L'incremento della temperatura provoca una diminuzione dell'umidità contenuta all'equilibrio (figura 13 a).

Tsami E et al nel 1990, nei loro studi svolti su diverse tipologie di frutta essiccata come ad esempio albicocche, fichi e uva sultanina i quali presentavano valori di attività dell'acqua comprese tra 0.55 ÷ 0.70, hanno osservato che per quei valori di attività dell'acqua si nota la presenza per diverse temperature dell'intersezione delle curve o punto di inversione e questo fatto dipende dalla composizione dell'alimento e dalla solubilità degli zuccheri (figura 13 b) (Rahman MS, 2007).

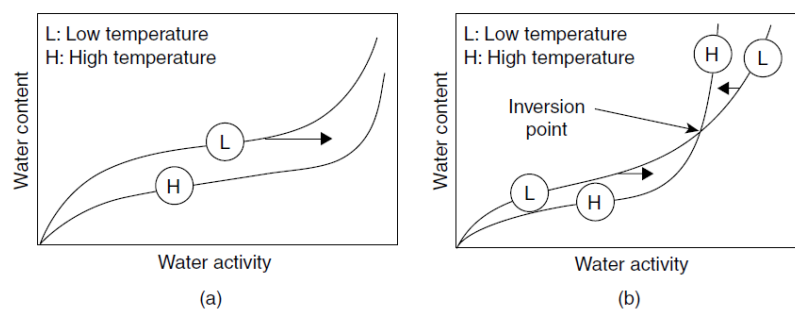


Figura 13: Cambiamento dell'attività dell'acqua negli alimenti dovuto alla temperatura (Rahman MS, 2007).

Dunque se l'attività dell'acqua dipende dalla temperatura anche l'assorbimento di umidità dipenderà dalla temperatura e quindi si può affermare che per un dato valore di umidità si avrà che: a) l'attività dell'acqua aumenterà all'aumentare della temperatura secondo l'equazione di Clausius-Clapeyron, b) per un dato valore di attività dell'acqua la quantità di acqua che può essere trattenuta diminuisce all'aumentare della temperatura sempre secondo l'equazione di Clausius-Clapeyron.

6.1. L'influenza dell'acqua libera negli alimenti e nei metabolismi batterici (*Clostridium botulinum*)

Gli alimenti sono dei sistemi multifasici nei quali le singole fasi o componenti acquistano o cedono umidità verso o dal loro intorno per raggiungere un equilibrio termodinamico con i costituenti delle singole fasi o con l'ambiente. L'acqua si muove all'interno degli alimenti per diffusione in funzione dell'attività dell'acqua che funge da fattore termodinamico per mezzo di fattori che regolano la velocità dei fenomeni diffusivi come ad esempio la temperatura.

L'acqua negli alimenti può essere presente sotto due forme: a) acqua legata, strettamente associata alle componenti solide del sistema e non è soggetta ad evaporazione né tantomeno al congelamento e non partecipa allo sviluppo dei microrganismi, b) acqua libera, rappresenta la parte dell'acqua presente negli alimenti che non è legata ai costituenti chimici dell'alimento ed è quindi disponibile per una molteplicità di reazioni (figura 14), tra cui la crescita di microrganismi, muffe, lieviti, ecc. com'è stato notato inizialmente da Scott nel 1957 e successivamente approfondito da Troller JA nel 1980, molti batteri causa di deterioramento degli alimenti cessano di crescere al di sotto di valori di attività dell'acqua di 0.9; i lieviti invece cessano la loro crescita a valori di attività dell'acqua di 0.85, mentre le muffe invece cessano la loro crescita al di sotto di valori di attività dell'acqua di 0.7 (Labuza TP, 1980).

Come già espresso precedentemente, risulta importante conoscere la quantità di acqua libera negli alimenti in quanto questa svolge un ruolo fondamentale relativamente alla conservabilità degli alimenti influenzando ad esempio lo sviluppo microbico, la texture e la velocità delle reazioni chimiche determinando dunque dei fenomeni di decadimento sensoriale e microbiologico degli alimenti. Si può dunque affermare che quanto più alti saranno i valori dell'acqua libera nell'alimento, tanto più questo alimento sarà deperibile e viceversa.

Per questo motivo negli anni '80 la *Food and Drug Administration* ha introdotto il concetto di attività dell'acqua nei suoi regolamenti riguardanti le *good manufacturing practice* (GMP), delineando delle specifiche condizioni per gli alimenti in funzione della loro categoria di appartenenza (disidratati, ad umidità intermedia, in scatola a bassa acidità e acidificati) per il controllo e la misurazione del parametro dell'attività dell'acqua questo per proteggere

consumatore dalla possibile presenza di fenomeni di deterioramento e da microrganismi patogeni (Labuza TP, 1980).

Come si può notare nel grafico (figura 14), a diversi valori di attività dell'acqua corrispondono diversi punti di innesco dei vari fenomeni degradativi degli alimenti. Lo sviluppo dei microrganismi si ha a partire da valori di attività dell'acqua al di sopra di 0.80; è importante considerare che ogni specie microbica possiede: a) un proprio intervallo di attività dell'acqua ottimale b) un'attività dell'acqua minima di crescita. E che molti degli alimenti più comuni possiedono valori di attività dell'acqua compatibili con la crescita della maggior parte dei microrganismi siano essi patogeni o meno.

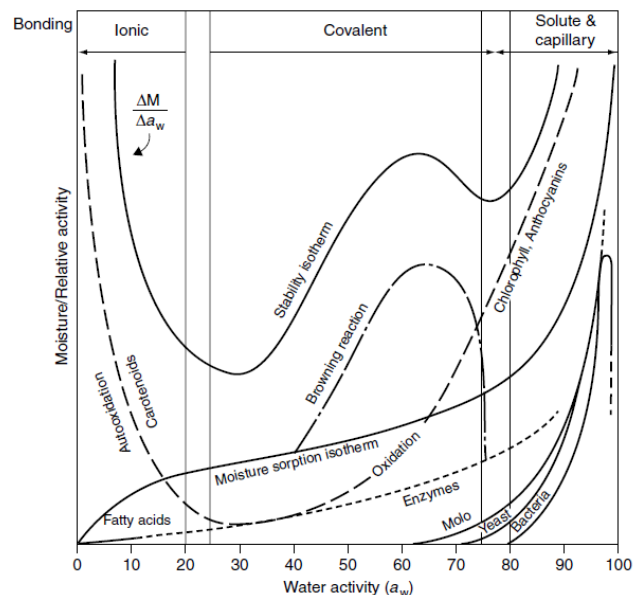


Figura 14: Stabilità degli alimenti in funzione dell'attività dell'acqua proposto da Rockland LB nel 1987 (Rahman MS, 2007).

Il valore minimo di attività dell'acqua per la crescita microbica è dato dal valore al di sotto del quale il microrganismo o il gruppo di microrganismi non riesce a riprodursi, nel grafico riportato nella pagina seguente (figura 15), si può vedere che la porzione iniziale della curva è rappresentata dalla *lag* fase aumenta al diminuire del valore dell'attività dell'acqua e che anche le restanti fasi (*log* e stazionaria) vengono influenzate dall'attività dell'acqua (Rahman MS, 2007).

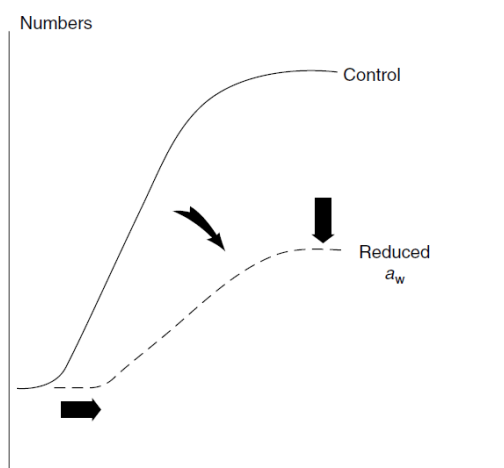


Figura 15: Ipotetica curva dell'effetto dato dalla riduzione dell'attività dell'acqua sulla crescita microbica proposto da Troller JA nel 1987, dove nell'asse delle ordinate è posto un ipotetico numero di microrganismi mentre l'asse delle ascisse rappresenta il valore dell'attività dell'acqua (Rahman 2007).

La riduzione dell'attività dell'acqua si può attuare attraverso l'utilizzo di diversi soluti i quali possono avere effetto sul valore minimo di attività dell'acqua per la crescita dei microrganismi patogeni di interesse alimentare (tabella 3).

Bacteria	NaCl	KCl	Sucrose	Glucose
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.920	–	0.920	–
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.935	0.936	0.940	–
<i>Clostridium botulinum G</i>	0.965	–	0.965	–
<i>Clostridium botulinum E</i>	0.972	0.972	0.972	0.975
<i>Clostridium perfringens</i>	0.945	–	–	0.946
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.864	0.864	0.867	–

^aIn laboratory media, water activity adjusted with salts (NaCl and KCl) or sugars (sucrose and glucose).
Source: Chirife, J. 1994. *J. Food Eng.* 22: 409–419.

Tabella 3: Effetto dovuto alla riduzione dell'attività dell'acqua operata attraverso l'utilizzo di diversi soluti sul valore di attività dell'acqua minimo per la crescita dei microrganismi (Rahman MS, 2007).

Anche i metabolismi secondari dei microrganismi come la produzione delle tossine vengono influenzati dai bassi valori di attività dell'acqua e inoltre anche i fattori che influenzano la formazione delle spore possono influenzare la formazione dei metaboliti. Beuchat LR nel 1981 ha riassunto all'interno di una tabella l'effetto dell'attività dell'acqua nella formazione riguardo alla produzione delle tossine di alcuni microrganismi patogeni comunemente associati agli alimenti (tabella 4) (Rahman MS, 2007).

Bacteria	Minimal Water Activity for		
	Growth	Toxin Production	Toxin
<i>Bacillus cereus</i>	0.93–0.95	–	–
<i>Clostridium botulinum</i>	0.93–0.95	0.94–0.95	Type A
	0.93–0.94	0.94	Type B
	0.95–0.97	0.97	Type E
<i>Clostridium perfringens</i>	0.93–0.95	–	–
<i>Salmonella</i> spp.	0.92–0.95	–	–
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.86–0.87	0.87–0.90	Enterotoxin A
	0.86–0.87	0.97	Enterotoxin B
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0.94	–	–

Source: Beuchat, L. R. 1981. *Cereal Foods World* 26: 345–349.

Tabella 4: Formazione della tossina in funzione del valore di attività dell'acqua di alcuni microrganismi di interesse alimentare (Rahman MS, 2007).

Molti studi pubblicati in letteratura hanno dimostrato l'effetto che si ottiene dalla riduzione dell'attività dell'acqua utilizzando diversi soluti, soprattutto per quel che riguarda la germinazione delle spore e la produzione della tossina in diverse matrici.

Per quel che riguarda la germinazione delle spore di *Clostridium botulinum* Jakobsen JM e Murrell WG nel 1977, hanno dimostrato che esiste una forte inibizione della germinazione delle spore se il livello di attività dell'acqua è regolato da diversi soluti tra cui sali come NaCl e CaCl₂ e la germinazione delle spore di *Clostridium botulinum* risultano essere completamente inibite a valori di attività dell'acqua pari a 0.950 in presenza di cloruro di sodio oppure di cloruro di calcio, mentre se venivano utilizzati altri soluti come l'urea, il glicerolo o il glucosio non si otteneva lo stesso effetto inibitorio (Jakobsen JM, Murrell WG, 1977). Troller JA nel 1972, riporta che negli studi eseguiti da Baird-Parker AC e Freame B, nel 1967, relativi alla germinazione delle spore di *Clostridium botulinum* questi hanno osservato che il valore minimo di attività dell'acqua per la germinazione delle spore dei tipi A, B ed E variava con il soluto scelto per la regolazione dell'attività dell'acqua e nel dettaglio hanno notato che nel caso in cui l'attività dell'acqua veniva regolata con il cloruro di sodio, le spore germinavano ad un minimo di attività dell'acqua di 0.930, mentre se si utilizzava il glicerolo queste germinavano a valori di 0.890. Pedersen HO nel 1957 ha testato la concentrazione di sale che inibisce la germinazione delle spore nelle salamoie saline per diversi tipi di *Clostridium botulinum* A, B ed E, osservando che la germinazione delle spore era prevenuta rispettivamente per i ceppi proteolitici di tipo A e B da una concentrazione di sale del 7.4% e 6.4% mentre per il ceppo non proteolitico (tipo E) la concentrazione inibente era pari a 4.1% di cloruro di sodio. Un altro studio condotto da Yesair J e Cameron EJ nel 1942 ha valutato diversi sali riportando che il cloruro di sodio era migliore nell'inibire la germinazione della spora rispetto agli altri e che una concentrazione del 5.0% di sale inibiva al 100% la

germinazione delle spore, mentre usando in associazione sale e nitrato di sodio rispettivamente alla concentrazione del 3.5% e del 0.188%, l'inibizione interessava solo il 99.6% delle spore (Troller JA, 1972). Roberts TA e colleghi nel 1976, hanno notato che la migliore concentrazione inibente di cloruro di sodio nella matrice carne di maiale si otteneva con valori pari a 1.8 o 3.5% di sale ad una temperatura di incubazione di 15°C (Troller JA, 1985).

Il grafico (figura 16) riporta l'effetto dato dalla riduzione dell'attività dell'acqua utilizzando soluti come cloruro di sodio e glicerolo relativamente allo sviluppo di *Clostridium botulinum* ed altri microrganismi patogeni di interesse alimentare come proposto da Chirife J e Buera MDP nel 1996.

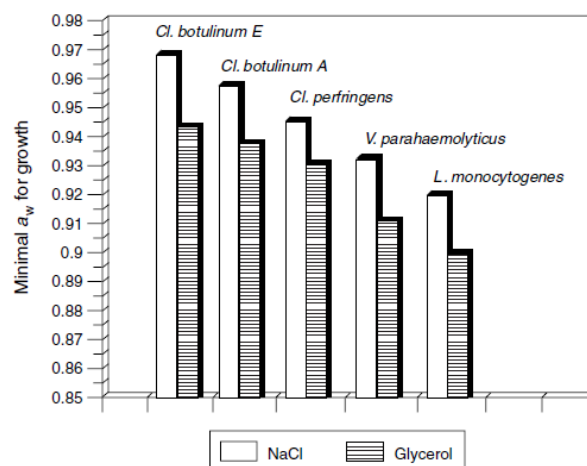


Figura 16: Effetto dato dall'utilizzo di sale e glicerolo per abbassare l'attività dell'acqua sullo sviluppo di diversi microrganismi in relazione all'attività dell'acqua minima necessaria (Rahman MS, 2007).

Per quel che riguarda la produzione delle tossine all'interno degli alimenti da parte di *Clostridium botulinum*, Troller JA nel 1985 riporta che in uno studio condotto da Hilsheimer R e Hauschild AHW nel 1979, questi hanno dimostrato che il tipo non proteolitico E inoculato in un prodotto simile al caviale non produce la sua tossina se la percentuale di cloruro di sodio presente nella fase acquosa è maggiore o uguale al 5.56% con un valore di attività dell'acqua pari a 0.960 e con un pH inferiore a 5.0. Pleyor GA e colleghi nel testare due tipi di Sali NaCl e NaNO₃ con due ceppi di *Clostridium botulinum* (A ed E), hanno dimostrato che una concentrazione di cloruro di sodio del 3.8% di sale per il non proteolitico, e del 6.1% di sale per il proteolitico era sufficiente per inibire la produzione della tossina e che in ogni caso se si effettuava l'aggiunta del nitrato di sodio in associazione al sale si notava un decremento

dell'azione inibente. Smoot LA e Pierson MD nel 1979 hanno dimostrato la diversità dell'effetto inibente dato dal sale e dal saccarosio ottenendo che la formazione della tossina era nulla o abbattuta di molto con una concentrazione del 5-6% di sale, mentre per ottenere gli stessi effetti inibenti serviva una concentrazione del 30% di saccarosio (Troller JA, 1985); mentre Pivnick H e Barnett H nel 1966, hanno dimostrato che in differenti preparazioni a base di carne la produzione della tossina de ceppo non proteolitico E veniva completamente inibita a concentrazioni di cloruro di sodio dello 2.7%. (Troller JA, 1972). Chang P.C. e colleghi nel 1977, svolgendo delle prove su salmone affumicato conservato in film impermeabile all'ossigeno ed inoculato con 10^2 spore per grammo di *Clostridium botulinum* tipo E ed A, hanno visto che la produzione di tossine da parte dei tipi E ed A è stata inibita in 7 giorni, rispettivamente con il 3.8 e il 6.1% di NaCl nella fase acquosa (Jay J.M. et al. 2008).

La tossina botulinica rappresenta l'agente eziologico del botulismo. Questa malattia alimentare è causata da alcuni ceppi di *Clostridium botulinum*, un microrganismo avente forma di bastoncino Gram-positivo, ubiquitario, anaerobio, sporigeno. Le spore di questo microrganismo sono le forme di quiescenza della cellula e sono molto resistenti al calore infatti occorre una temperatura di 121°C per 30 minuti perché queste siano distrutte. La tossina prodotta da questo microrganismo è un'esotossina (neurotossina) solubile altamente letale che se ingerita attraverso l'assunzione dell'alimento contaminato provoca la paralisi flaccida a carico dei muscoli e degli organi con funzione secretoria. La neurotossina interferisce con la liberazione di acetilcolina agendo sulle giunzioni neuromuscolari e ne blocca la trasmissione neurale a livello delle sinapsi colinergiche e a livello delle terminazioni presinaptiche portando alla morte il soggetto colpito (Poli G. et al, 2008); di fondamentale importanza è il fatto che questa tossina è termolabile e bastano 5 minuti di ebollizione per distruggerla. Sulla base della specificità sierologica della tossina, si riconoscono di sette tipi di *Clostridium botulinum*: A, B, C, D, E, F, G; tra questi quelli che provocano disturbi all'uomo sono i tipi A, B, E, F e G.

I diversi tipi sono stati differenziati in base al loro substrato d'elezione in:

- a) Proteolitici in quanto metabolizzano la caseina producendo H_2S , questi sono i tipi A e G ed alcuni di tipo B e F;
- b) Non proteolitici, in quanto a differenza dei precedenti fermenta il mannosio questa categoria è rappresentata dal tipo E.

Tra queste due categorie inoltre si riscontrano anche altre diversità come si può notare nella tabella 3. In relazione alla termoresistenza mostrata le spore possono essere suddivise in spore a bassa resistenza termica (come quelle di *Clostridium botulinum* tipo E), media resistenza termica (come ad esempio quelle di *Clostridium botulinum* tipi A e B), alta e altissima resistenza termica (Gardini F, Parente E 2013), le spore sono molto termoresistenti e possono dunque sopravvivere ai processi di cottura e pastorizzazione dei cibi e se, una volta confezionato il prodotto alimentare si verificano alcune condizioni favorevoli quali l'anaerobiosi, $pH > 4.5$, $a_w > 0.970$, temperatura $> 3.3^{\circ}C$, ecc. (tabella 5), queste possono originare la forma vegetativa con conseguente produzione della tossina.

Proprietà	Proteolitico	Non proteolitico
Gruppo di appartenenza	I	II
Temperatura minima di crescita($^{\circ}C$)	10 - 12.5	3.3
Temperatura massima di crescita ($^{\circ}C$)	50	45
pH minimo di crescita	≤ 4.5	≤ 4.5
a_w minima per la crescita	0.940	0.970
NaCl massimo di crescita (%)	10	5 - 6

Tabella 5: Principali differenze tra *C. botulinum* proteolitico e non proteolitico (modificata da: Jay J. M. 2009).

Altro parametro che si deve tenere in considerazione per contrastare la moltiplicazione di questo microrganismo è la competizione tra microrganismi altrimenti detto antagonismo, in quanto è stato dimostrato che *Clostridium botulinum* non può crescere e nemmeno produrre la sua tossina in competizione con elevate concentrazioni di altre specie microbiche come ad esempio i batteri lattici, questo fenomeno è denominato antagonismo lattico. Si è visto inoltre che in presenza di lieviti *Clostridium botulinum* si sviluppa e produce tossina a valori di pH paria 4.0 e questo fa presumere che i lieviti producano dei fattori di crescita essenziali per lo sviluppo dei clostridi a bassi valori di pH (Jay J.M. et al. 2008).

6.2. Tecniche per la misurazione dell'attività dell'acqua

Per definizione l'attività dell'acqua è il rapporto tra la pressione di vapore p_{vi} sulla superficie del prodotto e la pressione di vapore p_{vsw} dell'acqua pura alla stessa temperatura (Friso D, Niero M 2010):

$$a_w = \frac{p_{vi}}{p_{vsw}}$$

La misurazione di questo parametro può essere effettuata attraverso diversi modi i quali possono essere strumentali o meno alcuni esempi sono:

- Igrometro a punto di rugiada, questo metodo per la determinazione della pressione di vapore è uno dei più usati ed è basato sui principi fondamentali della termodinamica. Questi strumenti sono veloci, accurati, precisi e semplici da usare, misurano un ampio range di attività dell'acqua da 0.030 a 1.000 con una risoluzione del ± 0.0001 di attività dell'acqua e un'accuratezza di ± 0.003 di attività dell'acqua. Il tempo di analisi tipico per questo strumento è inferiore a 5 minuti (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

Questo metodo si basa sul principio che l'aria può essere raffreddata senza che questa subisca una variazione del suo contenuto umido fino alla temperatura di saturazione, questa temperatura può essere quindi determinata osservando l'esatto momento in cui avviene la condensazione su di una superficie fredda.

In questi strumenti il campione una volta inserito nella camera di misurazione entra in equilibrio igroscopico con lo spazio di testa di quest'ultima. La camera al suo interno contiene lo specchio raffreddato, il sensore ottico, una ventolina e un termometro ad infrarossi (figura 17). Il raffreddatore termoelettrico (*Peltier*) controlla con precisione la temperatura dello specchio e una termocoppia posta dietro allo specchio misura accuratamente la temperatura di rugiada quando avviene l'inizio della condensazione dell'acqua sulla superficie dello specchio. Il punto preciso in cui avviene la condensazione viene rilevato dal sensore ottico il quale emette un fascio di luce infrarossa diretto allo specchio che viene riflesso dallo stesso ad una fotocellula la quale determina così l'esatto punto di rugiada, questo succede perché la condensa che si viene a formare sulla superficie dello specchio fa variare la capacità riflettente di quest'ultimo e appena la fotocellula avverte la variazione

induce alla misurazione della temperatura della superficie dello specchio tramite un termometro ad infrarossi che determina dunque la temperatura di rugiada (T_d) e allo stesso tempo determina anche la temperatura del campione inserito (T_s), queste due temperature sono usate dal processore interno dello strumento per determinare il valore dell'attività dell'acqua attraverso l'equazione:

$$a_w = \frac{p_0(T_d)}{p_0(T_s)}$$

Lo scopo della ventolina è quello di far circolare l'aria per ridurre il tempo di equilibratura del vapore e controllare la conduttanza del bordo della superficie dello specchio.

Questo strumento ha come unica limitazione il fatto che risente della presenza ad alte concentrazioni dei composti volatili presenti all'interno del campione come etanolo, acido acetico, propilene glicole, ecc., in quanto possono co-condensare sullo specchio falsando la misurazione (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

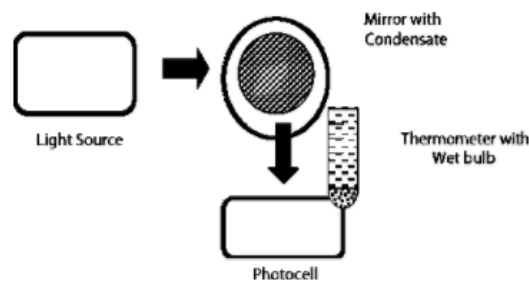


Figura 17: Schema esemplificativo del funzionamento del sistema di misurazione mediante igrometro a punto di rugiada (www.fao.org).

Questa tecnica è quella che è stata utilizzata per determinare l'attività dell'acqua durante le prove svolte per produrre questo elaborato, grazie ad uno strumento che sfrutta questo principio L'AQUALAB CX-2.

- Manometro a pressione di vapore (figura 18), questo metodo determina l'attività dell'acqua misurando direttamente la pressione di vapore al di sopra dell'alimento. Il principio di questa tecnica si basa sul fatto che il contenuto di umidità di un alimento è correlato alla pressione di vapore a temperatura costante e questa può essere misurata mediante un manometro.

L'attività dell'acqua viene calcolata tenendo conto dell'equilibrio termico e della pressione attraverso la formula:

$$a_w = \frac{(\Delta h_1 - \Delta h_2)}{P_w^v} \rho g$$

Dove P_w^v è la pressione di vapore dell'acqua pura (Pa), ρ è la densità dell'olio del manometro (kg/m^3), g è l'accelerazione di gravità (m/s^2), e h_1 e h_2 sono i valori delle letture dell'altezza che ha raggiunto l'olio del manometro (m).

L'accuratezza di questo metodo è del ± 0.005 di attività dell'acqua per campioni con valori di $a_w < 0.85$ e questa decresce a ± 0.02 di attività dell'acqua per campioni con valori di attività dell'acqua alti. Il controllo della temperatura rappresenta il punto critico per l'accuratezza nella determinazione dell'attività dell'acqua per questo metodo. Lewicki PP et al nel 1978 hanno dimostrato che l'accuratezza di misurazione può essere migliorata tenendo conto della differenza tra la temperatura del campione e quella dello spazio di testa. Nunes RV et al nel 1985 riportano un'accuratezza di ± 0.009 di attività dell'acqua nell'intervallo di valori di attività dell'acqua tra 0.75 e 0.97 del campione, inoltre per incrementare la precisione di questo metodo, Rizvi SSH nel 1986 suggerisce di mantenere le seguenti condizioni durante la misurazione: a) temperatura costante per tutto il sistema, b) un rapporto tra il volume del campione ed il volume dello spazio di vaporizzazione abbastanza grande da minimizzare il cambiamento in attività dell'acqua a causa della perdita di acqua per vaporizzazione, c) una bassa densità e una bassa pressione di vapore dell'olio usato come fluido per il manometro.

Questo metodo risulta inadatto per campioni contenenti composti volatili in quanto questi contribuirebbero a far variare la pressione di vapore e inquinerebbero l'olio del manometro cambiandone le proprietà nel tempo, inoltre la respirazione dei microrganismi e delle muffe impediscono il raggiungimento dell'equilibrio della pressione di vapore e questo sistema può essere dunque reso inutilizzabile da prodotti che respirano come ad esempio granaglie e fritta a guscio, prodotti con attiva fermentazione o prodotti che si espandono eccessivamente in condizioni di vuoto spinto (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

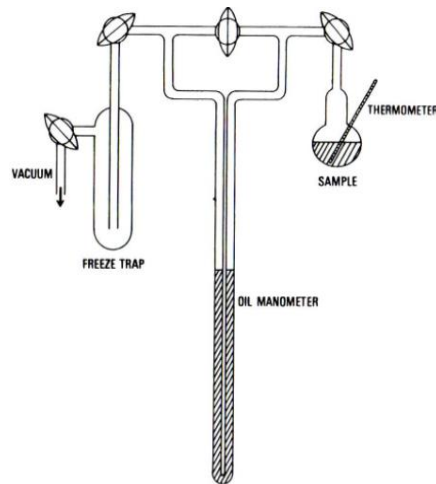


Figura 18: Esempio di misuratore a manometro a pressione di vapore (www.aqualab.com).

- Igrometro a capello o polimerico, questo metodo si basa sulla variazione della lunghezza dei capelli o dei filamenti polimerici in poliammide al variare dell'umidità di equilibrio all'interno di un sistema chiuso in cui viene inserito il campione.

Lo strumento è costruito unendo molti filamenti polimerici o di capello e fissando le estremità di questi filamenti sono da un capo ancorati ad un punto fisso e dall'altro capo invece vengono adesi ad un sistema di leveraggi che attraverso un indicatore mostra la variazione al cambiamento dell'umidità relativa in una scala.

Per effettuare la misurazione si pone il campione all'interno dell'igrometro che contiene al suo interno il sistema di rilevazione e successivamente si procede sigillando e mantenendolo ad una temperatura costante la strumentazione, dopo un tempo di 3 ore, tempo necessario al sistema per entrare in equilibrio, si può procedere alla lettura del valore dell'attività dell'acqua. Alcuni studi condotti da Labuza TP nel 1977, suggeriscono che il tempo per entrare in equilibrio con campioni aventi elevati valori di attività dell'acqua risultano di molto superiori alle 3 ore.

Il range di misurazione di questo strumento varia tra valori di attività dell'acqua dello 0.3 e 1.0 ed ha una buona accuratezza di misura nell'intorno di valori di attività dell'acqua dello $0.3 \div 0.8$, tipicamente questo metodo presenta un limite di accuratezza del $\pm 0.02 \div 0.03$ di attività dell'acqua, poiché dimostra una spiccata sensibilità al fenomeno dell'isteresi; Rodel W et al nel 1975 e successivamente Jakobsen M nel 1983 hanno dimostrato che si può ottenere un'accuratezza di misurazione del ± 0.01 ad una temperatura costante di 25°C con una sufficiente temperatura di equilibrizzazione del campione e usando delle tecniche di assorbimento

per prevenire gli effetti dovuti al fenomeno dell'isteresi. Inoltre con questo metodo non possono essere determinati campioni con sostanze volatili in quanto queste determinano un danneggiamento del sistema di misurazione. Al giorno d'oggi questo strumento viene utilizzato per determinare approssimativamente il valore dell'attività dell'acqua (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

- Metodo dell'equilibrio isopiastico, questo metodo consente di determinare l'attività dell'acqua negli alimenti collegando il contenuto di acqua del campione all'attività dell'acqua utilizzando un'isoterma di assorbimento.

Per la determinazione si procede posizionando una quantità nota di campione all'interno di una campana di vetro a chiusura ermetica (figura 19), attraverso la quale è possibile raggiungere l'equilibrio ad una temperatura costante o attraverso un'atmosfera di cui si conosce l'umidità di equilibrio (ERH), oppure, utilizzando del materiale di riferimento di cui si conosce l'isoterma di assorbimento ad una determinata temperatura. L'equilibrio tra l'ambiente ed il campione viene determinato attraverso la determinazione del peso a diversi intervalli di tempo fino al momento in cui il peso del campione risulta essere costante.

La determinazione dell'attività dell'acqua attraverso il metodo isopiastico come precedentemente descritto può essere effettuata attraverso due protocolli: il primo protocollo prevede che l'isoterma di assorbimento dell'umidità venga creata per un campione utilizzando delle atmosfere a umidità di equilibrio nota. Questa isoterma viene creata a partire da una serie di campane ermetiche ad umidità controllata usando del sale saturo standard (figura 19). L'attività dell'acqua del sale varia a seconda della temperatura e i campioni che sono posizionati in queste campane una volta chiuse si equilibrano con l'attività dell'acqua del sale presente in esse e una volta raggiunto l'equilibrio tra il campione e il sale si può determinare la quantità di acqua pesando i campioni. Adottando questo protocollo sono necessari molti giorni o addirittura settimane per raggiungere l'equilibrio in condizioni di aria statica. Una volta che l'isoterma di assorbimento per il campione è stata stabilita, l'attività dell'acqua può essere determinata dal contenuto di umidità usando questa isoterma. Il secondo protocollo invece prevede la determinazione dell'attività dell'acqua attraverso l'equilibratura dell'attività dell'acqua del campione con piccole quantità

di un materiale di riferimento. Di questo materiale si conosce il valore dell'isoterma di assorbimento dell'umidità (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007). Il materiale di riferimento è in genere cellulosa microcristallina della quale appunto è nota l'isoterma di assorbimento, questo materiale viene posto assieme al campione da analizzare in un essiccatore a vuoto ad una temperatura costante e si attende che questo raggiunga l'equilibrio per un tempo che può variare dalle 24 alle 48 ore a seconda dell'attività dell'acqua del campione. L'umidità che viene determinata sul materiale di riferimento restituisce il valore dell'attività dell'acqua mediante la costruzione di un'isoterma di assorbimento.

Questo metodo presenta una buona accuratezza a valori alti di attività dell'acqua, semplicità d'uso ed economicità, presenta degli svantaggi come l'elevato tempo di analisi e la necessità di diversi essiccatori a vuoto (www.aroundlabnews.com), altri svantaggi sono rappresentati dal fatto che i lunghi periodi necessari per raggiungere l'equilibrio e l'alto valore di umidità possono favorire lo sviluppo di microrganismi i quali possono invalidare la prova, inoltre le aperture delle campane per determinare il peso possono minare l'equilibrio tra il campione e l'atmosfera che si era creata all'interno della campana oltre al fatto che la differenza di temperatura tra i campioni e lo standard possono essere causa di errore (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

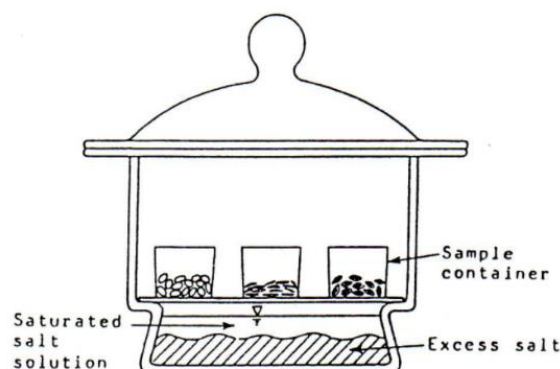


Figura 19: Esempio di campana di per ottenere l'equilibrio isopiastico (www.aqualab.com).

- Igrometro elettrico, questo sistema funziona in base al principio della misura della conducibilità o della resistenza di un sale o di un polimero igroscopico in funzione dell'umidità attraverso dei rilevatori capacitivi chiamati dielettrici di cui è dotato l'igrometro.

Questi rilevatori misurano l'umidità di equilibrio tramite un sensore il cui dielettrico ovvero la capacità di isolare elettricamente due strati in cui passa una tensione varia al variare dell'umidità (figura 20). La misurazione è possibile perché il sale o il polimero che si trova in equilibrio con l'ambiente atmosferico varia la sua conducibilità una volta che viene introdotto il campione nello strumento in funzione dell'assorbimento o desorbimento di umidità e questa variazione viene misurata e tradotta in un segnale elettrico che a sua volta fornisce un valore numerico.

Questo metodo necessita di tempi di analisi superiori alle 2 ore e risulta di facile utilizzo (elearning.unite.it), gli strumenti che adottano questo metodo consentono la misurazione dell'attività dell'acqua nell'intero range da 0.0 a 1.0 con una risoluzione di ± 0.001 di attività dell'acqua ed un'accuratezza che varia tra $0.01 \div 0.02$ di attività dell'acqua (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

Questi sensori hanno dei vantaggi in quanto sono poco influenzati da elementi volatili, presentano degli svantaggi in quanto la misurazione necessita di una compensazione con la temperatura e il sensore risente dei fenomeni di isteresi ed è quindi consigliabile una calibrazione annuale (www.aroundlabnews.com).

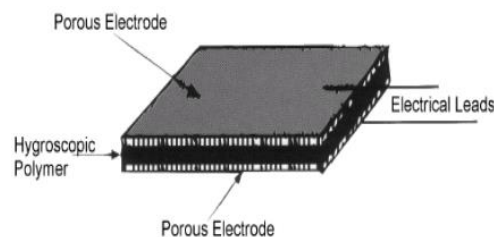


Figura 20: Esempio di sensore dielettrico (www.aroundlabnews.com).

- Abbassamento del punto crioscopico, questo metodo si basa sul principio che l'abbassamento del punto di congelamento di una soluzione è direttamente correlato all'abbassamento della tensione di vapore in equilibrio con la soluzione rispetto a quella dell'acqua pura alla stessa condizioni di temperatura e pressione (www.elearning.unite.it).

Quando è presente del ghiaccio nell'alimento, questo esercita una pressione di vapore che dipende solo dalla sua temperatura, nello stato congelato l'attività dell'acqua può essere misurata attraverso la formula:

$$a_w = \frac{p_{ice}}{p_{supercooled\ water}}$$

Dove: p_{ice} e $p_{supercooled\ water}$ sono rispettivamente la pressione di vapore sopra il ghiaccio e la pressione di vapore sopra l'acqua *supercooled* alla stessa temperatura.

Il punto di congelamento dell'acqua negli alimenti è basato sulle proprietà colligative (legge di Raoult) dei campioni, il punto di congelamento corrisponde alla temperatura a cui la pressione di vapore della fase solida e della fase liquida dell'acqua sono uguali. La composizione e la concentrazione dei soluti all'interno degli alimenti influenzano la temperatura di congelamento dell'acqua e l'attività dell'acqua viene determinata a questa temperatura.

Questo metodo è limitato a soluzioni con $a_w > 0.80$ è di semplice utilizzo, preciso e non è influenzato dalle componenti volatili; anche se in linea teorica questo metodo può risultare semplice in pratica invece rilevare il punto in cui l'acqua congela è piuttosto difficile.

Questo metodo consente la misurazione di valori di attività dell'acqua tra 0.8 e 1.0 con un'accuratezza fino a ± 0.001 con tempi di analisi di 5 – 20 minuti questo metodo è specifico per analisi su carne e suoi derivati (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

- Psicrometro a termocoppia, questo metodo permette una determinazione diretta della pressione di vapore al di sopra dell'alimento. Lo psicrometro misura la temperatura a bulbo umido relazionandola alla pressione di vapore attraverso l'equazione:

$$p = p_0(T_w) - Y P_a (T_d - T_w)$$

Dove: $p_0(T_w)$ è la pressione del vapore saturo alla temperatura del bulbo umido, Y è la costante psicrometrica ($6.66 \times 10^{-4} \text{ C}^{-1}$), P_a è la pressione dell'aria, T_d e T_w sono rispettivamente la temperatura dell'ambiente a bulbo secco e a bulbo umido.

La misurazione della temperatura a bulbo umido viene effettuata attraverso una termocoppia di dimensioni minute che viene posizionata al di sopra del campione all'interno di un contenitore sigillato contenente oltre alla termocoppia anche 15 ml di liquido. Una piccola goccia di acqua viene fatta condensare tra la giunzione della termocoppia e la superficie. Quando l'acqua evapora il calore latente di evaporazione, raffredda il termometro a bulbo umido, così l'attività dell'acqua (p/p_0) viene calcolata usando l'equazione sopra riportata e confrontando il valore così ottenuto della pressione di vapore saturo (p_0) alla temperatura dell'aria con dei valori tabulari (tabella 5).

Temperature (°C)	P_0 (kPa)
0	0.61
5	0.87
10	1.23
15	1.70
20	2.34
25	3.17
30	4.24
35	5.62
40	7.38
45	9.58
50	12.34

Tabella 5: Pressione di vapore dell'acqua in funzione della temperatura (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

La caratteristica migliore di questo metodo è che garantisce un'accuratezza di misura in un ampio range di valori di attività dell'acqua e a valori di attività dell'acqua prossimi a 1.0 presenta un'accuratezza di ± 0.0005 di attività dell'acqua. Il range che limita la misurazione dell'attività dell'acqua per questo metodo è fissato a valori di $a_w > 0.93$ in quanto risulta difficile condensare l'acqua all'interno della termocoppia al di sotto di questo livello di attività dell'acqua. Il tempo di analisi per questo metodo si aggira nell'intorno di 1 ora (Barbosa-Cànovas GV et al, 2007).

Un esempio di calcolo matematico può essere la determinazione dell'acqua libera prevede l'applicazione della legge di Raoult sulle frazioni molari, dove il numero di moli di acqua pura in una soluzione che corrispondono a 55.5 viene diviso per il numero totale di moli della soluzione applicando la seguente formula:

$$a_w = \frac{\text{moli di acqua}}{\text{moli di acqua} + \text{moli di soluto}}$$

Questo metodo presenta dei limiti perché sebbene la formula sia corretta, fornisce dei risultati approssimativi in quanto non tiene conto del fatto che i sistemi alimentari sono resi complessi da ingredienti che interagiscono con l'acqua con dei modi difficili da prevedere.

6.3. Metodi per abbassare l'acqua libera negli alimenti

La maggior parte dei cibi presenta valori di attività dell'acqua elevati e questi possono essere ridotti fino al 50% mediante l'essiccazione degli alimenti attraverso l'aggiunta di soluti (Labuza TP, 1980), per abbassare l'acqua libera negli alimenti si possono usare diverse tecniche che grazie alla loro azione risultano in grado di legare l'acqua riducendone la disponibilità per le altre reazioni, ne sono un esempio:

- Aggiunta di cloruro di sodio o di altri soluti;
- Disidratazione degli alimenti diverse dall'aggiunta di ingredienti al prodotto;
- Aggiunta di sostanze idrofile come gli zuccheri che sono in grado di assorbire l'acqua aumentando il residuo secco;
- Utilizzo di ingredienti che non contengono acqua come gli oli o che ne hanno in bassissima quantità come gli ingredienti secchi o disidratati;
- Aggiunta di composti a basso peso molecolare e proteine. La capacità delle proteine di legare molecole di acqua può essere modificata per effetto di trattamenti applicati all'alimento come ad esempio processi ad alta pressione di omogeneizzazione.

Queste possono essere combinate e quindi operare in sinergia tra loro oppure possono essere usate singolarmente (Gardini F., Parente E. 2013). La riduzione dell'acqua libera agisce influenzando la velocità di crescita dei microrganismi prolungandone quindi la fase *lag* e la dimensione della popolazione finale (Jay J.M. et al. 2008), da sempre per diminuire la degradazione ed aumentare la conservabilità degli alimenti si cerca di operare la riduzione del contenuto di acqua libera negli alimenti (Alzamora et al, 2003).

Il cloruro di sodio (NaCl), è stato usato fin dall'antichità per la conservazione degli alimenti, l'aggiunta di sale ad un alimento determina uno scambio per diffusione grazie al quale l'alimento si arricchisce di sale impoverendosi di acqua ostacolando così la crescita microbica. Utilizzando il sale in forma cristallina a differenza delle salamoie, la soluzione

salina si forma tutta a spese dell'acqua contenuta nell'alimento e il processo di diffusione si arresta quando viene raggiunta l'isotonia ovvero quando le concentrazioni di sale nella soluzione e nel prodotto sono le medesime. Alcuni esempi di applicazione del sale per la conservazione degli alimenti sono le salamoie utilizzate nell'industria conserviera o nella produzione di prodotti lattiero-caseari nei quali il sale può essere aggiunto per immersione in salamoie oppure per salagione superficiale a secco, altro esempio è la conservazione dei prodotti della pesca per salagione (sardine, stoccafisso, ecc).

Il sale quando viene aggiunto in un alimento in base alla concentrazione in cui è presente può svolgere un'azione diversa: a) azione battericida quando la dose risulta letale in quanto provoca l'aumento della pressione osmotica all'interno della cellula microbica con conseguenti danni per la stessa in quanto tende a perdere acqua, se questi danni sono irreversibili i microrganismi muoiono per plasmolisi altrimenti, b) azione batteriostatica se la dose risulta non essere letale.

L'azione del sale può influire per alcune tipologie di microrganismi come lo *Staphylococcus aureus* inibendo la produzione di alcune componenti extracellulari come è stato dimostrato da uno studio svolto da Niskanen A e Nurmi E nel 1976 utilizzando come matrice oggetto di studio la salsiccia secca la quale era stata inoculata con stafilococchi enterotossigeni, i risultati hanno appurato che se si effettuava una diminuzione dell'attività dell'acqua a valori compresi tra 0.960 e 0.880 utilizzando il cloruro di sodio si determinava il blocco della produzione dell'enterotossina B da parte di *Staphylococcus aureus*, nonostante il numero di cellule vitali presente fosse elevato (Troller JM, 1985).

È inoltre importante considerare che per ostacolare lo sviluppo microbico oltre alla riduzione dell'acqua libera operando con sale o altri soluti, possono essere utilizzati in sinergia con il sale anche altri metodi come ad esempio l'acidificazione, o l'uso di sostanze ad attività batteriostatica e trattamenti termici. Un esempio può essere dato dallo studio effettuato da Roberts TA e colleghi nel 1981 nel quale hanno valutato diversi fattori che controllano la crescita di *Clostridium botulinum* tipo A e B tra cui sale (NaCl) ed altri soluti in associazione con la temperatura del trattamento termico eseguito e i diversi rapporti di tempo e temperatura di conservazione su impasti di carne di maiale relativamente alla germinazione delle spore del microrganismo; questi hanno osservato che era possibile ottenere delle significative riduzioni nella produzione della tossina aumentando ciascun valore

singolarmente (Jay J.M. et al. 2008). In un altro studio relativamente alla produzione delle spore da parte di *Bacillus cereus*, Jakobsen JM e Murrel WG nel 1977, hanno dimostrato che il valore limite di attività dell'acqua per la formazione di spore mature del ceppo T del microrganismo era nell'intorno di 0.950 se si utilizzavano soluti come cloruro di sodio, glucosio e sorbitolo mentre utilizzando il glicerolo questo limite si abbassava a 0.910 (Jakobsen JM, Murrel WG, 1977). Da un'altra ricerca condotta relativamente al microrganismo aerobio *Pseudomonas fluorescens* coltivato in un mezzo contenente un minimo contenuto di glucosio Prior BA nel 1984, ha dimostrato che il tasso di crescita del microrganismo è stato elevato anche se i valori di attività dell'acqua erano inferiori al minimo di crescita (attività dell'acqua pari a 0.970) per il microrganismo quando il valore di attività dell'acqua era abbassata utilizzando il glicerolo, mentre se si utilizzava il sale il tasso di crescita si bloccava a valori di attività dell'acqua superiori a quelli minimi, ipotizzando dunque che per i microrganismi con metabolismo respiratorio il glicerolo abbia un minor potere inibente rispetto al sale (Prior BA, 1984).

7. Materiali e metodi

7.1. Piano sperimentale

Questo studio è basato sulla validazione di un critical control point di processo relativamente all'aggiunta dell'ingrediente sale con lo scopo di ridurre la quantità di acqua libera nel semilavorato ripieno utilizzato per la produzione della pasta fresca farcita e gestire quindi il pericolo derivante da alcuni microrganismi sporigeni come il *Clostridium botulinum* non proteolitico. Il piano sperimentale prevedeva di valutare la variazione dell'attività dell'acqua a seguito dell'aggiunta del sale (NaCl) in tre tipologie di ripieno prodotte in laboratorio con ricette che rispecchiano le tipologie di prodotti che l'azienda produce. Le formulazioni dei tre ripieni sono riportate nei paragrafi seguenti.

Le prove sono state svolte presso il laboratorio dell'azienda alimentare Voltan S.p.a. nella sede di Marcon (VE), Via delle Industrie 50, nel periodo maggio-agosto 2017 e sono state eseguite in triplo. Questi laboratori sono accreditati per svolgere analisi chimiche e microbiologiche ufficiali e l'accreditamento dei medesimi viene rinnovato annualmente mediante ispezione da parte dell'ente certificatore Accredia.

7.2. Le ricette

Le ricette sono state sviluppate appositamente con lo scopo di: a) verificare l'influenza dell'ingrediente sale (NaCl), nell'abbassare la quota di acqua libera contenuta negli impasti; b) valutare l'eventuale effetto sinergico di alcune materie prime nell'abbassare il valore di acqua libera determinato dall'aggiunta del sale (NaCl).

Le ricette prevedevano l'impiego di diversi ingredienti quali:

- Ricotta industriale;
- Carne cotta mista bovino-suino;
- Doppio concentrato di pomodoro;
- Spinaci surgelati tritati;
- Pane grattugiato grosso;
- Latte scremato in polvere;

- Inulina;
- Sale fino.

Questi ingredienti sono stati proporzionati ad hoc per creare tre differenti ricette denominate 1, 2 e 3 di cui una a base carne (ricetta 1), una a base pomodoro (ricetta 2) e una a base ricotta e spinaci (ricetta 3)

All'interno di ogni singola ricetta si sono effettuate due varianti: **a** e **b**. La variante **b** differiva dalla **a** per l'aggiunta di proteine del latte e di fibra vegetale. Per entrambe le varianti si sono valutati quattro livelli crescenti di sale variando proporzionalmente la quantità del pane grattugiato mantenendo fisse le quantità degli altri ingredienti. Per la ricetta 1 (ricetta a base Carne mista bovino-suino), poiché la materia prima Carne mista conteneva una certa quantità di sale la quantità aggiunta è stata ridotta per mantenere lo stesso livello di sale delle altre ricette. Nelle figure 21, 22 e 23 vengono riportate le quantità in percentuale delle singole materie prime utilizzate per la produzione degli impasti.

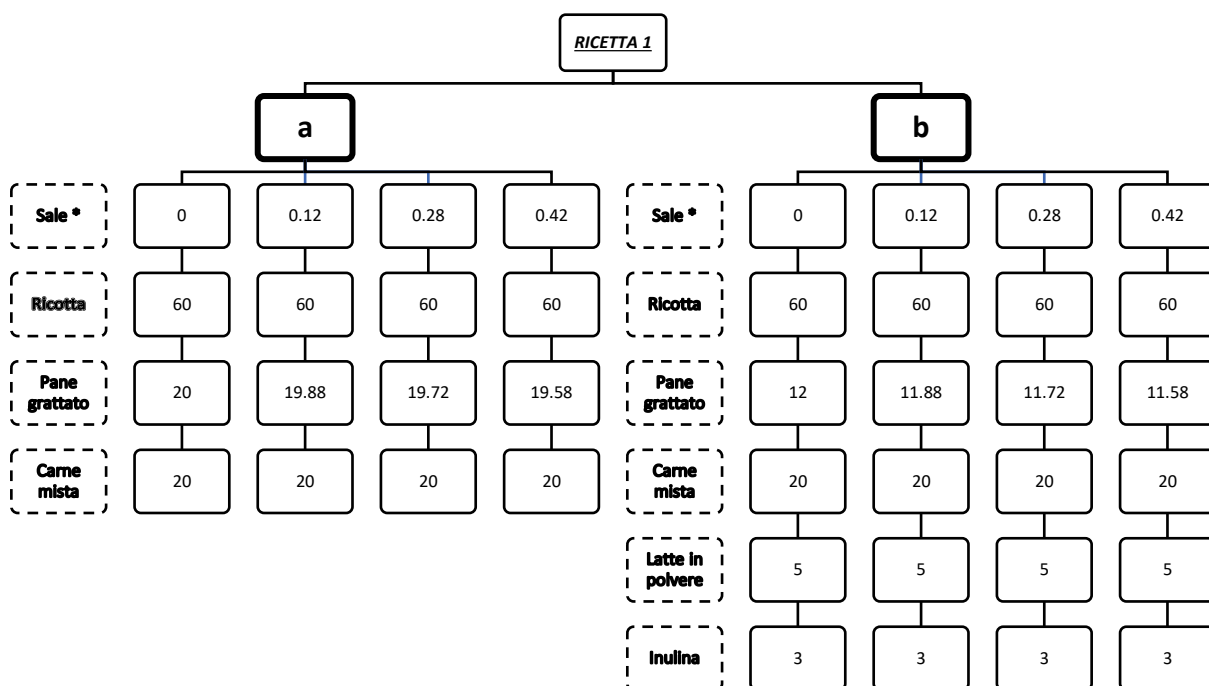


Figura 21: Composizione percentuale della ricetta 1: carne mista bovino-suino (*sale modificato).

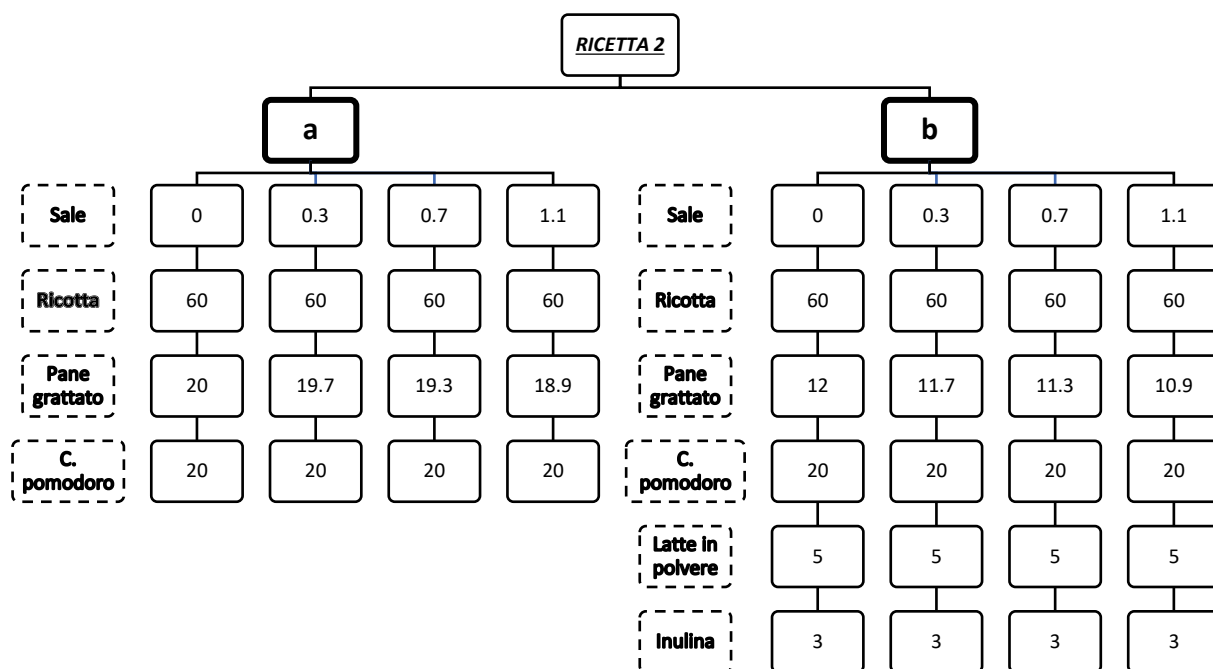


Figura 22: Composizione percentuale della ricetta 2: doppio concentrato di pomodoro.

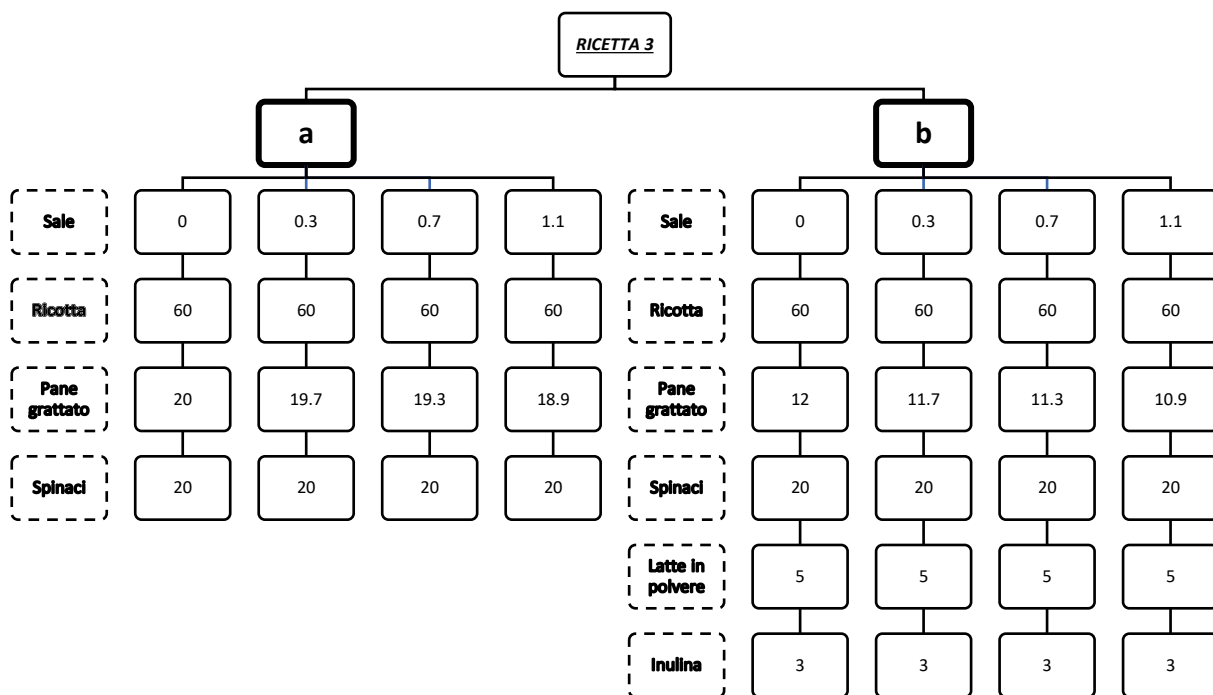


Figura 23: Composizione percentuale della ricetta 3: spinaci.

7.3. Preparazione dei campioni

La produzione degli impasti in laboratorio è stata eseguita seguendo le stesse operazioni svolte per la produzione a livello industriale del semilavorato. Nella figura 24 si riporta il diagramma di flusso seguito.

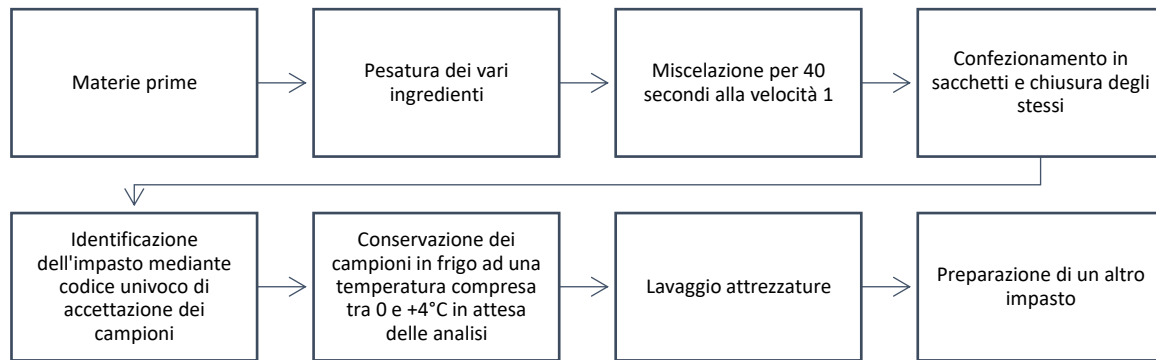


Figura 24: Diagramma di flusso per la produzione dei campioni.

Per miscelare i vari ingredienti tra di loro si è utilizzato un classico frullatore domestico a due velocità. I due parametri principali per produrre tutti gli impasti ovvero la velocità e il tempo (secondi), sono stati standardizzati effettuando tre prove preliminari di miscelazione per ogni ricetta questo per evitare fenomeni di disomogeneità tra gli impasti. Nelle prove preliminari il tempo di miscelazione dell'impasto contenente la carne mista (ricetta 1) era superiore (circa 40 secondi) rispetto alle altre due ricette per ottenere la stessa struttura del ripieno. Questo perché la materia prima carne mista si presentava sotto forma di fetta compatta di carne macinata ed insaccata simile a mortadella e utilizzando tempi inferiori di miscelazione non si otteneva un impasto con le stesse caratteristiche delle altre due ricette. Per ovviare, la materia prima veniva pretagliata in pezzi dalle dimensioni di circa 1 – 1.5 cm³; questo ha consentito di standardizzare per tutte le ricette un tempo di miscelazione pari a 40 secondi utilizzando una velocità pari a 1.

Per pesare i vari ingredienti è stata utilizzata una bilancia digitale avente una divisione pari a 0.1g. La modalità operative sono state le seguenti:

- Le materie prime “disidratate” (pane grattugiato, latte in polvere, inulina sale), sono state pesate all’interno di un becher di plastica posizionato sopra alla bilancia. Prima di eseguire la pesata si è provveduto all’azzeramento della tara e successivamente

sono state pesate all'interno del contenitore tutte le polveri seguendo le quantità indicate in ricetta e azzerando sempre tra una pesata e l'altra.

Nel caso in cui la formulazione dell'impasto prevedeva l'aggiunta del sale, data l'esigua quantità da pesare si è optato per l'utilizzo di un bicchierino da caffè usa e getta in materiale plastico, quindi come per il becher si è stato posizionato il bicchiere sul piatto della bilancia ed una volta eseguita la tara si è stata effettuata la pesata del sale. Successivamente questa quantità è stata aggiunta alle altre polveri già pesate nel becher e queste sono state miscelate con un cucchiaino per rendere più omogenea possibile la distribuzione del sale;

- Per le materie prime "umide" (carne mista, pomodoro, spinaci, ricotta), si è optato per il posizionamento del bicchiere del frullatore con la lama già inserita direttamente sopra al piatto della bilancia, successivamente si è eseguita la tara e sono state pesate al suo interno le quantità di ogni singolo ingrediente come indicato nella ricetta, azzerando sempre tra una pesata di un ingrediente e l'altro.

Pesati tutti gli ingredienti il bicchiere del frullatore è stato inserito nell'apposito alloggiamento del motore, ed una volta chiuso con il suo coperchio è stato azionato l'interruttore della corrente posizionandolo alla velocità 1 e contemporaneamente è stato fatto partire il cronometro per regolare il tempo di miscelazione. Nel mentre attraverso l'apertura del coperchio sono state immesse le polveri premiscelate contenute nel becher, questo per ottenere una distribuzione del sale ed un impasto omogeneo. Ottenuto l'impasto questo è stato subito chiuso all'interno di sacchetti in materiale plastico per evitare perdite di umidità ed il sacchetto è stato identificato mediante un'etichetta riportante il codice di accettazione univoco del campione (figura 25) per essere poi riposto all'interno di una sacca termica in attesa di essere messo all'interno del frigo prima di effettuare le analisi.



Figura 25: Particolare dell'impasto chiuso nel sacchetto ed identificato mediante codice univoco.

Dato che gli impasti sono stati effettuati in giorni diversi, questo per la mole di analisi che si sono svolte per ogni campione, le materie prime deperibili quali: ricotta, spinaci, carne mista e il concentrato di pomodoro, sono state prelevate in giorni diversi mantenendo invariato il fornitore, questo per evitare variazioni negli impasti al fine di standardizzare tutti i campioni oggetto di prova.

L'impasto ottenuto per tutte le ricette si presentava nel caso della variante **a** come un composto abbastanza granulare e non coeso, mentre nel caso della variante **b** questo si presentava come un agglomerato con consistenza cremosa (figura 26).

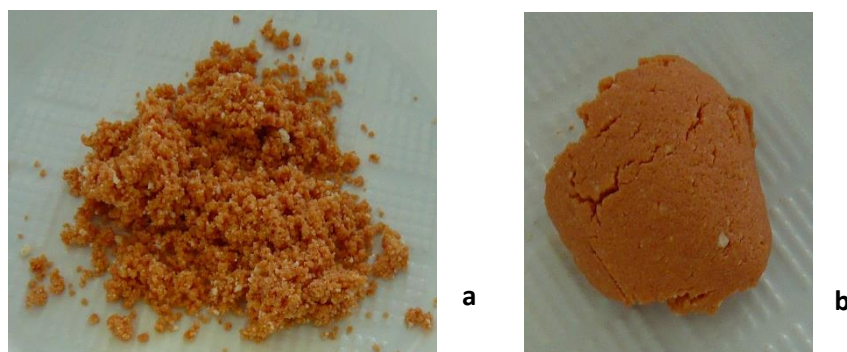


Figura 26: Dettaglio della texture degli impasti ottenuti, la variante di ricetta è indicata a lato dell'immagine.

Ottenuto ogni singolo impasto si procedeva al lavaggio di tutta l'attrezzatura utilizzata con del comune detergente per piatti e una volta risciacquati gli utensili si passava alla loro asciugatura con della carta a perdere e si passava alla creazione delle altre formulazioni.

7.4. Trattamento dei campioni

Ottenuti tutti i campioni, questi sono stati conservati all'interno del frigo dove abitualmente vengono stoccati i campioni del laboratorio ad una temperatura di $+4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 24 ore, questo per poter svolgere le analisi il giorno successivo alla produzione del campione data la mole di analisi da eseguire.

7.5. I metodi di analitici

Le metodiche di analisi di laboratorio utilizzate per lo svolgimento delle prove sono quelle abitualmente in uso all'interno dei laboratori aziendali e queste sono accreditati come metodi ufficiali.

Le analisi svolte nei campioni sono le seguenti:

- Determinazione dell'attività dell'acqua (a_w) tramite tecnica del punto di rugiada;
- Determinazione dell'umidità a 103°C;
- Determinazione del contenuto in ceneri;
- Determinazione del Sodio mediante Spettrofotometro ad Assorbimento Atomico con Fornetto di Grafite (GF-AAS).

7.5.1. Determinazione dell'attività dell'acqua

Questa determinazione è stata effettuata utilizzando l'analizzatore di attività dell'acqua *AQUALAB CX-2*, questo strumento consente di determinare l'attività dell'acqua in diverse matrici mediante la determinazione del punto di rugiada.

Prima di iniziare le varie determinazioni con questo strumento è stata verificata la temperatura dell'ambiente di laboratorio, che deve essere nell'intervallo 20÷25°C, mediante una sonda tarata. Prima di ogni utilizzo giornaliero lo strumento è stato acceso un'ora prima e tarato.

L'operazione di taratura giornaliera è effettuata con due soluzioni standard:

- Soluzione acquosa di KCL 0.5 mol/kg;
- Acqua pura sterile.

Queste due soluzioni corrispondono rispettivamente ai valori di attività dell'acqua di 0.984 e 1.000.

Questa attività si effettua partendo con la lettura dello standard a valore di attività dell'acqua pari a 0.984, successivamente si passa alla lettura del secondo standard a valore di a_w pari a 1.000 entrambe le letture devono nel range dello ± 0.003 rispetto al valore dello

standard inserito; una volta eseguita la taratura e riportati i valori di questa nell'apposito registro, si può procedere alla lettura dei campioni.

Per procedere alla determinazione dell'attività dell'acqua dev'essere controllata la temperatura del campione che deve essere a 20 - 25°C, se la temperatura è idonea si procede alla preparazione dei campioni all'interno delle capsule in materiale plastico.

Per ogni ripieno sono state eseguite tre determinazioni per poi ottenere la media dei tre valori così ottenuti. Per la preparazione delle capsule si opera pesando circa 5 g di campione prelevandolo a caso con una spatolina di acciaio dal sacchetto avendo l'accortezza di non toccare il campione con le mani. Il campione così prelevato deve essere distribuito uniformemente nella capsula (figura 27), quindi si chiude subito la capsula con l'apposito coperchietto per evitare perdite per evaporazione di acqua e si procede alla preparazione delle altre capsule dello stesso campione.



Figura 27: Dosaggio del campione e particolare delle capsule con e senza coperchio.

Una volta pesati i campioni si passa alla determinazione vera e propria aprendo il cassetto estraibile dello strumento, togliendo il coperchietto dalla capsula e inserendo quest'ultima all'interno dell'apposito vano porta campione dopo di che si richiude il cassetto e si gira la manopola nella posizione di lettura (*read*), a questo punto si attende che il macchinario emetta il segnale acustico e si prende nota del valore che compare nello schermo (figura 28). La lettura va ripetuta per due volte consecutive per ogni capsula senza aprire il cassetto, i due valori così ottenuti devono rientrare tra di loro in un range di ± 0.003 .



Figura 28: Strumento per la determinazione dell'attività dell'acqua a destra si può notare il cassetto porta campione estraibile con la capsula inserita.

Effettuate le due letture si elaborano i dati ottenuti mediante un foglio di calcolo elettronico che corregge il valore strumentale con il valore di correzione dato dalla curva di taratura mensile e restituisce il valore medio ottenuto dalla formula:

$$a_w = \frac{a_{w1} + a_{w2}}{2}$$

Il dato così ottenuto va riportato assieme al valore corretto con la curva di taratura mensile nel registro di analisi.

7.5.2. Determinazione dell'umidità totale a 103°C

Questa analisi è stata svolta per a) quantificare il contenuto di umidità % dell'impasto; b) quantificare il campione da pesare per le successive analisi delle ceneri per la determinazione del sodio, in quanto se il campione possiede un valore di umidità maggiore del 40 % si devono pesare 2.5 grammi al posto di 5.0 grammi e sottoporre il campione ad essiccazione in stufa alla temperatura di 103°C per 4 ore prima di procedere all'incenerimento; c) determinare il contenuto salino nella fase acquosa (WPS). Per ogni ripieno sono state eseguite tre determinazioni per poi ottenere la media dei valori così ottenuti.

Per svolgere questa analisi si preleva con una pinza una capsula in acciaio dalla giara contenenti i sali essiccanti, si prende nota del numero riportato nella capsula trascrivendolo nel registro di analisi, si determina la tara utilizzando una bilancia analitica e la si trascrive a registro riportando il peso della capsula vuota alla terza cifra decimale, successivamente si pesano al suo interno 10 grammi di campione e si trascrive la pesata a registro riportando sempre il valore alla terza cifra decimale, poi aiutandosi con la pinza si prende la capsula e la

si porta in stufa ad temperatura di 103°C per 24 ore. Queste operazioni sono state effettuate per ogni campione.

Passate le 24 ore si prelevano le capsule con la pinza e le si ripongono a raffreddare all'interno della giara contenente i sali essiccanti, si attende fino al raggiungimento della temperatura ambiente e solo a questo punto si può procedere alla determinazione del peso della capsula contenente il campione essiccato con la bilancia analitica riportando il peso alla terza cifra decimale nel registro di analisi in corrispondenza del numero di capsula ed eliminare il campione.

Ottenuti i vari valori di peso, si svolgono i calcoli con un foglio elettronico per determinare dapprima il residuo secco % mediante l'applicazione della formula:

$$\% \mathbf{RS} = \frac{\text{peso capsula contenente il campione essiccato} - \text{peso campione}}{\text{g campione}} \times 100$$

E successivamente dal valore del residuo secco per differenza si risale all'umidità relativa % utilizzando la seguente formula:

$$\% \mathbf{UR} = 100 - \% \mathbf{RS}$$

Ottenuto il valore dell'umidità relativa percentuale si trascrive quest'ultimo nel registro riportandolo arrotondato alla prima cifra decimale.

I valori di umidità ottenuti dalle varie determinazioni aggiravano tutti nell'intorno del 58 ÷ 65 % quindi per effettuare l'incenerimento per ottenere il valore delle ceneri sul tal quale e successivamente su queste effettuare la determinazione del sodio devono essere pesati 2.5 grammi di campione all'interno della capsula in ceramica.

Dal valore dell'umidità relativa percentuale si può risalire alla *Water Pase Salt* (WPS) cioè il contenuto salino nella fase acquosa al netto del sale utilizzando la formula:

$$\mathbf{WPS} \% = \left(\frac{\% \mathbf{NaCl}}{\% \mathbf{Umidità} + \% \mathbf{NaCl}} \right) \times 100$$

7.5.3. Determinazione delle ceneri

Questa determinazione è stata svolta per ottenere le ceneri su cui effettuare la successiva analisi per la determinazione del sodio.

Per effettuare questa determinazione si utilizzano dei crogioli in porcellana preventivamente decontaminati in soluzione acquosa 1:3 di HNO_3 concentrato (65%) per 24 ore, e successivamente asciugati in muffola alla temperatura di 550°C e raffreddati all'interno delle giare essiccanti, questa procedura è necessaria perché una volta ottenute le ceneri queste serviranno per determinare il contenuto in sodio.

Per l'incenerimento, si procede prelevando un crogiolo alla volta dalla giara contenente i sali essiccanti aiutandosi con una pinza, a questo punto si procede alla numerazione del crogiolo con un numero progressivo per identificarlo scrivendo direttamente sul crogiolo con una matita e riportando tale numero nel registro di analisi, una volta identificato si determina la tara utilizzando una bilancia di precisione e si riporta il peso ottenuto alla quarta cifra decimale nel registro, fatto ciò si azzerava la bilancia e si pesano all'interno del crogiolo 2.5 grammi di campione riportando a registro il peso sempre alla quarta cifra decimale, si preleva la capsula con la pinza e la si ripone all'interno di una bacinella in attesa di portarla in stufa alla temperatura di 103°C per 4 ore assieme alle altre dato che il campione presenta un'umidità superiore al 40%. Per ogni ripieno sono state eseguite tre determinazioni per poi ottenere la media dei valori così ottenuti.

Per ogni sessione di analisi si possono effettuare sei/sette determinazioni, questo limite è imposto dallo spazio presente nel forno della muffola (6 campioni + il materiale di riferimento "RM"), il campione nominato RM serve per la successiva analisi per la determinazione del sodio.

Passate le quattro ore in stufa si prelevano con la pinza i crogioli e li si porta sotto cappa chimica dove avviene la prima fase di carbonizzazione sul bunsen (figura 29).



Figura 29: Particolare della fase di carbonizzazione del campione a destra si può notare il campione quasi carbonizzato.

La fase di carbonizzazione termina quando il campione ha finito di produrre fumo (circa 15 minuti). A questo punto si può procedere all'incenerimento riponendo la capsula all'interno della muffola preriscaldata alla temperatura di 550°C per un tempo di 8 ore fino alla completa combustione che si verifica quando le ceneri sono di un colore grigio-bianco.

Passate le otto ore in muffola si estraggono i crogioli contenenti le ceneri e si lasciano raffreddare all'interno delle giare essiccanti. Una volta raggiunta la temperatura ambiente queste si possono pesare sulla bilancia di precisione e il valore così ottenuto va riportato alla quarta cifra decimale nel registro.

La determinazione della percentuale di ceneri del campione espressa sul tal quale si effettua utilizzando un foglio di calcolo elettronico che esegue i calcoli utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ ceneri t. q.} = \frac{\text{peso finale crogiuolo contenente le ceneri} - \text{peso crogiuolo}}{\text{g campione}} \times 100$$

Il risultato così ottenuto va riportato nel registro al centesimo di grammo.

7.5.4. Determinazione del Sodio mediante metodica GF-AAS

La determinazione del sodio è stata effettuata utilizzando uno spettrometro di assorbimento atomico con fornello di grafite *SOLAR MQ Zc* della *Thermo scientific*. Questo strumento utilizza un correttore del forno modello Zeeman ed effettua la misura dell'assorbanza a 330.3 nm durante l'atomizzazione del campione che ha una durata di 3 secondi fornendo un picco la cui area corrisponde alla quantità del composto ricercato.

La spettroscopia atomica è una tecnica che fornisce informazioni qualitative e quantitative sugli elementi presenti all'interno di un campione ed è una delle tecniche più usate ad oggi per l'analisi degli elementi in tracce all'interno di diverse matrici alimentari (soprattutto metalli).

Questa tecnica è interamente automatizzata e consente di analizzare aliquote molto piccole di campione. Il sistema di atomizzazione consiste in un tubetto di grafite che viene portato ad alta temperatura mediante corrente elettrica all'interno di una fornace. Il campione opportunamente trattato viene prelevato dall'autocampionatore in un volume che può

variare a seconda del metodo da 20 a 100 μl , viene introdotto nel tubo pirolitico di grafite il quale si trova posizionato nel cammino ottico della radiazione emessa da una lampada che può essere a catodo cavo (HLC) o a scarica (EDL), nel tubo fluisce un gas inerte (argon o azoto) che svolge la funzione di eliminare l'aria presente al suo interno ottenendo quindi un'atmosfera non ossidante che consente agli atomi del campione di rimanere allo stato fondamentale.

A questo punto il fornetto di grafite viene riscaldato seguendo un gradiente termico crescente prestabilito (minimo tre stadi), in modo tale da ottimizzare lo stato fisico dell'analita prima di essere analizzato e ridurre le interferenze della matrice. Lo strumento procede all'iniezione del volume di campione da analizzare impostato nel programma di lavoro attraverso il foro centrale presente nella circonferenza del tubicino di grafite e una volta iniettato il campione inizia il ciclo di riscaldamento del fornetto a tre gradienti di temperatura crescente programmati dal metodo in uso (100°C, 800-1000°C, 1800-2700°C) e si ottiene la produzione del vapore atomico transitorio che rimane all'interno del piccolissimo volume del tubicino di grafite per un brevissimo tempo prima di essere espulso da un flusso di gas inerte. Durante la fase di atomizzazione si verifica l'assorbimento della radiazione e quindi la misurazione dell'assorbimento. La misurazione viene fatta sui vapori atomici che si liberano rapidamente nello stadio finale del riscaldamento ed il segnale che si ottiene è un picco la cui area è direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita presente allo stato atomico nel tubicino di grafite.

I vantaggi che presenta questa tecnica sono oltre al volume ridotto di campione i ridotti limiti di rilevabilità e i tempi brevi di analisi (Cabras P., Tuberoso C.I.G., 2014).

Per ogni ripieno sono state eseguite tre determinazioni e i valori così ottenuti sono stati mediati, per procedere alla determinazione del sodio si parte dalla cenere del campione ottenute dalla determinazione precedente per il calcolo delle ceneri sul tal quale, queste devono essere portate in soluzione utilizzando acido nitrico (HNO_3) 65% di grado utrapuro per analisi di metalli in tracce e acqua deionizzata.

Nello specifico si procede preparando sotto cappa aspirante dei contenitori monouso "Digitub" in materiale plastico da 100 ml per l'analisi di metalli pesanti i quali devono essere identificati con il codice di accettazione del campione, il numero del crogiolo di provenienza

della cenere e la diluizione effettuata (1:100; 1:5000; 1:20000), utilizzando un pennarello indelebile.

Sempre sotto cappa aspirante si preleva con una pipettrice automatica 1 ml di HNO_3 e lo si versa direttamente sulla cenere contenuta all'interno del crogiolo in porcellana, questo viene poi rapidamente scaldato sul bunsen per facilitare il passaggio in soluzione della cenere e con una bacchetta in vetro si miscela il tutto fino al completo dissolvimento della cenere. A questo punto si versa la soluzione così ottenuta all'interno del rispettivo contenitore monouso *Digitub* da 100 ml e si porta a volume con acqua deionizzata, si tappa il tutto e si agita leggermente ottenendo così la diluizione 1:100 ovvero diluizione di partenza per poi effettuare la successiva diluizione 1:20000. Queste operazioni vengono ripetute per ogni campione (figura 30).



Figura 30: Particolare dei crogioli numerati e dei contenitori *Digitub* da 100 ml identificati.

Ottenute le diluizioni di partenza (1:100) si preparano altri contenitori *Digitub* da 100 ml per la preparazione delle diluizioni successive che per i campioni è di 1:20000 mentre per il materiale di riferimento (RM) è di 1:5000 (figura 31). Per fare ciò si preleva con una micropipetta a volume variabile 500 μl dalla soluzione 1:100 e si versano nel rispettivo *Digitub* da 100 ml, successivamente si prelevano con una pipettrice automatica 2 ml di HNO_3 e si versano all'interno dello stesso contenitore da 100 ml e si porta a volume con acqua deionizzata, si tappa e si agita il tutto. Queste operazioni sono state ripetute per ogni campione tranne che per il *reference* (RM) che dev'essere diluito 1:5000 quindi in questo caso il volume da prelevare dalla rispettiva soluzione 1:100 è di 2 ml, procedendo poi come pocanzi descritto per i campioni.

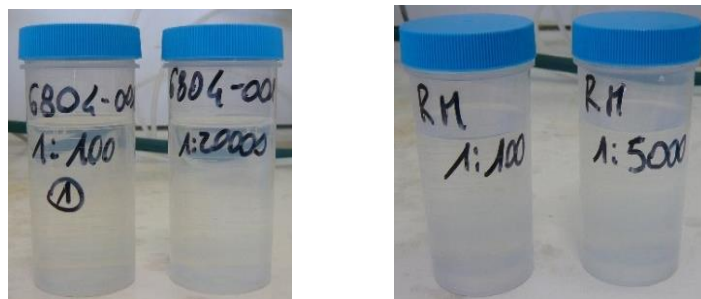


Foto 31: A sinistra si può notare la diluizione 1:100 e 1:20000 di un campione mentre a destra si può notare la diluizione 1:100 e 1:5000 del reference.

Preparate le varie diluizioni dei campioni si passa alla determinazione vera e propria con lo spettrometro di assorbimento atomico con fornello di grafite GF-AAS (figura 32).



Figura 32: Partendo da destra si può notare il correttore del forno Zeeman, al centro la fornace con l'autocampionatore e a sinistra il sistema di rilevazione.

Per iniziare l'analisi si procede lanciando il programma dello strumento *Solar MQZE*, si seleziona la tipologia di determinazione che si vuole effettuare, in questo caso è la determinazione del sodio e si immettono i vari codici dei campioni che serviranno poi per risalire al posizionamento dei campioni nell'autocampionatore, si preparano le varie capsule di plastica per l'autocampionatore prelevando con una pipetta Pasteur monouso una piccola aliquota di soluzione dai contenitori *Digitub* contenenti le diluizioni preparate precedentemente, questo volume viene versato all'interno delle capsule per l'autocampionatore e queste vengono posizionate nei vari fori del piatto del medesimo

seguendo le indicazioni fornite dallo schema che compare nel monitor del computer, il quale indica il numero corrispondente al foro sul quale va inserita la capsula contenente il campione (figura 33).

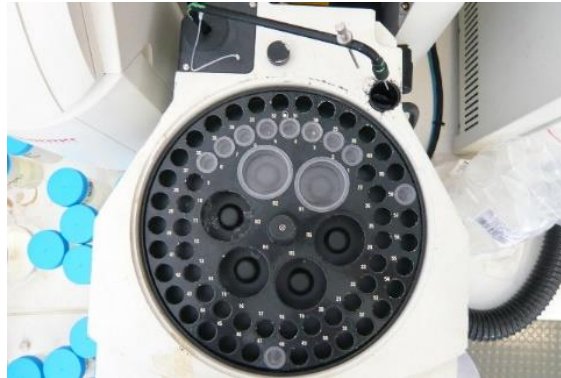


Figura 33: Autocampionatore con al suo interno posizionati i vari contenitori contenenti le soluzioni dei vari campioni pronto per la determinazione.

A questo punto sistemati nei rispettivi alloggiamenti tutti i campioni più il *reference* (RM), il diluente (acqua deionizzata), il *master standard*, il bianco ed il *sample blanc* (queste ultime tre soluzioni sono già preparate e conservate nel frigo degli standard fino al momento dell'utilizzo), si immettono nel programma dello strumento i valori del peso del campione iniziale (peso relativo ad ogni campione da analizzare da cui sono state ottenute le ceneri), RM compreso e la diluizione effettuata per ogni campione.

Si procede effettuando la “*single solution*” ovvero un'iniezione in singolo per la verifica dell'assorbanza dello standard a 0.50 ppm di sodio (standard 2), la quale deve essere pari a $0.268 \pm 10\%$ ($0.2412 \div 0.2948$), il macchinario inizia la determinazione e l'autocampionatore effettua l'iniezione di 20 μ l dello standard ed effettua la lettura per tre volte consecutive.

Alcune fasi del funzionamento si possono notare nella sequenza di immagini presenti nella figura 34.



Figura 34: Partendo da sinistra si può notare il prelievo del campione, la successiva iniezione e le diverse fasi dell'atomizzazione del campione iniettato nel fornello di grafite (ultime tre immagini).

Effettuate le tre letture, lo strumento restituisce la media dei tre valori e se questa è corretta ovvero rientra nel valore $0.268 \pm 10\%$ si può svolgere la sessione di analisi di tutti i campioni, altrimenti, si procede all'eliminazione di una delle tre letture per portare il valore nel range stabilito e se questo non si verifica si procede alla sostituzione dello standard e alla ripetizione dell'iniezione dello standard effettuando nuovamente la *single solution*.

Verificata la correttezza dell'assorbanza a 0.50 ppm di sodio si procede all'analisi di tutti i campioni ed il macchinario in completa autonomia esegue le iniezioni dei vari standard per ottenere la retta di taratura per poi proseguire all'analisi in serie di tutti i campioni inseriti nell'autocampionatore. Finite le varie determinazioni lo strumento restituisce a video i risultati completi di assorbanza e contenuto in sodio espresso in ppm (mg/kg), dei vari campioni inseriti. Questi valori scaturiscono dalla media dei tre valori ottenuti da altrettante determinazioni per ogni singolo campione i quali sono stati corretti con la retta di taratura, inoltre fornisce viene l'equazione della retta di taratura comprensiva di indice di correlazione (R^2), come si può notare nella figura 35.

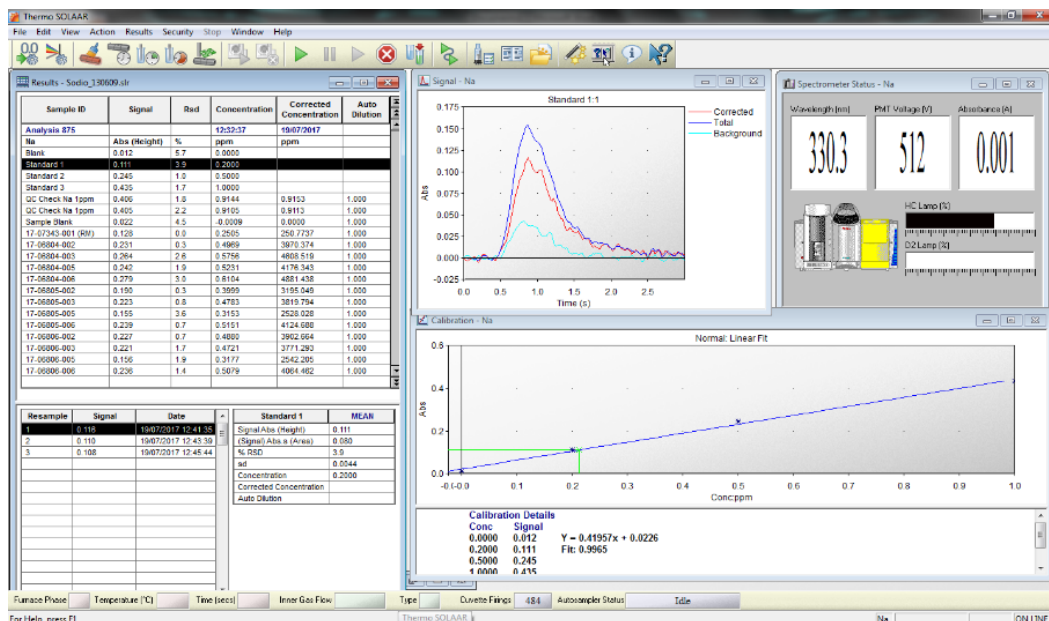


Figura 35: Schermata riportante i valori ottenuti dalla determinazione del Sodio a fine sessione di analisi.

A questo punto prima di trascrivere i risultati nel registro di analisi, si effettuano, come da metodo, il controllo di alcuni parametri per validare la sessione di analisi e questi sono:

- La verifica dell'assorbanza dello standard contenente 0.50ppm di sodio (già effettuata in precedenza);

- La verifica dell' R^2 della retta di taratura che deve essere maggiore di 0.990 con un valore del coefficiente angolare m uguale a $0.4610 \pm 10\%$ ($0.41489 \div 0.5071$);
- La valutazione del valore dell'assorbanza del *reference* (RM), valore che conosco in quanto costruito ad hoc.

Se tutto rientra nei limiti la sessione di analisi è validata ed è quindi conclusa, altrimenti si deve ripetere tutto partendo dalle soluzioni preparate in precedenza.

Per la trascrizione a registro dei valori del sodio ottenuti dalla determinazione si deve procedere all'arrotondamento degli stessi seguendo lo schema presente nel metodo di analisi ovvero se la cifra successiva a quella significativa è inferiore a 5 la cifra significativa non va modificata e quella successiva a questa diventa pari a 0 (2437 diventa 2400); se la cifra successiva a quella significativa è maggiore o uguale a 5 la cifra significativa viene aumentata di una unità e quella successiva va posta pari a 0 (315 diventa 320).

7.6. Analisi statistica

Tutti i dati ottenuti sono stati elaborati per la valutazione dei parametri statistici utilizzando come software di calcolo elettronico Excel. Sono stati ottenuti per la correlazione lineare i seguenti parametri statistici:

- a) La correlazione r , che misura l'associazione tra due variabili casuali x e y a prescindere dalla loro unità di misura descrivendo la relazione lineare fra le osservazioni campionarie, può assumere valori compresi nell'intervallo tra -1 e $+1$ (per $r = 0$ non vi è alcuna correlazione lineare, ma potrebbe esservi una correlazione non lineare. La correlazione si determina applicando la formula:

$$r_{(x,y)} = \frac{Cov_{(x,y)}}{(\sigma_x) x (\sigma_y)}$$

- b) Coefficiente di regressione R^2 , studia l'andamento di una variabile continua y (variabile dipendente) in funzione della variabile x (variabile indipendente). La regressione è data da:

$$R^2 = (r_{xy}) x \left(\frac{\sigma_y}{\sigma_x} \right)$$

c) Il valore **p** esprime la probabilità di rifiutare un'ipotesi nulla vera in un valore di $\alpha = 0.05$. tanto più la probabilità indicata con α è piccola, tanto più è improbabile che si commetta l'errore di rifiutare l'ipotesi nulla H_0 quando essa è vera. il valore **p** esprime dunque la probabilità esatta di ottenere un valore della statistica uguale o più estremo (maggiore o minore) di quello calcolato e viene confrontato con α per decidere se l'ipotesi nulla debba essere rifiutata. Se $p \leq \alpha$ rifiutiamo H_0 , se $p > \alpha$ non rifiutiamo H_0 . Il livello di significatività statistica varia a seconda dei valori di **p** ottenuti:

- Se $p \leq 0.05$ (livello 5%) i valori ottenuti sono significativi;
- Se $p \leq 0.01$ (livello 1%) i valori ottenuti sono molto significativi;
- Se $p \leq 0.001$ (livello 0.1%) i valori ottenuti sono altamente significativi.

Per calcolare il valore di **p**, si ricorre alla formula per ricavare il valore dell'intervallo di confidenza **Z**:

$$Z = \frac{\bar{x} - \mu}{\sigma / \sqrt{n}}$$

Confrontando il dato (**Z**) così ottenuto, in termini assoluti, con dei valori tabulari presenti nella tavola degli **Z** e/o tabella dei valori dell'integrale della probabilità della curva normale standardizzata ottenendo così il valore di **p**.

8. Risultati e discussione

I valori medi ottenuti e la deviazione standard dell'umidità relativa (% p/p), delle ceneri (% p/p) e del sale (g/kg) per ogni variante (a e b) di ogni ricetta, sono riportati nella tabella 6.

Il valore del sale è stato calcolato dal valore del sodio determinato analiticamente moltiplicando per un coefficiente ottenuto dal rapporto stechiometrico dei due metalli che compongono il sale.

Ricetta	Umidità (g/100g)	Ceneri (g/100g)	Sale (g/kg)
1 a	58.65 ± 0.2082	1.90 ± 0.2059	12.71 ± 1.3451
1 b	58.66 ± 0.6100	2.24 ± 0.1767	10.99 ± 1.0659
2 a	61.13 ± 0.6215	1.83 ± 0.5187	8.39 ± 3.6307
2 b	60.96 ± 0.3182	2.13 ± 0.5422	8.01 ± 3.5557
3 a	65.24 ± 0.5747	1.59 ± 0.5049	8.14 ± 3.1809
3 b	64.67 ± 0.6508	1.87 ± 0.5228	8.01 ± 3.5557

Tabella 6: Valori medi di (n = 4) e deviazione standard ($\pm \sigma$) di umidità relativa (% p/p), ceneri (% p/p) e sale (g/kg).

La tabella 7 esprime le quantità medie di sale presenti nelle materie prime (g/100g) e la deviazione standard ottenuta. I valori sono stati calcolati valutando tutti i livelli per ogni variante (a e b) di ogni ricetta. Come si può notare il sale aggiunto alla ricetta 1 per entrambe le variabili (a e b) risulta inferiore alle altre due ricette in quanto la materia prima carne mista presentava un contenuto di sale superiore alle altre due ricette ($0.89 \div 1.07$ g/100g). Il contenuto di sale totale risulta non significativamente diverso per le ricette 2 e 3 con un valore compreso tra 0.80 e 0.84 (g/100g) mentre nel caso della ricetta 1, sebbene il contenuto di sale aggiunto tenesse conto del maggior valore iniziale, il contenuto di sale totale risulta maggiore rispetto alle altre due ricette con valori medi compresi tra 1.10 e 1.27 (g/100g).

Ricetta	Sale aggiunto (g/100g)	Sale derivante da materie prime (g/100g)	Sale totale (g/100g)
1 a	0.21 ± 0.1836*	1.07 ± 0.0664	1.27 ± 0.1345
1 b	0.21 ± 0.1836*	0.89 ± 1.5511	1.10 ± 0.1066
2 a	0.53 ± 0.4784	0.31 ± 0.1647	0.84 ± 0.3631
2 b	0.53 ± 0.4784	0.28 ± 0.1559	0.80 ± 0.3556
3 a	0.53 ± 0.4787	0.29 ± 0.2026	0.81 ± 0.3181
3 b	0.53 ± 0.4784	0.28 ± 0.1559	0.80 ± 0.3556

Tabella 7: Valori medi (n=4) e deviazione standard ($\pm\sigma$) del sale derivante dalla materia prima (g/100g).

I valori medi dell'attività dell'acqua ottenuti mediante tecnica del punto di rugiada, effettuando tre misurazioni per ogni campione in relazione ad ogni livello di sale aggiunto all'impasto per la ricetta 1 sono riportati nella tabella 8.

a			b		
Sale (g)	a_w	σ	Sale (g)	a_w	σ
0	0.981	0.0006	0	0.983	0.0007
0.58	0.980	0.0010	0.58	0.980	0.0006
1.4	0.978	0.0006	1.4	0.979	0.0005
2.12	0.977	0.0006	2.12	0.975	0.0006

Tabella 8: Valori medi (n = 4) e deviazione standard ($\pm\sigma$) dell'attività dell'acqua per la ricetta 1 (carne mista) ottenuti variando il contenuto in sale aggiunto all'impasto di 500g (quantità di sale corretta per apporto naturale dalla materia prima carne mista).

Come si può vedere il valore di attività dell'acqua della formulazione senza alcuna aggiunta di sale è pari a 0.981 (± 0.0006) e il valore di attività dell'acqua diminuisce all'aumentare della quantità di sale aggiunta. Il valore finale ottenuto per questa formulazione è pari a 0.977 (± 0.0006). La stessa formulazione contenente le proteine del latte e la fibra vegetale presenta valori di attività dell'acqua simili. Il valore finale di attività dell'acqua per la

formulazione contenete il 2.12 % di sale risulta significativamente diverso tra le due formulazioni ($p < 0.05$).

I valori medi dell'attività dell'acqua ottenuti mediante tecnica del punto di rugiada, effettuando tre misurazioni per ogni campione in relazione ad ogni livello di sale aggiunto all'impasto per la ricetta 2 sono riportati nella tabella 9.

a			b		
Sale (g)	a_w	σ	Sale (g)	a_w	σ
0	0.984	0.0007	0	0.980	0.0021
1.5	0.979	0.0010	1.5	0.973	0.0012
3.5	0.976	0.0015	3.5	0.969	0.0010
5.5	0.971	0.0017	5.5	0.967	0.0017

Tabella 9: Valori medi ($n = 4$) e deviazione standard ($\pm\sigma$) dell'attività dell'acqua per la ricetta 2 (pomodoro) ottenuti variando il contenuto in sale aggiunto all'impasto di 500g.

Come si può vedere il valore di attività dell'acqua della formulazione senza alcuna aggiunta di sale è pari a 0.984 (± 0.0007) e il valore di attività dell'acqua diminuisce all'aumentare della quantità di sale aggiunta. Il valore finale ottenuto per questa formulazione è pari a 0.971 (± 0.0017). Il valore finale di attività dell'acqua ottenuto per questa formulazione risulta più basso rispetto a quello della ricetta 1 ed inoltre la stessa formulazione contenente le proteine del latte e la fibra vegetale presenta valori di attività dell'acqua significativamente più bassi. Infatti il valore finale di attività dell'acqua per la formulazione contenete il 5.5 % di sale risulta significativamente diverso tra le due formulazioni ($p < 0.05$).

In questa formulazione inoltre la variazione di attività dell'acqua nei campioni con il più alto tenore di sale risulta maggiore (Δ pari a 0.004) rispetto a quella ottenuta nella ricetta 1 (Δ pari a 0.002).

Nella tabella 10, infine sono riportati i valori medi dell'attività dell'acqua per la ricetta 3 ottenuti mediante tecnica del punto di rugiada, effettuando tre misurazioni per ogni campione in relazione ad ogni livello di sale aggiunto all'impasto.

a			b		
Sale (g)	a_w	σ	Sale (g)	a_w	σ
0	0.992	0.0014	0	0.989	0.0007
1.5	0.987	0.0006	1.5	0.984	0.0006
3.5	0.984	0.0015	3.5	0.979	0.0006
5.5	0.983	0.0006	5.5	0.978	0.0007

Tabella 10: Valori medi ($n = 4$) e deviazione standard ($\pm\sigma$) dell'attività dell'acqua per la ricetta 3 (spinaci) ottenuti variando il contenuto in sale aggiunto all'impasto di 500g.

Come si può osservare il valore di attività dell'acqua della formulazione senza alcuna aggiunta di sale è pari a 0.992 (± 0.0014) e il valore di attività dell'acqua diminuisce all'aumentare della quantità di sale aggiunta. Il valore finale ottenuto per questa formulazione è pari a 0.983 (± 0.0006). Da notare che il valore finale di attività dell'acqua ottenuto per questa formulazione risulta più alto rispetto a quello delle ricette 1 e 2 ed inoltre la stessa formulazione contenente le proteine del latte e la fibra vegetale presenta valori di attività dell'acqua significativamente più bassi anche se sempre più elevati rispetto alle due ricette precedenti. Infatti il valore finale di attività dell'acqua per la formulazione contenente il 5.5 % di sale risulta significativamente diverso tra le due formulazioni ($p < 0.01$).

In questa formulazione inoltre la variazione di attività dell'acqua nei campioni con il più alto tenore di sale risulta maggiore (Δ pari a 0.005) rispetto a quella ottenuta nella ricetta 1 (Δ pari a 0.002) e nella ricetta 2 (Δ pari a 0.004).

Come si può notare nelle tabelle 8, 9 e 10 solo in un caso, ovvero nella formulazione 2 variante b, l'attività dell'acqua raggiunge valori idonei a garantire il controllo del *critical control point* per il pericolo derivante dallo sviluppo di microrganismi sporigeni come *Clostridium botulinum* ($a_w < 0.97$). In tutti gli altri casi risulta necessario un ulteriore supplemento di sale per ottenere valori di attività dell'acqua limitanti la crescita di questo microrganismo, oppure valutare l'aggiunta di altre barriere come ad esempio gli additivi acidificanti per mantenere il pH a valori ≤ 4.5 per valutare un effetto sinergico di contrasto allo sviluppo degli sporigeni.

Nella tabella 12 sono riportati i valori medi dell'umidità relativa (% p/p), del sale (g/100g), del contenuto salino medio nella fase acquosa (WPS) e dell'attività dell'acqua per il livello a maggior concentrazione di sale delle tre formulazioni oggetto di studio.

Il valore del WPS è stato calcolato così come descritto nel paragrafo 7.5.2 del capitolo 7 materiali e metodi.

Ricetta	Umidità (g/100g)	Sale (g/100g)	WPS (g/100g)	a_w
1 a	58.6 ± 0.0841	1.40 ± 0.1370	2.33 ± 0.1251	0.977 ± 0.0006
1 b	57.8 ± 0.1603	1.09 ± 0.1090	1.85 ± 0.1642	0.975 ± 0.0006
2 a	60.4 ± 0.0924	1.22 ± 0.3622	1.98 ± 0.0930	0.971 ± 0.0017
2 b	60.5 ± 0.1030	1.14 ± 0.3543	1.85 ± 0.1874	0.967 ± 0.0017
3 a	64.5 ± 0.1121	1.12 ± 0.3201	1.71 ± 0.1250	0.983 ± 0.0006
3 b	65.8 ± 0.1423	1.14 ± 0.3542	1.72 ± 0.1453	0.978 ± 0.0007

Tabella 11: Valori medi ottenuti da (n = 4) campioni comprensivo di deviazione standard ($\pm\sigma$) di umidità relativa (% p/p), sale (g/100g), WPS (g/100g) e a_w per il livello più alto di sale.

Il parametro WPS è uno dei criteri che possono essere utilizzati per la valutazione della stabilità microbiologica dei prodotti nei confronti del *Clostridium botulinum* non proteolitico. Infatti per la sicurezza dei prodotti refrigerati il livello di sale nella fase acquosa dell'alimento(WPS) deve risultare superiore a 3.5 (g/100g), come si può vedere nella tabella 12 nessuna delle formulazioni da noi sviluppate presenta tale valore di WPS che mediamente è risultato essere compreso tra un valore minimo di 1.71 e un valore massimo di 2.33 (g/100g).

Comunque questo dato è confermato dai valori di attività dell'acqua che in tutti i ripieni con la sola esclusione di uno (2 b) risultano superiori a 0.97.

La tabella 12 riporta i valori dei parametri ottenuti dalla retta di correlazione tra il valore dell'attività dell'acqua e il contenuto di sale totale (g/kg). In particolare per ogni modellazione sono stati ottenuti e calcolati il coefficiente angolare della retta (m), l'intercetta (b), nonché i parametri statistici: r, R², e p.

Ricetta	m	b	r	R ²	p
1 a	0.00133	0.996	0.982	96.5	0.01
1 b	0.00163	0.998	0.969	94.0	0.03
2 a	0.00147	0.989	0.985	97.1	0.01
2 b	0.00157	0.984	0.974	94.8	0.02
3 a	0.00126	0.996	0.994	98.9	< 0.01
3 b	0.00141	0.993	0.994	98.9	< 0.01

Tabella 12: Valori di m, b, r, R², p ottenuti dalla correlazione tra a_w e sale totale (g/kg).

Come atteso, il parametro p di tutte le rette ottenute risulta statisticamente significativo (vedi tabella 12) indicando una stretta correlazione tra il valore di attività dell'acqua e il sale totale presente nella formulazione. In tutti i casi il coefficiente di correlazione (r) è risultato superiore a 0.96.

Nel grafico 1 è riportata la correlazione, per la ricetta 1 (carne mista), tra i valori di attività dell'acqua e i valori del sale (NaCl) espresso in (g/kg). Come si può notare la diminuzione dell'attività dell'acqua all'aumentare della concentrazione di sale risulta sensibilmente maggiore nel campione nel quale la materia prima pane grattugiato è stata parzialmente sostituita con proteine del latte e fibra vegetale. Il coefficiente angolare del campione **b** risulta infatti, maggiore (0.00163) rispetto a quello del campione **a** (0.00133).

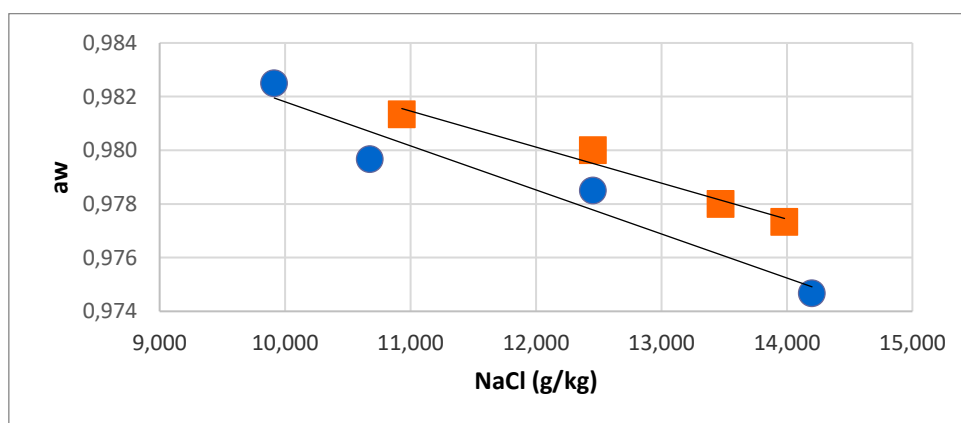


Grafico 1: Correlazione per le due varianti della ricetta 1 (carne mista), tra attività dell'acqua e sale (g/kg), i quadratini colore arancione sono relativi alla variante **a**, mentre i punti colorati in blu sono relativi alla variante **b**.

Nel grafico 2 è riportato per la ricetta 2 (pomodoro) la correlazione tra i valori di attività dell'acqua e i valori del sale (NaCl) espresso in (g/kg). Anche in questo caso come per la ricetta 1 i coefficienti angolari delle due rette ottenute non sono uguali. Per la variante **b**, il

coefficiente angolare risulta maggiore (0.00157) rispetto a quello ottenuto per la variante **a** (0.00147) caratterizzata anche in questo caso, dalla presenza nella componente disidratata del solo pane grattugiato.

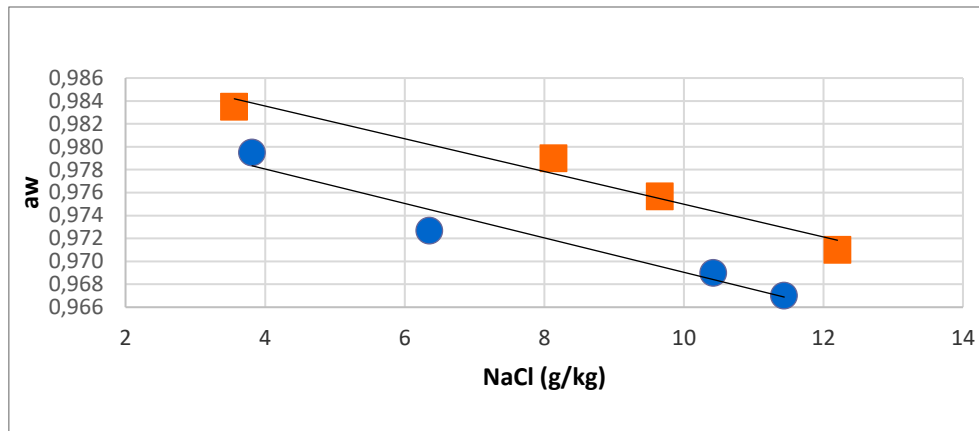


Grafico 2: Correlazione per le due varianti della ricetta 2 (pomodoro), tra attività dell'acqua e sale (g/kg), i quadratini colore arancio sono relativi alla variante **a**, mentre i punti colorati in blu sono relativi alla variante **b**.

In fine nel grafico 3 è riportata la correlazione ottenuta tra i valori di attività dell'acqua e i valori del sale (NaCl) espresso in (g/kg) per la ricetta 3 (spinaci). Anche in questa ricetta è confermato quanto rilevato nelle due analisi precedenti: la riduzione dell'attività dell'acqua all'aumentare del contenuto di sale risulta maggiore nella ricetta contenente le proteine del latte e la fibra vegetale.

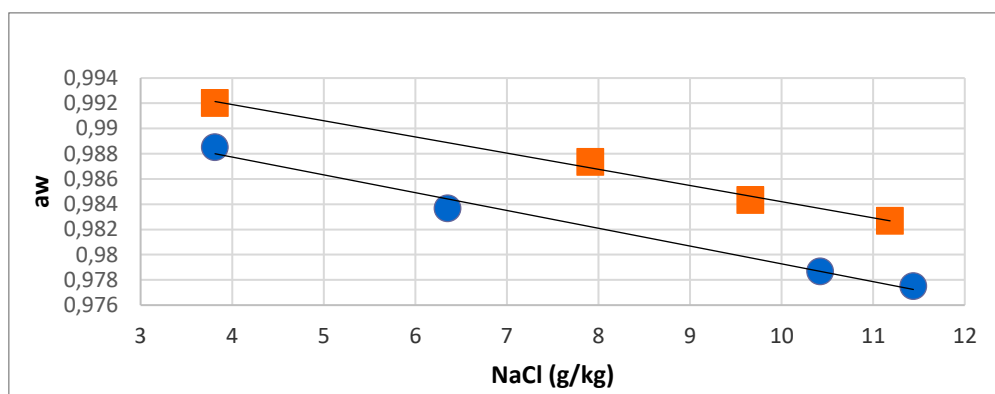


Grafico 3: Correlazione per le due varianti della ricetta 3 (spinaci), tra attività dell'acqua e sale (g/kg), i quadratini colore arancio sono relativi alla variante **a**, mentre i punti colorati in blu sono relativi alla variante **b**.

I grafici di correlazione e la tabella 12 mettono in evidenza un aspetto interessante legato alla formulazione dei ripieni utilizzati nella produzione della pasta fresca. Dai dati ottenuti

sembrerebbe che il contenuto di sale non sia l'unico parametro che influenza l'attività dell'acqua.

I valori dei coefficienti angolari delle rette ottenuti e i valori di attività dell'acqua finali del ripieno sembrerebbero indicare un effetto sinergico delle materie prime utilizzate nelle ricette oggetto della tesi. Infatti si possono notare due effetti significativi:

- a) I valori iniziali di attività dell'acqua a parità di contenuto di sale possono risultare significativamente diversi in funzione delle materie prime fresche utilizzate. Ad esempio il valore di attività dell'acqua della ricetta 2 senza aggiunta di sale risulta pari a 0.984 mentre quello della ricetta 3 risulta pari a 0.992. Entrambe le ricette presentano un contenuto di sale totale pari a circa 0.80 (g/100g). L'utilizzo nella ricetta 3 di materie prime probabilmente più ricche in acqua (esempio spinacio) ha portato ad un contenuto di acqua maggiore (64.5 g/100g) e quindi ad un valore WPS inferiore (1.71 rispetto a 1.98 g/100g della ricetta 2), questo conferma la necessità per gli operatori del settore di effettuare un'attenta valutazione degli ingredienti utilizzati e dei parametri analitici da utilizzare per il controllo della sicurezza del prodotto;
- b) I valori di attività dell'acqua dipendono anche dall'effetto sinergico di alcune materie prime disidratate. Infatti, nelle nostre condizioni sperimentali, a parità di contenuto di sale e di umidità e quindi di conseguenza del valore di WPS, il valore finale dell'attività dell'acqua risulta inferiore e la diminuzione dell'attività dell'acqua all'aumentare della concentrazione di sale risulta maggiore nelle ricette nelle quali una parte della quantità di pane grattugiato è stata sostituita con fibra vegetale e proteine del latte. Questo dato risulta particolarmente interessante perché mette in evidenza che potremmo avere a parità di valori di WPS valori di attività dell'acqua più bassi utilizzando particolari materie prime.

9. Conclusioni

La sperimentazione descritta in questo lavoro di tesi aveva l'obiettivo di valutare l'impatto della formulazione sui valori di attività dell'acqua. A tale scopo sono state sviluppate tre ricette semplificate utilizzando diverse materie prime valutando le variazioni nel contenuto di sale e il valore di attività dell'acqua. Nella pasta fresca farcita il rischio di *Clostridium botulinum* non proteolitico è infatti gestito attraverso il valore di attività dell'acqua finale del prodotto e il controllo in produzione è effettuato attraverso la gestione del sale aggiunto nella ricetta. La validazione di questo punto critico di controllo ha richiesto di valutare come il sale aggiunto variasse il valore di attività dell'acqua della formulazione al fine di stabilire i limiti critici di controllo. I dati ottenuti nelle ricette semplificate sviluppate in laboratorio hanno messo in evidenza alcuni risultati interessanti che ci portano a trarre le seguenti conclusioni:

- a) Esiste una correlazione significativa tra il contenuto di sale aggiunto e il valore di attività dell'acqua;
- b) La variazione del valore di attività dell'acqua all'aumentare della concentrazione di sale dipende dalla formulazione;
- c) Esiste un effetto sinergico tra il sale e le materie prime oggetto della sperimentazione (fibra vegetale e proteine del latte) sul valore di attività dell'acqua finale.

Alla luce dei risultati ottenuti l'azienda ha deciso di proseguire la fase di investigazione utilizzando altre formulazioni e/o materie prime con lo scopo di approfondire l'effetto sinergico rilevato in questo lavoro di tesi.

Pur non consentendo di trarre delle conclusioni definitive il lavoro ha messo in evidenza la necessità di considerare altri aspetti importanti nella valutazione della sicurezza della pasta fresca farcita non limitandosi solamente al valore di WPS che rimane comunque un valido strumento di valutazione iniziale.

Bibliografia

- Alzamora SM, Tapia MS, Welti-Chanes J, (2003), The control of water activity. In: Zeuthen P, Bøgh-Sørensen L, (2003), Woodhead Publishing.
- Barbosa-Cànovas GV, Fontana AJ Jr., Schmidt SJ, Labuza TP, (2007), IFT Press & Blackwell Publishing, Water activity in food Fundamentals and applications.
- Brunelli A, Camilli F, Vitali M, (2005), Processi di filiera alimentare. I Punti critici di controllo. rivista mensile Alimenti & bevande.
- Cabras P, Martelli A, (2004), Piccin, Chimica degli alimenti nutrienti alimenti di origine vegetale alimenti di origine animale integratori alimentari bevande sostanze indesiderabili.
- Cabras P, Tuberoso CIG, (2014), Piccin, Analisi dei prodotti alimentari.
- CCFRA – Campden & Chorleywood Food Research Association, (1996), Guideline no. 11, Code of practice for the manufacture of vacuum and modified atmosphere packaged chilled foods with particular regard to the risk of botulism.
- De Gregorio A, Dichiarante L, Focetola G, Pascale G, Prati R, Zarbà B, (2010), la ISO 22000:2005 dispensa di approfondimento Bureau Veritas settore agroalimentare.
- Friso D, Niero M, (2010), Cleup, Operazioni unitarie dell'ingegneria alimentare, Modelli fisici e matematici Macchine e impianti.
- Gardini F, Parente E, (2013), Springer, Manuale di microbiologia predittiva. Concetti e strumenti per l'ecologia microbica quantitativa.
- Jakobsen TM, Murrell WG, (1977), The effect of water activity and the A_w -controlling solute on germination of bacterial spores.
- Jakobsen TM, Murrell WG, (1977), The effect of water activity and the A_w -controlling solute on sporulation of *Bacillus cereus*.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA, (2009), Springer, Microbiologia degli alimenti.
- LabuzaTP, (1980), The effect of water activity on reaction kinetics of food deterioration.
- Magnani U, Randi MG, Placuzzi G, (1999), EBNA, Manuale di corretta prassi igienica per il settore artigianale della pasta alimentare.
- Manuale delle procedure operative di laboratorio, Voltan s.p.a.
- Manuale di autocontrollo igienico, Voltan s.p.a.

- Matteucci D, Rabazzi S, (2009), EPC LIBRI, La gestione dell'impresa alimentare seconda edizione.
- Poli G, Cocilovo A, Dall'Ara P, Martino PA, Ponti W, (2008), Utet, Microbiologia e immunologia veterinaria seconda edizione.
- Prior BA, (1978), The effect of water activity on the growth and respiration of *Pseudomonas fluorescens*.
- Rahman MS, (2007), CRC Press, Handbook of food preservation second edition.
- Troller JA, (1972), The water relations of food-borne bacterial pathogens – a review
- Troller JA, (1985), Water relations of foodborne bacterial pathogens – an update review.
- U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, (1987), Guideline on general principles of process validation.
- U.S. Department of Health and Human Service, Food and Drug Administration, (2011), Guidance for Industry process validation: general principles and practice.
- Zardetto S, (2014), La pasta fresca: aspetti di qualità tecnologia e sicurezza igienico sanitaria del prodotto italiano nel contesto del mercato europeo, speciale: gli atti del Convegno europeo sulla pasta fresca e gnocchi (Venezia, 30 maggio 2014), rivista bimestrale Pastaria.

Legislazione:

- Decreto del Presidente della Repubblica 9 febbraio 2001, n. 187, Regolamento per la revisione della normativa sulla produzione e commercializzazione di sfarinati e pasta alimentari.
- Decreto legislativo 4 febbraio 1993, n. 65, Attuazione della direttiva 89/437/CEE concernente i problemi igienici e sanitari relativi alla produzione ed immissione sul mercato degli ovoprodotti.
- Legge 4 luglio 1967, n. 580, Disciplina per la lavorazione e commercio dei cereali, degli sfarinati, del pane e delle paste alimentari.
- Regolamenti CE del pacchetto igiene.
- Regolamento CE n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari.

Sitografia:

- <http://www.aqualab.com>.
- <http://www.aroundlabnews.com>.
- <http://www.elearning.unite.it>.
- <http://www.fao.org>.
- <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius>.
- <http://www.inoptima.net>.
- <http://www.jfoodprotection.org>.
- <http://www.onlinelibrary.wiley.com>.
- <http://www.pastaria.it>.
- <http://www.researchgate.net>.
- https://ec.europa.eu/food/safety/rasff_en.
- <https://www.fda.gov>.