

**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute

Corso di Laurea in

Sicurezza Igienico-sanitaria degli Alimenti

Utilizzo degli ultrasuoni nel latte:

**attività antimicrobica ed effetti sulle caratteristiche
organolettiche**

Relatore: dott. Giorgio Marchesini

Laureando: Greta Meneghetti

Anno Accademico 2012/2013

RIASSUNTO

Alcuni prodotti alimentari possono presentare rischi specifici per la salute umana che richiedono l'applicazione di specifiche norme in materia di igiene. Ciò vale in particolar modo per gli alimenti di origine animale, nei quali sono spesso stati segnalati rischi microbiologici e chimici. A causa di numerose segnalazioni di tossinfezioni alimentari derivate dall'assunzione di latte crudo, il latte alimentare destinato al consumo umano diretto deve, secondo la normativa europea, aver subito almeno un trattamento termico ammesso o un trattamento equivalente autorizzato a meno che non sia venduto direttamente dal produttore al consumatore. Le operazioni di risanamento si rendono, quindi, necessarie data l'instabilità e la facile alterabilità del prodotto e data la sua complessa composizione chimica e l'elevata percentuale di acqua presente che lo rendono terreno fertile per lo sviluppo di microorganismi.

Tra i vari trattamenti di sanificazione ammessi la pastorizzazione HTST (*High temperature short time*) è quello più diffuso in quanto garantisce la distruzione di tutti i microorganismi patogeni e di parte rilevante della flora saprofitica, tuttavia a mano a mano che l'intensità e la durata del trattamento termico aumentano, il latte subisce una diminuzione proporzionale delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali causata dalla denaturazione dei componenti termolabili come vitamine idrosolubili e sieroproteine. Per questo motivo si stanno ricercando trattamenti alternativi che hanno l'obiettivo di diminuire, se non eliminare, gli effetti negativi sulle caratteristiche chimiche, fisiche e sensoriali conseguenti ai trattamenti termici garantendo in ogni caso la sicurezza del latte. Questa necessità è sorta anche a causa della difficoltà di commercializzare i prodotti nazionali in ambito comunitario determinata dalla profonda differenza dei metodi di produzione e dei parametri di valutazione della sicurezza del prodotto finito. Tra le nuove tecnologie emergenti per migliorare la sanificazione e aumentare la shelf life nel latte gli ultrasuoni (US) sono stati utilizzati da soli o in combinazione con il calore e/o con la pressione al fine di inibire i microorganismi tipici del prodotto. L'efficacia del trattamento US è garantita dall'effetto di cavitazione che genera energia meccanica, calore e radicali liberi responsabili dell'abbattimento logaritmico di numerosi batteri. Questo studio ha utilizzato otto combinazioni di ampiezza d'onda (A) e durata (D) di US al fine di valutarne l'effetto sull'inibizione di *E. coli*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *D. hansenii* e *Cl. sporogenes* e sulle caratteristiche organolettiche quali odore e sapore del prodotto trattato. A conferma di quanto riportato in diversi studi precedenti, la sonicazione si è rivelata utile nell'abbattimento dei diversi microorganismi testati, anche se generalmente è risultata efficace solo per trattamenti con massima ampiezza (100%) e con una durata superiore ai 200s, intensità e durate che però hanno rivelato la modifica delle caratteristiche sensoriali in quanto più del 50% dei valutatori ha percepito l'aroma di bruciato. Tra gli aspetti positivi da sottolineare troviamo però il miglioramento dei parametri di caseificazione del latte trattato e questo aspetto potrebbe essere maggiormente approfondito in studi futuri.

ABSTRACT

Some foodstuffs may present specific hazards to human health requiring the application of specific rules of hygiene. This is particularly the case for food of animal origin, most of which have been reported having microbiological and chemical hazards. Because of numerous reports of food poisoning derived from the assumption of raw milk, the milk intended for direct human consumption must, according to the European standard, having experienced at least one permitted heat treatment or an equivalent authorized treatment unless it is sold directly from producer to consumer. The sanitization procedures are therefore necessary, given the instability and easy perishability of the product and because of its complex chemical composition and the high percentage of water that make it fertile ground for the development of microorganisms. Among the sanitizing treatments allowed by law, the pasteurization HTST (High temperature short time) is the most common because it guarantees the destruction of all pathogenic micro-organisms and a significant proportion of the commensal flora. However, as the intensity and duration of the heat treatment increase the milk undergoes a proportional decrease of the organoleptic and nutritional characteristics caused by the denaturation of thermolabile components such as water-soluble vitamins and whey protein. For this reason, alternative treatments are under investigation to guarantee procedures that aim to reduce, if not eliminate, the adverse effects on the chemical, physical and sensory characteristics consequent to thermal treatments guaranteeing in any case the safety of the milk. This need has arisen partly because of the difficulty of marketing domestic products at Community level determined by the profound difference in production methods and parameters for assessing the safety of the finished product. Among the emerging new technologies for improving the sanitation and increase the shelf life in milk, ultrasound (US) were used alone or in combination with heat and/or pressure in order to inhibit the microorganisms typical of the product. The effectiveness of the US is guaranteed by the effect of the cavitation that generates mechanical energy, heat and free radicals responsible for the logarithmic reduction of numerous bacteria. In this study eight combinations of wave amplitude (A) and duration (D) were used in order to assess their effect on the inhibition of *E. coli* , *S. aureus* , *P. sfluorescens* , *D. hansenii* and *Cl. sporogenes* and on the organoleptic properties such as taste and odor of the treated product. A confirmation of what reported in several previous studies, the sonication has been proved to be useful in the reduction of various microorganisms tested, although it is generally found to be effective only for treatments with maximum amplitude (100%) and with a duration of more than 200s. The high Intensity and duration, however, resulted in the change of the sensory characteristics since more than 50% of the evaluators perceived the aroma of burning. Among the positive aspects that should be emphasized, however, we found the improvement of the parameters of coagulation of treated milk although this aspect should be more depth in future studies.

INDICE

RIASSUNTO.....	3
ABSTRACT	5
INDICE.....	7
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1. IL LATTE- GENERALITÀ	9
1.1.1. CARATTERISTICHE CHIMICHE DEL LATTE.....	9
1.1.2. CONTROLLI IN ALLEVAMENTO.....	10
1.1.3. IL LATTE CRUDO.....	11
1.2. LA NECESSITÀ DI SANIFICAZIONE	13
1.2.1. PROBLEMI LEGATI ALLA SANITIZZAZIONE.....	16
1.2.2. TRATTAMENTI DI SANITIZZAZIONE ALTERNATIVI.....	17
1.3. GLI ULTRASUONI	20
2. OBIETTIVI.....	23
3. MATERIALI E METODI.....	25
3.1. PROGETTO SPERIMENTALE.....	25
3.2. ORIGINE E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI LATTE.....	25
3.3. INOCULAZIONE DEL LATTE E TRATTAMENTO CON US	25
3.4. ANALISI MICROBIOLOGICA.....	29
3.5. VALUTAZIONE SENSORIALE, PANEL TEST	30
3.6. ANALISI STATISTICA.....	31
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	33
4.1. CHALLENGE TEST:	33
4.1.1. Challenge test sui batteri.....	33
4.1.2. Challenge test su <i>Debaryomyces</i>	35
4.1.3. Challenge test su <i>Cl. Sporogenes</i>	39
4.2. ANALISI SENSORIALE	41
4.3. ANALISI DEI DIVERSI ABBATTIMENTI LOGARITMICI	42
5. CONCLUSIONI	47
6. BIBLIOGRAFIA	49

1. INTRODUZIONE

1.1. IL LATTE- GENERALITÀ

Dal punto di vista legislativo (RD 9/5/29), per latte alimentare si intende il prodotto ottenuto dalla mungitura regolare, ininterrotta e completa di animali in buono stato di salute e di nutrizione.

Il termine <<latte>>, da solo, indica quello di vacca (*Bos Taurus*); per latti di provenienza diversa occorre specificare l'origine.

Il periodo di lattazione, cioè il tempo che intercorre tra l'inizio e l'arresto della produzione di latte, nella vacca, dura in media 200-220 giorni arrivando a 7000 Kg di latte, quantitativo che supera di molto le necessità di crescita di un vitello che si aggira intorno ai 1000 Kg (Cappelli e Vannucci, 2013).

1.1.1. CARATTERISTICHE CHIMICHE DEL LATTE

Il latte è un liquido biologico opalescente, con sapore dolciastro e odore delicato, di composizione complessa.

I costituenti principali sono acqua, proteine, lipidi, zuccheri e sali minerali. La percentuale di acqua nel latte varia sensibilmente a seconda della specie animale, nel latte di vacca è mediamente 87,5%. La frazione proteica comprende due famiglie di proteine: la famiglia delle caseine (circa 80%), queste proteine non coagulano al calore ma per l'azione di enzimi proteolitici o leggera acidificazione e si trovano nel latte sotto forma di micelle che inglobano i sali minerali e, disperdendo la luce, conferiscono il colore bianco al latte. La loro struttura è simile alle proteine denaturate: la formazione della struttura terziaria non avviene e questo le rende stabili al calore e determina l'esposizione dei gruppi idrofobici causa della loro insolubilità. Sono invece facilmente separabili dal latte attraverso centrifugazione e filtrazione grazie alla loro organizzazione micellare. Appartiene a questa categoria di proteine la K-caseina che, a differenza delle altre caseine, non forma aggregati in presenza di ioni Ca⁺⁺ quindi impedisce alle micelle, in condizioni normali, di associarsi e di precipitare svolgendo in questo modo una funzione colloidale.

L'altra famiglia è caratterizzata dalle proteine del siero (circa 20%) che comprendono prevalentemente β -lattoglobulina e α -lattoalbumina che si distinguono dalle caseine in quanto coagulano al calore. La prima presenta proprietà coagulanti e gelificanti, mentre la seconda ha potere batteriostatico e anticancerogeno ed è indispensabile nella ghiandola mammaria per la sintesi del lattosio. Il siero contiene altre proteine come la sieralbumina, importante per individuare le frodi in quanto in sede di analisi consente di riconoscere l'origine del latte e dei formaggi, la lattoferrina e le immunoglobuline, che hanno azione batteriostatica e immunologica.

Oltre a queste sono presenti numerosi enzimi proteolitici e lipolitici come la plasmina, la principale proteasi del latte che si trova, col suo precursore plasminogeno, associata alle micelle di caseina.

I lipidi nel latte vaccino sono circa il 3,5% con oscillazioni in relazione alla razza, all'alimentazione, al periodo di lattazione e al clima. Sono composti per il 99% da gliceridi, fosfolipidi (1%) ed esteri presenti in emulsione sotto forma di globuli di grasso che, avendo peso specifico inferiore a quello dell'acqua, tendono a portarsi in superficie e, con il tempo, a formare uno strato di crema (Cappelli e Vannucci, 2013). Tra i diversi lipidi presenti quelli tipici del latte vaccino sono butirrico, capronico e caprinico che si liberano durante la maturazione dei formaggi conferendone il tipico odore.

Tra gli altri costituenti del latte troviamo i glucidi, di cui il più importante è il lattosio (4,5 g/L) che ha il ruolo fisiologico di fornire al neonato il galattosio, fondamentale per la sintesi delle guaine mieliniche, le vitamine e i sali minerali (<1%) tra cui prevalgono Ca⁺⁺, K⁺, fosfati e citrati.

1.1.2. CONTROLLI IN ALLEVAMENTO

Sebbene in quantità molto limitate, ma non per questo di minor importanza, nel latte sono presenti anche cellule somatiche, batteri e urea. Il controllo di questi elementi costituisce un punto chiave per ottenere un prodotto finito sano e con ottime caratteristiche organolettiche.

Le cellule somatiche sono composte da cellule epiteliali che provengono dalla desquamazione della mucosa interna mammellare e da leucociti. La conta di questi ultimi è utile per individuare la presenza di mastiti subcliniche che, a differenza di quelle acute, non causano alterazioni percepibili del latte.

La carica batterica totale comprende tutti quei microorganismi presenti nel latte in grado di formare colonie sul terreno *Plate Count Agar* dopo 72 ore di incubazione a 30°C.

I diversi microorganismi presenti nel latte crudo giocano diversi ruoli fisiologici, tra questi, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* ed alcune popolazioni fungine hanno la funzione fondamentale di fermentare e di conferire particolari sapori e proprietà al formaggio durante la caseificazione, lattobacilli e bifidobatteri svolgono un importante ruolo salutistico mentre *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Bacillus* e altre forme sporigene o alcuni microorganismi termodurici, sono responsabili del deterioramento del prodotto e *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, assieme alle micotossine prodotte dai funghi, sono causa di patologie anche gravi (Quigley et al., 2013).

Un animale in buono stato di salute non rappresenta una fonte di contaminazione rilevante in quanto non trasmette microorganismi patogeni, ma presenta una carica

batterica bassa costituita principalmente da micrococchi e corynebatteri; in presenza di mastite, invece, la flora microbica che prevale è costituita da streptococchi e stafilococchi.

I germi responsabili della contaminazione del latte provengono sia dalla pelle e dal pelo dell'animale, ed entrano attraverso i pori lattiferi del capezzolo, sia dal sangue in caso di malattia sistemica (*Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*). Per questo motivo, al fine di prevenire contaminazioni, in fase di mungitura i primi getti di latte, che sono i più contaminati, vengono eliminati.

Altre possibili fonti di inquinamento sono l'ambiente di lavorazione, il personale addetto alla mungitura, le attrezzature utilizzate (*E. coli* ed *Enterobacter*) e l'acqua di lavaggio.

Per garantire il raggiungimento dei requisiti igienici del prodotto, è, quindi, necessario intervenire sull'ambiente di allevamento, sul benessere e la salute degli animali e garantire un'adeguata sanificazione delle attrezzature. Per quanto riguarda la prevenzione dalla contaminazione da parte di sporigeni anaerobi (soprattutto del genere *Clostridium*), responsabili del gonfiore tardivo nei formaggi a media-lunga stagionatura, è importante controllare anche la qualità degli insilati, evitando la presenza di terra (principale fonte di contaminazione) e garantirne la corretta conservazione.

Il rispetto delle indicazioni igienico-sanitarie da parte del personale sia in produzione che in lavorazione garantiscono, assieme ai trattamenti di sanificazione e ai moderni sistemi di confezionamento asettico, di ottenere un prodotto salubre per il consumatore.

1.1.3. IL LATTE CRUDO

Alcuni prodotti alimentari possono presentare rischi specifici per la salute umana, che richiedono l'applicazione di specifiche norme in materia di igiene. Ciò vale in particolar modo per gli alimenti di origine animale, per i quali sono spesso stati segnalati rischi microbiologici e chimici (Reg. 853/2004).

Il latte prodotto dagli animali da allevamento può essere destinato al consumo diretto oppure alle industrie di trasformazione.

Il Regolamento (CE) n. 853/2004 stabilisce i criteri per l'immissione del latte crudo sul mercato e integra quelli previsti dal Regolamento (CE) n. 852/2004 relativo alle norme di igiene dei prodotti alimentari. Tali criteri dovrebbero consistere in valori limite, il che implica che, nell'eventualità di un superamento, gli operatori del settore alimentare devono adottare misure correttive e segnalarlo all'autorità competente.

Per quanto riguarda il latte crudo e la crema cruda destinati all'alimentazione umana diretta, ciascuno Stato membro ha l'obbligo di mantenere o di definire misure sanitarie idonee per garantire che nel proprio territorio si raggiungano gli obiettivi del presente regolamento.

Il regolamento definisce inoltre che criterio per il latte crudo usato per la fabbricazione di prodotti lattiero-caseari deve essere tre volte superiore al criterio per il latte crudo raccolto presso l'azienda zootecnica.

Il Regolamento sancisce che gli operatori del settore alimentare devono porre in atto procedure intese a garantire che il latte soddisfi i seguenti criteri:

i) Per il latte di vacca crudo:
Tenore di germi a 30°C (per ml) $\leq 100\ 000$
Tenore di cellule somatiche (per ml) $\leq 400\ 000$

ii) Per il latte crudo proveniente da altre specie:
Tenore di germi a 30°C (per ml) $\leq 1\ 500\ 000$.

Il latte deve essere posto, immediatamente dopo la mungitura, in un luogo pulito, progettato e attrezzato per evitarne la contaminazione. Deve essere immediatamente raffreddato a una temperatura non superiore a 8°C in caso di raccolta giornaliera e non superiore a 6°C qualora la raccolta non sia effettuata giornalmente.

Tuttavia, l'osservanza dei requisiti in materia di temperatura stabiliti nel Regolamento non impedisce completamente la proliferazione batterica durante il trasporto e il magazzinaggio.

La Conferenza Stato-Regioni del 25/01/2007 regola il commercio di latte crudo per il consumo umano e definisce i criteri igienici di processo, riconducibili alla condizione sanitaria degli animali ed all'igiene della mungitura, che dovranno essere valutati nell'azienda di produzione in autocontrollo e successivamente verificati dal Servizio Veterinario.

In particolare, i microorganismi patogeni quali *E.coli* 0157, *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter termotolleranti* devono essere assenti in 25 ml n=5 c=0, le *aflatossine* ≤ 50 ppt (parti per trilione) mentre lo *Staphylococcus aureus* deve rientrare nei seguenti parametri: n=5 m=500 M=2000 c=2.

Dove:

n = numero di unità di campionamento che costituiscono il campione;

m = limite entro il quale il risultato è soddisfacente;

M = limite al di sopra del quale il risultato è insoddisfacente;

c = numero di unità campionarie nelle quali è ammessa la presenza di germi entro il limite di M. Se M è superato anche in una sola unità di campionamento il risultato è inaccettabile.

Il superamento dei limiti sopraelencati deve essere immediatamente comunicato al Servizio Veterinario ed il latte deve essere escluso dalla commercializzazione e ritirato dal mercato qualora sia stato posto in vendita.

1.2. LA NECESSITÀ DI SANIFICAZIONE

Nonostante i limiti di sicurezza per quanto riguarda il tenore in microorganismi e di cellule somatiche imposti dal Regolamento (CE) n. 853/2004, in base a quanto dichiarato nel report del 2012 dall' *European Food Safety Authority e l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)*, nel 2010 i casi di intossicazione alimentare da latte crudo causati da salmonella nell'uomo sono stati l'8,8% in meno rispetto al 2009, mentre sono aumentati quelli di *Escherichia coli*, un batterio comune nell'intestino dell'uomo e degli animali.

La spiegazione deriva dal fatto che il latte veniva consumato tal quale e l'assenza di un trattamento termico impediva l'abbattimento della flora microbica patogena causando patologie in soggetti sensibili come anziani, bambini o donne in gravidanza.

A differenza dei sintomi di intossicazione alimentare da salmonella, che si manifestano a distanza di 6-72 ore dall'ingestione del cibo contaminato con nausea, vomito, diarrea, crampi addominali, emicrania, brividi e febbre, i ceppi di *E. coli* conosciuti con l'acronimo VTEC (*Verocytotoxin E. coli*) hanno assunto la capacità di elaborare tossine molto potenti, definite Verocitotossine, responsabili di focolai tossinfettivi prevalentemente legati al consumo di carne poco cotta, latte crudo e formaggi a latte crudo che possono provocare patologie anche gravi.

Nel 2007 vennero segnalati 3 ricoveri dovuti alla presenza dei sintomi tipici della tossinfezione alimentare a Rimini, Padova, Mantova e nel 2008 addirittura 7 a Bolzano, Ancona, Bologna, Cremona, Mantova, Verona e Torino.

La principale motivazione è stata evidenziata in una circolare del Ministero del *Welfare*, nella quale è stato precisato come il consumo di latte crudo in Italia è a rischio di infezione causata dal batterio *Escherichia coli* O157, che è un ospite inoffensivo dell'intestino dei ruminanti ma che diventa molto pericoloso all'interno dell'organismo umano in quanto, una volta ingerito, produce una tossina che oltre a provocare infezioni intestinali gravi come la colite emorragica, può attraversare la mucosa intestinale ed entrare nella circolazione sanguigna colpendo i reni. Se ingerito dai bambini, inoltre, aumenta ulteriormente la sua pericolosità, in quanto può provocare la sindrome emolitico-uremica (SEU), che nei casi più gravi può esitare in insufficienza renale cronica, con necessità di trattamento dialitico o trapianto d' organo.

Nel 2008 sono stati segnalati in Italia fra 30 e 40 casi sospetti di sindrome emolitico-uremica (ANSA, 2008), per questo motivo, ai fini di tutelare il consumatore ma anche il produttore, sono state rese obbligatorie le diciture negli appositi distributori "da consumarsi previa bollitura", la data di scadenza non può superare i tre giorni ed è vietata la somministrazione di latte crudo nella ristorazione collettiva (G.U. 14/01/2009); inoltre è ammessa la vendita solo dal produttore direttamente al consumatore o presso i distributori automatici che devono riportare le indicazioni sopra descritte. Queste trascrizioni sono state confermate successivamente da un'apposita legge pubblicando sulla Gazzetta Ufficiale n. 24 del 29/01/13, un decreto

di attuazione della Legge n. 189/2012 che fissa le nuove regole per la vendita di latte e crema crudi.

Il latte alimentare destinato al consumo umano diretto deve, quindi, aver subito almeno un trattamento termico ammesso o un trattamento equivalente autorizzato a meno che non sia venduto direttamente dal produttore al consumatore. Per la bonifica e la conservazione del latte liquido, la normativa vigente consente l'utilizzo dei soli mezzi meccanici, delle basse e delle alte temperature, mentre sono vietati i metodi chimici e le radiazioni. I trattamenti termici ammessi sono quindi (legge 03-05-1989 n.169):

a) **Pastorizzazione:** trattamento termico in flusso continuo per almeno quindici secondi a temperatura inferiore al punto di ebollizione ma superiore a 72°C necessario ad assicurare la distruzione di tutti i microorganismi patogeni e di parte rilevante della flora microbica saprofitica.

b) **Sterilizzazione:** trattamento termico idoneo ad assicurare la distruzione di tutti i microorganismi presenti nel latte o che ne impedisca definitivamente la proliferazione

A seconda della durata e dell'intensità (temperatura) del trattamento termico subito, il latte risanato si distingue in:

A. Latte trattato termicamente in cui raggruppiamo:

Latte Pastorizzato: Il termine pastorizzazione deriva dal biologo francese Louis Pasteur. Questi nel 1860 scoprì che riscaldando il vino a 60°C per qualche minuto, venivano bloccati i processi di fermentazione. Da allora le metodologie di pastorizzazione sono state oggetto di numerosi studi e perfezionamenti che, una volta applicati sugli alimenti, hanno permesso di ridurre numerose patologie e, verso la fine del 1800, l'introduzione della pastorizzazione come metodo di sanificazione del latte vaccino, ha dimezzato in un anno la mortalità dei bambini.

Per latte pastorizzato si intende latte ottenuto mediante trattamento termico HTST (*High Temperature Short Time*) ovvero 72-75° C per 15 secondi (il trattamento non deve necessariamente essere unico ma può essere affiancato da un *Low Temperature Long Time* ovvero 60°C per 30 minuti o da trattamenti di pastorizzazione con diversi tempi e temperature che raggiungano un effetto equivalente). La pastorizzazione viene utilizzata sia per produrre latte alimentare (HTST) sia per la caseificazione, la sanificazione di succhi di frutta e per la birra (LTLT). La scadenza è fissata al sesto giorno dopo il trattamento termico. La pastorizzazione del latte è la tecnica più efficace usata oggi per distruggere i batteri patogeni e per inattivare alcuni enzimi in modo tale da aumentare la *shelf-life* del prodotto. Il latte pastorizzato deve avere reazione positiva alla prova della lattoperossidasi (proteina nativa del latte ad attività antiossidante, importante indicatore di qualità del prodotto), reazione negativa alla

fosfatasi alcalina (proteina enzimatica indicatore della qualità di processo inattivata a temperature inferiori a quelle previste nel HTST) e un contenuto di sieroproteine $\geq 11\%$. Le siero proteine sono la frazione proteica termolabile (iniziano a denaturare a temperature $>70^{\circ}\text{C}$) e rappresentano un indice di qualità del prodotto in quanto la loro presenza nel latte è inversamente proporzionale all' intensità del trattamento termico subito.

Latte Fresco pastorizzato: latte ottenuto mediante un solo trattamento termico entro 48 ore dalla mungitura. Reazione positiva alla perossidasi e negativa alla fosfatasi e contenuto in sieroproteine non $<$ del 14%.

Latte Fresco pastorizzato di alta qualità: prodotto da latte crudo che non ha subito nessuna sottrazione delle componenti naturali e confezionato entro 48 ore dalla mungitura. Deve presentare reazione positiva alla perossidasi e negativa alla fosfatasi, il contenuto in sieroproteine non deve essere minore a 15,5%; ed il contenuto in proteine totali non inferiore a 32g/L (decreto MIPAAF, 2003).

Pastorizzato microfiltrato: prodotto del latte crudo sottoposto a microfiltrazione, processo autorizzato dal decreto del Ministero della Salute del 17/06/2002, abbinato al trattamento termico. L'utilizzo combinato di questi due trattamenti garantisce una maggior efficacia contro i microorganismi e conferisce maggior durabilità al prodotto, infatti la scadenza, a differenza dei trattamenti precedenti la scadenza è fissata al decimo giorno successivo a quello della produzione (decreto MIPAAF, 2003). Deve presentare reazione negativa alla fosfatasi e contenuto in sieroproteine $\geq 14\%$.

Pastorizzato ad elevata temperatura (ESL): latte trattato a temperatura di 80-135°C per alcuni secondi. Deve essere indicata in etichetta la dicitura: "latte Pastorizzato ad elevata temperatura" e questo trattamento garantisce una *shelf life* elevata, di circa 30 giorni dal confezionamento determinata direttamente dal produttore (decreto 109/1992). Deve presentare reazione negativa alla perossidasi e alla fosfatasi e contenuto in sieroproteine $\geq 11\%$.

Latte UHT: il trattamento termico di 140-150°C per 1-5 secondi a cui è sottoposto il latte lo rende commercialmente sterile e stabile dal punto di vista microbiologico a tal punto da poter essere conservato a temperatura ambiente. Deve portare la dicitura "Da consumarsi preferibilmente entro" (legge 03-05-1989 n.169) ed avere reazione negativa alla perossidasi e alla fosfatasi.

B. **Latte sterilizzato**: latte ottenuto a seguito di un trattamento a 180-121 °C per 15-20 minuti dopo il confezionamento, questo processo garantisce l'impossibilità di ricontaminazione del prodotto nelle fasi successive alla produzione e una *shelf life* maggiore rispetto agli altri latti alimentari che è fissata preferibilmente a 180 giorni (legge 03-05-1989 n.169). Deve presentare una reazione negativa a perossidasi e fosfatasi.

Le operazioni di risanamento si rendono, quindi, necessarie data l'instabilità e la facile alterabilità del prodotto causata dalla sua complessa composizione chimica e dell'elevata percentuale di acqua presente, che rendono il latte un terreno fertile per molti microorganismi. Inoltre, le numerose operazioni in allevamento, lo stato igienico-sanitario dell'ambiente di produzione e di lavorazione, lo stato di salute dell'animale e i passaggi ai quali il latte è sottoposto durante la lavorazione, costituiscono un'elevata ed ulteriore fonte di inquinamento da eliminare.

1.2.1. PROBLEMI LEGATI ALLA SANITIZZAZIONE

I trattamenti termici sono fondamentali per rendere il prodotto stabile e sicuro dal punto di vista igienico-sanitario ed organolettico. Tra i vari trattamenti sopra elencati la pastorizzazione HTST è quello più diffuso in quanto garantisce la distruzione di tutti i microorganismi patogeni e di parte rilevante della flora saprofitica, (il rimanente non costituisce un pericolo ma al massimo altera il prodotto), inoltre garantisce una conservazione pressoché ottimale delle caratteristiche organolettiche e nutritive del latte crudo.

A mano a mano che l'intensità e la durata del trattamento termico aumenta il latte subisce però una diminuzione proporzionale delle caratteristiche organolettiche e nutrizionali causata dalla denaturazione dei componenti termolabili come vitamine idrosolubili e sieroproteine. Inoltre, essendo il latte costituito da zuccheri e proteine il riscaldamento eccessivo provoca la reazione di *Maillard* che genera reazioni a catena fino alla formazione di Melanoidine, molecole di colore scuro che conferiscono il sapore di cotto. La reazione di *Maillard* nel latte non è mai desiderata perché modifica notevolmente le caratteristiche organolettiche del prodotto finale.

Rampilli, (1992) ha valutato i componenti del colore L^* , a^* , b^* , su 344 campioni commerciali di latte trattati con metodo UHT diretto, indiretto e sterilizzato in bottiglia per determinare gli effetti dei differenti parametri tecnologici sulla composizione e sul colore. Queste relazioni hanno confermato la notevole influenza del trattamento termico sulle caratteristiche di colore del latte verificando che all'aumentare della temperatura la variazione di colore aumentava proporzionalmente.

Lo studio ha, inoltre, affermato che per evitare la reazione di *Maillard* è necessario utilizzare tempi brevi e temperature non troppo elevate durante il trattamento termico, metodo che non sempre garantisce la distruzione totale di tutti i microorganismi patogeni, non patogeni e, soprattutto delle spore, caratteristica garantita, invece, dalla sterilizzazione.

Temperature superiori a 100°C, tipiche del latte UHT e Sterilizzato, generano inoltre, l'isomerizzazione del lattosio a lattulosio, zucchero indigeribile che funziona da fibra solubile e determina il decadimento delle caratteristiche nutrizionali.

Per questo motivo, si stanno ricercando trattamenti alternativi che hanno l'obiettivo di diminuire se non eliminare gli effetti negativi conseguenti ai trattamenti termici garantendo in ogni caso l'inibizione dei microorganismi patogeni ed alteranti.

1.2.2. TRATTAMENTI DI SANITIZZAZIONE ALTERNATIVI

Negli ultimi anni sono state ricercate altre tecnologie alimentari alternative alla pastorizzazione a causa della continua richiesta da parte dei consumatori di prodotti con una migliore qualità e sicurezza (Villamiel e de Jong, 2000).

Questa necessità è sorta anche a causa della difficoltà di commercializzare i prodotti nazionali in ambito comunitario determinata dalla profonda differenza dei metodi di produzione e dei parametri di valutazione della sicurezza del prodotto finito. Per rispondere a questa richiesta il Regolamento (CE) n. 258/97, consente l'immissione sul mercato di prodotti e ingredienti alimentari sottoposti ad un processo di produzione non generalmente utilizzato che comporti cambiamenti significativi nella composizione o nella struttura dei prodotti, del valore nutritivo, del loro metabolismo o del tenore di sostanze indesiderabili.

Tra i trattamenti alternativi prevalentemente utilizzati oggi troviamo la bactofugazione, i trattamenti ad elevate pressioni e la microfiltrazione.

La bactofugazione sfrutta l'azione combinata del calore, con temperature che vanno dagli 65 agli 80 °C per il latte destinato al consumo diretto mentre < a 65°C per quello destinato alla caseificazione, e di una centrifugazione a velocità elevata. (Cappelli e Vannucci, 2013). Questo metodo, maggiormente utilizzato per la caseificazione, sfrutta la forza centrifuga per separare microorganismi e spore più pesanti (eliminazione fino al 98%).

Trattamento ad elevate pressioni HPP (*High Pressur Processing*): è una tecnica già nota dal 1899 grazie allo statunitense Hite che la propose per conservare più a lungo il latte, ma le sue idee non vennero più sviluppate, essenzialmente perché mancavano ancora i macchinari adatti per sottoporre anche gli alimenti a questo tipo di trattamento. Oggi, sebbene ancora oggetto di studi, il suo utilizzo è consentito per il trattamento di alcuni alimenti anche in ambito comunitario ed è presente in commercio a costi ragionevoli anche grazie alla continua domanda del consumatore di minimi processi di trasformazione del cibo. Il metodo sfrutta l'impiego delle alte pressioni in tempi che vanno da millesimi di secondi a più di venti minuti in assenza di calore. Per questo è definito un metodo atermico in cui non è necessario che la temperatura del prodotto salga di molto per ottenere la devitalizzazione delle forme microbiche presenti nel substrato alimentare (*Earnshaw et al., 1995*). Grazie all'assenza di calore non avviene la reazione di Maillard, problema molto presente nei metodi precedentemente illustrati; inoltre, proprio l'assenza di calore, potrebbe garantire il mantenimento delle proprietà organolettiche e nutrizionali native del latte senza una significativa modificazione del prodotto finito e parallelamente potrebbe

consentire l'eliminazione di eventuali microorganismi patogeni e la riduzione della carica microbica totale. L'azione su microorganismi e proteine sembra essere modulata dalle caratteristiche dell'alimento (a_w , concentrazione di sale o zucchero, acidità), ma rimane tuttavia una variabile significativa legata alle caratteristiche intrinseche di ogni microorganismo. Isaacs et al. (1995) hanno dimostrato la distruzione ribosomiale in *E.coli* e *L. monocytogenes* con successiva morte cellulare a seguito del trattamento; anche le spore, sebbene resistenti alle alte pressioni, sono risultate indebolite. Questa tecnica rientra nelle *Mild Technologies*, e si può applicare sia ad alimenti solidi che liquidi, con la differenza che mentre nei liquidi la pressione è esercitata direttamente sull'alimento, per i prodotti solidi è necessario il confezionamento sottovuoto e la successiva immersione in acqua. Per quanto riguarda latte, latticini e succhi di frutta tale tecnica è finalizzata alla pastorizzazione a freddo, quindi come metodo di risanamento alternativo, mentre per gli altri alimenti può avere lo scopo di congelare e scongelare in modo omogeneo il prodotto oppure di trasformare le proteine da solubili a fibrose in modo tale da renderle masticabili, e più facilmente resistenti al calore. Durante i diversi studi però, è stato individuato che alcune cellule vegetative dopo un'apparente inattivazione nei primi stadi del ciclo di pressione, a causa di un danno sub-letale, possono riprendere la crescita. Si è inoltre evidenziato che prodotti come carne, pesce, latticini e lattiero-caseari trattati con HPP, tendono a avere un pH più neutro e fornire un ricco mezzo di crescita per la maggior parte dei microorganismi anche patogeni. Questo problema diventa significativo per le aziende che utilizzano questo metodo in quanto non possono più assicurare la salubrità totale del prodotto finito ed è una delle ragioni per cui, ad oggi, ci sono relativamente poche applicazioni commerciali di HPP per carne e prodotti caseari (Brennan, 2006).

La microfiltrazione, invece, è un sistema dove la frazione lipidica del latte, viene separata, tramite centrifugazione, dalla componente magra che viene filtrata attraverso una membrana porosa (diametro 1-5 μ) e trattata termicamente (120-140°C). Successivamente le due frazioni vengono unite e pastorizzate HTST (72-75°C per 15-20 secondi) questo fa assumere al prodotto finito il termine di ESL (*Extended Shelf Life*) con data di scadenza stabilita al decimo giorno successivo a quella del trattamento termico. In etichetta deve riportare la dicitura "latte microfiltrato pastorizzato" (DM 24/07/03).

Oltre alle metodologie sopra elencate si stanno affermando nuovi metodi come la sterilizzazione Ohmica, la tecnologia CEPAL (campi elettrici pulsanti ad alta intensità), la tecnologia a impulsi di luce, i campi magnetici oscillanti e gli archi di scala elettrici ad alto voltaggio.

In tutti i casi si verifica l'inattivazione della carica microbica con impercettibile variazione delle proprietà organolettiche tranne nel caso della tecnologia ad impulsi di luce in cui la lunghezza d'onda causerebbe la presenza di composti indesiderati che vengono poi eliminati attraverso la filtrazione. Per quanto riguarda i campi magnetici,

l'inibizione dei microorganismi è ancora sperimentale e si ottiene sottoponendo le colture a un campo magnetico o ad un campo elettrico indotto.

In particolare il trattamento ohmico è applicato al latte e ad altri liquidi con vantaggi di riscaldamento rapido ed uniforme, un significativo effetto sterilizzante e una riduzione del danno termico rispetto ai metodi convenzionali. La tecnologia di riscaldamento ohmico è promettente come un metodo più efficace e meno costoso per il trattamento di prodotti alimentari liquidi. Questo in quanto, a differenza dei trattamenti termici quali pastorizzazione, in cui il calore si propaga lentamente per convezione dalle parti più esterne, maggiormente sottoposte al flusso convettivo, verso quelle più interne, il trattamento ohmico è endogeno ovvero genera il calore all'interno di un corpo a causa della corrente elettrica alternata che trasferisce la potenza elettrica al corpo stesso e viene dissipata sotto forma di calore per effetto *joule* (Sun *et al.*, 2011). Grazie alla generazione di calore interna si riduce anche la formazione di prodotti della reazione di *Maillard* e questo consente di minimizzare il deterioramento delle proprietà organolettiche pur mantenendo l'efficacia contro i microorganismi. Tra gli aspetti negativi però, bisogna considerare che questo metodo dipende fortemente dalla conducibilità dell'alimento e non tutti gli alimenti sono buoni conduttori (dipende dalla percentuale di acqua e lipidi, dalla presenza di ioni) di conseguenza i tempi di trattamento variano fortemente. Questo è dovuto anche al fatto che la conducibilità è inversamente proporzionale alla temperatura e un alimento estremamente liquido non potrà essere processato completamente altrimenti si deteriorerà in maniera irreversibile.

L'irradiazione rientra tra i metodi di sanificazione del cibo più controversi dal punto di vista dell'accettazione da parte del consumatore che individua nell'alimento trattato una possibile fonte di radiazione, inoltre in Italia gli alimenti irradiati commercializzabili sono attualmente patate, aglio, cipolle e spezie per salumeria e solo al fine di evitare la germinazione (DM 30/08/1973). Inoltre questa metodologia porta, soprattutto in alimenti ricchi in acqua, alla sulle componenti minori quali le vitamine. (Brennan, 2006).

1.3. GLI ULTRASUONI

Come abbiamo visto nel paragrafo precedente i metodi alternativi alla pastorizzazione e alla sterilizzazione negli ultimi anni stanno aumentando notevolmente e ciò nasce dalla necessità di ottenere prodotti salubri e sicuri che allo stesso tempo presentano caratteristiche organolettiche ottimali a differenza dei metodi tradizionali dove il calore troppo intenso e i tempi prolungati creano composti indesiderati e la perdita del valore nutritivo (Marsili, 2003). Tuttavia l'applicabilità di molti trattamenti sopradescritti risulta difficoltosa e spesso presenta costi molto elevati di mantenimento.

Tra le nuove tecnologie emergenti per migliorare la sanificazione e aumentare la shelf life nel latte gli ultrasuoni (US) sono stati utilizzati da soli o in combinazione con il calore (termosonicazione) o con la pressione per alcune applicazioni industriali come ad esempio l'applicazione delle procedure igieniche (Kivelä, 1996; Bermúdez-Aguirre et al., 2009), l'inattivazione di batteri (García et al., 1992; Piyasena et al., 2003) ed enzimi (Vercet et al., 1997), oltre che per l'omogenizzazione del latte (Gaffney, 1997; Cameron et al., 2009) e per aumentare della resa del formaggio in caseificazione (Müller, 1992).

Nel corso dell'ultimo secolo sono state condotte numerose ricerche riguardo alla capacità degli US di distruggere le strutture biologiche e si è constatato che, se applicati con intensità sufficiente, possono causare la morte cellulare. Questa capacità è stata scoperta durante la guerra quando il sonar è stato studiato per l'impiego contro i sottomarini. Si era notato, infatti, che le onde sonore utilizzate per individuare la presenza del nemico uccidevano i pesci. Successivamente lo studio degli ultrasuoni come metodo per distruggere o inattivare le cellule è implementato notevolmente e, nel 1960 la ricerca si è concentrata nella comprensione dei meccanismi di interazione tra gli ultrasuoni e le cellule microbiche (Earnshaw, 1995).

Nel 1965, le sperimentazioni hanno portato alla luce la motivazione della morte cellulare, a seguito di indagini sul fenomeno della cavitazione che sembra essere la principale causa del meccanismo battericida assieme al riscaldamento localizzato e alla liberazione di radicali liberi (Butz e Tauscher, 2002; Fellows, 2000).

Durante il trattamento con gli ultrasuoni la principale forza attiva è quella che risulta dalla formazione e successiva esplosione di bolle all'interno del liquido chiamato appunto cavitazione (Villamiel e de Jong, 2000) questo fenomeno è associato alla produzione di calore, a causa del movimento delle molecole in cui gli ultrasuoni si propagano.

La cavitazione può essere stabile o transitoria e questo produce due effetti diversi. La prima si origina da un ciclo con molte oscillazioni che genera piccole bolle di gas. Queste, durante il passaggio degli ultrasuoni nel liquido, iniziano a oscillare e vibrare creando piccoli vortici e, interscambiando gas, aumentano di dimensioni. Altre bolle possono essere attratte dal campo di sonicazione e creare microcorrenti che si

diffondono all' interno del liquido. Questo effetto è noto come *microstreaming* e fornisce un'enorme forza meccanica senza che le bolle debbano scoppiare. Questo movimento delle molecole crea un effetto di sfregamento sulle membrane cellulari con successiva rottura delle stesse (Russell.2002).

La cavitazione transitoria, invece, si verifica quando la dimensione della bolla cambia molto più velocemente ovvero all' interno di un ciclo con poche oscillazioni e termina quando alla fine la bolla collassa liberando momentaneamente elevate pressioni (maggiori di 100 MPa) e temperature (maggiori di 5000 °K). Queste elevate temperatura e pressioni localizzate bombardano la membrana cellulare a tal punto da danneggiarla e addirittura rimuovere particelle dalle superfici (Earnshaw R.G.,1995). Inoltre parte dell'energia può essere assorbita per il riscaldamento del mezzo (Floros & Liang, 1994) e, poiché il riscaldamento è all'interno del campione e la temperatura della parete delle apparecchiature è inferiore alla temperatura del liquido; si verifica una migliore distribuzione della temperatura e questo potrebbe offrire alcuni vantaggi rispetto ai sistemi di riscaldamento convenzionali anche con meno formazione di incrostazioni, quindi la qualità del prodotto potrebbe essere migliorata (De Jong et al., 1992; De Jong, 1996).

La frequenza degli ultrasuoni influenza notevolmente la dimensione delle bolle. A basse frequenze (20KHz) le bolle prodotte sono molto grandi e quando collassano liberano elevata energia mentre ad elevate frequenze la formazione di bolle diventa difficile e ad elevate frequenze, attorno ai 2.5 MHz, la cavitazione non si verifica (Alliger, 1975). Il fenomeno è inoltre influenzato negativamente dalla viscosità del liquido, quindi associandolo a fenomeni termici che diminuiscono la viscosità, è possibile favorire la penetrazione degli US.

Oltre all'effetto della cavitazione, la sonicazione causa la rottura delle catene delle molecole di DNA in diversi frammenti che sono particolarmente sensibili all'attacco dei radicali liberi generati a loro volta dal fenomeno della sonolisi. Queste sostanze chimiche possono indurre reazioni di ossido-riduzione all'interno del mezzo e contribuiscono all'abbattimento logaritmico dei microorganismi (Riesz e Kondo , 1992; Butz and Tauscher, 2002).

Anche se esistono già dei brevetti su sistemi ad ultrasuoni per l'inibizione batterica attualmente le industrie lattiero-casearie non utilizzano questa tecnica in quanto gli studi che la riguardano sono molto limitati soprattutto per quanto riguarda gli aspetti di consumo energetico degli ultrasuoni ad uso continuo, inoltre, esistono pareri discordanti riguardo alla diversa capacità dei microorganismi di resistere agli ultrasuoni (Villamiel e de Jong, 2000). Le spore, ad esempio, sono relativamente resistenti agli effetti e sarebbero necessari tempi lunghi per rendere il prodotto sicuro (Piyasena et al., 2003). Per migliorarne l'efficienza, dunque, sarebbe meglio combinarli con altri trattamenti come ad esempio l' associazione con il calore o con le elevate pressioni. Altri fattori che sono noti per influenzare l'efficacia di inattivazione

microbica sono l'ampiezza delle onde ultrasoniche, l'esposizione/tempo di contatto, il volume del prodotto sottoposto agli US, la sua composizione e la temperatura di trattamento (USDA, 2000).

Possiamo distinguere gli ultrasuoni in due grandi categorie:

Low Intensity ultrasound che utilizzano frequenze molto alte, tipicamente 2-20 MHz con intensità di potenza bassa che va da 100mWcm^2 a meno di 1Wcm^2 . Sono impiegati principalmente nelle immagini non invasive e risulta un metodo abbastanza definito in settori industriali e analitici per misurare fattori quali la composizione, la maturazione, l'efficienza di emulsione e la concentrazione o dispersione di particelle all'interno di un fluido.

High Power ultrasound, invece, utilizza frequenze più basse, normalmente nell'intervallo di 20-100 KHz (generalmente meno di 1 MHz), e può produrre molta più potenza, nell'ordine di $10\text{-}1000\text{Wcm}^2$. La bassa frequenza ha energia sufficiente a rompere i legami intermolecolari ed energie maggiori di 10Wcm^2 generano effetti di cavitazione che possono alterare alcune proprietà fisiche del prodotto nonché migliorare o modificare molte reazioni chimiche. È noto da tempo che gli ultrasuoni sono in grado di distruggere strutture biologiche e produrre effetti permanenti nel mezzo a cui è applicato, ma la proposta di utilizzarli per l'inattivazione microbica negli alimenti è stata da poco considerata ed è tuttora oggetto di studi (Brennan, 2006).

2. OBIETTIVI

Volendo introdurre la tecnologia US nella filiera del latte come metodo alternativo ai trattamenti termici finora utilizzati, risulta necessario valutarne non solo l'effetto battericida sui microorganismi tipicamente presenti nel prodotto soggetto al trattamento, ma anche l'eventuale incidenza sulle caratteristiche organolettiche del prodotto finito.

A tale proposito, il latte è stato sottoposto a 8 combinazioni di ampiezza d'onda (A) e durata (D) individuate durante la prima fase di sperimentazione da Marchesini et al. (2012) per poterne valutare:

1. Effetto inibitorio, misurato dopo il trattamento (t_0) e dopo 48 ore (t_{48}), su potenziali patogeni Gram+ e Gram-, batteri alteranti, lieviti e spore:

- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525
- *Debaryomyces hansenii* CBS 767
- Spore di *Clostridium sporogenes* ATCC 3584

2. Effetto sulle caratteristiche organolettiche quali odore e sapore del latte trattato con ciascuna delle singole combinazioni di A e D prese in esame.

3. MATERIALI E METODI

3.1. PROGETTO SPERIMENTALE

Sono state testate otto combinazioni di intensità, A (70%, 100%) e durata di sonicazione, D (50s, 100s, 200s e 300 s) per determinare i loro effetti sull'inattivazione microbica di *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Debaryomyces hansenii* nel latte crudo. Le stesse combinazioni, eccezion fatta per quelle a lunga durata (300 s), sono state applicate per valutare l'effetto degli US sulle proprietà sensoriali del latte (Marchesini et al., 2012).

3.2. ORIGINE E PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI LATTE

Il latte crudo intero è stato fornito dalla Centrale del Latte di Vicenza, ed è stato suddiviso in due lotti in base ai trattamenti di seguito riportati:

- Latte crudo omogeneizzato immediatamente dopo il suo arrivo alla centrale (L1);
- Latte omogeneizzato e pastorizzato ottenuto dallo stesso lotto da cui proveniva L1 (L2) utilizzato nell'analisi sensoriale al fine di garantire la sicurezza microbiologica ai giudici del panel test.

A causa dell'impossibilità di sonicare in uno stesso giorno un volume di latte sufficiente per tutte le analisi e per tutti i trattamenti, la sonicazione è avvenuta in giorni diversi: ogni giorno il latte è stato prelevato alle 8.00 di mattina e sottoposto a due diversi trattamenti.

3.3. INOCULAZIONE DEL LATTE E TRATTAMENTO CON US

I campioni di latte derivanti da L1 sono stati conservati a 4°C al buio prima di essere inoculati con i microorganismi. Il latte è stato inoculato con i seguenti ceppi di riferimento: *E. Coli* (ATCC 8739), *S. aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), lieviti di *Debaryomyces hansenii* (CBS 767). La preparazione degli inoculi per ciascun microorganismo è stata eseguita secondo quanto stabilito dalla UNI EN ISO 6887-5:2010, le cellule erano in fase stazionaria, con un inoculo iniziale pari a 10^5 - 10^6 CFU/ml. La procedura di *Cl. sporogenes*, verrà descritta a parte in quanto differente rispetto agli altri ceppi.

Per ogni microorganismo è stato contaminato un litro di latte crudo mantenuto a 37° C e, al fine di distribuire il microorganismo in tutto il mezzo, è stata eseguita un'omogeneizzazione attraverso l'utilizzo di un agitatore magnetico. Successivamente 100 ml di latte inoculato sono stati versati in ciascuno dei 10 beaker (Duran Group, Mainz, Germany) da 150 ml utilizzati per la sonicazione e numerati in base al trattamento che avrebbero subito.

Per ciascun microorganismo, un beaker è stato utilizzato come controllo senza quindi subire alcun trattamento di sonicazione.

Per ogni controllo, a seguito di delle diluizioni in provetta fino ad una carica di 10^{-6} CFU/ml, 0,1ml di latte inoculato è stato prelevato dalle diluizioni su cui si presupponeva si potessero contare in modo ottimale le colonie ed è stato seminato su tre piastre con tecnica *spreading*. Per *E. coli* la semina è avvenuta per *pouring* quindi anziché 0,1 mL è stato prelevato 1mL messo in piastre Petri vuote e poi ricoperto dal terreno a 48°C precedentemente preparato. A seguito di ciò i controlli seminati su piastra sono stati messi in incubazione alla temperatura ottimale di crescita per ciascun microorganismo:

- *E. coli* ATCC 8739, (semina per pouring in TBX 44°C x 24 h **UNI ISO 16649-2: 2010**)
- *S. aureus* ATCC6538, (semina per spreading in BP+RPF gradi ed ore **UNI EN ISO 6888-2: 2004**)
- *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525, (semina per spreading in CFC 25 °C x 48h **CCFRA met. 2.5.1:2003**)
- *Debaryomyces hansenii* CBS 767, (semina per spreading in OGYE 25° x 5 giorni in quanto il lievito necessita di tempi più lunghi per crescere **CCFRA met. 2.1.1:2007**)
- *Clostridium sporogenes* ATCC 3584 (semina per spreading in ISA e RCA-lattato, tempi e temperature descritti in seguito)

I nove campioni restanti per ciascun microorganismo sono stati invece trattati.

Il trattamento con US del latte contaminato è stato eseguito in batch (sonda immersa in un contenitore con 100 ml di latte) utilizzando un processore ad ultrasuoni (UP400S, Hielscher Inc., Ringwood, NJ, USA) con le seguenti caratteristiche: 400 W e 24 kHz. I campioni (100 ml) sono stati trattati singolarmente posizionando una sonda con un diametro di 22 mm all'interno del beaker immerso in una vasca di ghiaccio al fine di evitare il surriscaldamento del campione. Durante tutti gli esperimenti, la temperatura di ogni campione è stata misurata prima e dopo il trattamento tramite l'utilizzo di un termometro ad infrarossi.

Tutti gli esperimenti sono stati ripetuti almeno due volte. I trattamenti effettuati sono riportati in tabella 1.

Trattamento	Ampiezza d' onda %	Durata s
controllo	0	0
A	100	50
B	100	100
C	100	200
D	100	300
E	70	50
F	70	100
G	70	200
H	70	300

Tabella 1: combinazioni di A e D eseguite durante la sperimentazione.

Per determinare la possibilità di sviluppo delle endospore di *Cl. sporogenes* nel latte, sono stati preparati i seguenti campioni:

1. Inoculo trattato termicamente diluizioni: 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} .
2. Latte crudo diluizioni: madre; 10^{-1} .
3. Latte crudo trattato termicamente diluizioni: madre; 10^{-1} .
4. Latte crudo inoculato diluizioni: 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} .
5. Trattamento US 70% per 100 s diluizioni: 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} .
6. Trattamento US 100% per 600 s: madre; 10^{-1} ; 10^{-2} .

Note: i campioni 5 e 6 hanno durata di trattamento doppi in quanto il latte contaminato presenta in un volume doppio (200ml) quindi sono necessari più secondi per permettere lo stesso effetto di abbattimento logaritmico.

Per prima cosa il latte crudo è stato messo in una beuta (marca) da 500ml, in seguito è stata preparata la diluizione (10^{-1}) per il latte crudo (madre) e questo è stato possibile prelevando 1 ml dalla madre e mettendolo in una provetta contenete 9 ml di MRD.

Successivamente è stata preparata una sospensione di spore di *Cl. sporogenes* a concentrazione nota, in seguito sono stati preparati il campione 3 e 1 (mettendo le relative provette in acqua a temperatura di 80°C per 15 minuti). Una volta passato il tempo stabilito le due provette sono state messe a raffreddare in acqua per cinque minuti a seguito dei quali è stato preparato il campione 4 (inoculando in una beuta da

500ml 1ml dell' inoculo precedentemente sottoposto a trattamento termico e avente una carica di 10^7 CFU/ml) e, per ciascun campione, sono state preparate, seguendo sempre lo stesso metodo (prelievo di 1ml e inoculo in 9 ml di MRD), le diluizioni sopraindicate, stabilite in base alla necessità di ottenere in piastra un numero di colonie contabili ovvero compreso tra 10 e 300. Dalla beuta contenete il latte crudo inoculato, sono stati prelevati 200ml da sottoporre al trattamento US 70% per 100s e altri 200ml da sottoporre all'altro trattamento (100% per 600s). Durante la sonicazione di questi due campioni è stata misurata la temperatura prima e dopo il trattamento e si è notato un aumento di circa quattro gradi (da 19.7°C a 24°C) per il primo mentre di oltre 25 gradi (da 19.7°C a 50.5°C) per il secondo trattamento.

Le durate riportate (100s e 600s) sono necessarie in quanto il volume presente in ogni beaker sottoposto a sonicazione è doppio rispetto a quello studiato per verificare gli effetti sull'abbattimento logaritmico. Questo perché per proseguire con la sperimentazione è necessario un volume maggiore che verrà suddiviso in seguito.

Una volta preparati tutti i campioni sopraindicati, si è proceduto alla semina per *spreading* sulle corrispettive piastre preparate precedentemente ed aventi come terreno ottimale per la crescita del *Cl. sporogenes* l' *RCA e lattato*, e alla successiva incubazione nelle giare per anaerobiosi dove sono stati lasciati a 37 °C per tre giorni. I beaker 4(latte crudo inoculato), 5(70% 50s) e 6(100% 300s) sono stati posizionati in cella frigorifera a 4°C per lo stesso tempo.

Passati i tre giorni, sono state, infine contate le colonie apparse sulle piastre incubate a 37°C in anaerobiosi ma, visto i risultati, che indicavano una carica batterica invariata rispetto a quella seguente all' inoculo, per verificare l'eventuale possibilità di aver danneggiato le cellule durante il trattamento precedente sono stati preparati i seguenti campioni a partire dai campioni 4, 5 e 6 conservati in cella frigorifera a 4°C:

4a. latte inoculato tal quale (TQ)

5b. 70% 50s (TT)

4b. latte inoculato trattato termicamente a 80°C per 15 minuti (TT)

6a. 100% 300s (TQ)

5a. 70% 50s (TQ)

6b. 100% 300s (TT)

Note: in questo caso i due trattamenti di sonicazione sono stati eseguiti con le combinazioni di durata e intensità standard (70% 50s e 100% 300s) in quanti i campioni, derivanti dai beaker precedenti da 200ml, contenevano un volume di 100 ml.

Anche in questo caso è stata misurata la temperatura prima e dopo il trattamento la temperatura è aumentata a 50°C per il trattamento più intenso (100% 300s) mentre è variata nell'ordine di 7°C per quello meno invasivo (70% 50s).

A seguito del trattamento i vari campioni sono stati piastrati e incubati in giare per anaerobiosi a 37°C per 48 ore mentre i beaker sono stati lasciati una notte a 15°C. Il giorno successivo sono stati ripetuti i trattamenti per i tre beaker e le piastre sono state messe in anaerobiosi a 37°C per 48 ore. Nei due giorni successivi sono stati, infine contati i risultati.

In secondo luogo per la valutazione della crescita del *Cl. sporogenes*, invece del latte crudo, è stato utilizzato latte UHT, trattato termicamente per assicurare la mancanza di eventuali forme vegetative, ed è stata eseguita la stessa procedura sopra descritta, utilizzando però come terreno di semina *l'Iron sulphite agar*.

Nel giorno t_0 sono stati preparati i campioni:

1. inoculo trattato termicamente (TT);
2. Latte UHT;
3. Latte UHT (TT);
4. Latte UHT inoculato;
5. 70% 50s;
6. 100% 300s;

I campioni sono stati piastrati e le piastre sono state messe in giare per anaerobiosi a 37°C per 3 giorni mentre i beaker sono stati messi in cella frigorifera a 4°C per lo stesso tempo.

Passati i tre giorni sono state lette le piastre di t_0 e i campioni in cella sono stati trattati nel seguente modo:

4. Latte inoculato tal quale (TQ) e trattato termicamente (TT) a 80°C per 15 minuti;
5. Latte sonicato 70% 50s (TT) e (TQ);
6. latte sonicato 100% 300s (TT) e (TQ).

Le piastre sono state messe in anaerobiosi a 37°C per 48 ore mentre i beaker con i campioni sono stati messi in una camera a temperatura controllata e costante di 15°C per una notte al seguito della quale è stato ripetuto il secondo trattamento sopradescritto. Anche in questo caso le piastre sono state messe in anaerobiosi a 37°C per 48 ore, mentre i campioni sono stati messi a 25°C per una notte.

3.4. ANALISI MICROBIOLOGICA

La conta di ciascun microorganismo è stata valutata dopo il trattamento a US (t_0) e dopo un periodo di riposo di 48h (t_{48}) durante il quale il campione è stato conservato a 4°C. I campioni sono stati chiusi e contati secondo gli standard UNI ISO 16649-2:2010, UNI EN ISO 6888-2:2004, CCFRA met. 2.5.1:2003 e CCFRA met. 2.1.1:2007 rispettivamente per *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas fluorescens* e *Debaryomyces hansenii*.

La conta di *Cl. sporogenes* per quanto riguarda il latte crudo e quello UHT è avvenuta in tre giorni diversi:

1. T dopo 3 giorni in anaerobiosi a 37°C.
2. T dopo 3 giorni a 4°C.
3. T dopo 3 giorni a 4°C e una notte a 15°C.

Le colonie apparse si presentavano di colore nero e sono state contate quelle che erano presenti in numero maggiore di 10 e minore di 300 utilizzando la formula seguente:

$$N = \Sigma c / V(n_1 + 0.1n_2)d \text{ dove:}$$

Σc : somma delle colonie contabili.

V: volume di inoculo in piastra (0.1ml)

$n_1 + n_2$: numero delle piastre impiegate

d: prima diluizione considerata nella conta.

N: CFU/ml.

3.5. VALUTAZIONE SENSORIALE, PANEL TEST

Al fine di indagare sulle caratteristiche sensoriali del latte a seguito dei diversi trattamenti con ultrasuoni (combinazioni di durata e ampiezza) è stato applicato un test discriminante utilizzando come riferimento un latte pastorizzato. Tale test ha permesso ai componenti del team di valutazione di cogliere le differenze gustative e dell'aroma del latte trattato da quello non trattato e verificare la capacità di associarle ai diversi trattamenti. Il metodo utilizzato è stato quello riportato da Marchesini et al. (2012) ovvero il test duo-trio. I test sono stati eseguiti rispettando i metodi descritti nella normativa ISO 10399 (2004) e valutati da un team addestrato a condurre il Panel Test ($n = 29 \pm 1$).

La valutazione del gusto di ogni campione è stata condotta il mattino e replicata il pomeriggio del t_0 . I valutatori hanno ricevuto due campioni (50 ml) di latte pastorizzato derivante dal lotto L2 ed uno riconosciuto come riferimento (RIF o controllo). I due campioni sono stati distribuiti in modo casuale con l'obiettivo di compararli con il campione di latte non trattato (controllo). I valutatori dovevano quindi scegliere il campione che più si avvicinava al controllo e descrivere le caratteristiche del campione trattato con ultrasuoni sottolineandone le differenze tramite l'utilizzo dei seguenti aggettivi: vecchio, gommoso, cartone, bruciato, pungente, aspro, caramello, latte bollito, metallo, plastica, dolce e amaro (Chouliara et al., 2010; Hougaard et al., 2011; Karatapanis et al., 2006). La valutazione sensoriale è stata condotta in cabine individuali illuminate da una luce verde per impedire ogni discriminazione visiva. Inoltre, per aiutare a pulire il palato, sono stati messi a

disposizione acqua deionizzata e cracker non salati. Un'ora prima della valutazione, il latte è stato posto in contenitori di vetro ciascuno codificato con un numero composto da 3 cifre casuali, come nella procedura descritta nello standard ISO 22935-2 (2009) e portato a una temperatura costante (16 ± 2 °C) grazie all' utilizzo di un frigo termostato due ore prima della prova.

Contando il numero di riconoscimenti corretti rispetto al numero di giudici impiegati è possibile fornire un'informazione sull'esistenza o meno di differenze statisticamente significative e percepibili.

3.6. ANALISI STATISTICA

I dati sono stati sottoposti ad un'analisi statistica come il logaritmo della differenza tra controllo e ogni combinazione di trattamento (ampiezza *per* durata). Un valore <0 (valore negativo) indicava una riduzione dell'UFC di uno specifico batterio e >0 (valore positivo) ne indicava l'aumento. Per verificare la normalità della loro distribuzione, presupposto essenziale per poter eseguire l'analisi della varianza (ANOVA), è stato utilizzato il test di *Shapiro-Wilk* (PROC UNIVARIATE).

Si è proceduto dapprima a un confronto tra latte controllo e latte trattato per testare l'effetto della sonicazione a prescindere dalle varie tipologie di trattamento utilizzate. Il data set relativo al latte trattato è stato poi utilizzato per verificare l'influenza di ampiezza d'onda (A) e tempo di sonicazione (T).

Per quanto riguarda *E. coli*, *P fluorescens* e *S. Aureus*, dopo averne verificato la normalità, i dati (logaritmo dalla differenza tra controllo e la tesi del trattamento) sono stati analizzati utilizzando una procedura *MIXED*. Il tempo di deterioramento è stato considerato come una misura ripetuta mentre la differenza tra i livelli di trattamento è stata valutata utilizzando l'opzione PDIFF secondo Bonferroni.

Poiché i dati relativi a *Debaryomyces* non erano normalmente distribuiti (W-value <0.90), sono stati analizzati usando il metodo non parametrico di *Kruskal-Wallis* (PROC NPAR1WAY) per valutare le differenze tra i trattamenti.

Tutte le analisi statistiche sono state fatte utilizzando il *software* SAS (2008; 9.2).

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. CHALLENGE TEST:

4.1.1. Challenge test sui batteri

A seguito delle analisi statistiche sopra descritte applicate ai dati ottenuti, si è proceduto al confronto delle differenze tra i diversi trattamenti ed il controllo sia riguardo all'abbattimento logaritmico delle varie specie, sia a livello della qualità sensoriale. I risultati dell'effetto degli ultrasuoni sui vari microorganismi considerati sono riportati nelle figure seguenti:

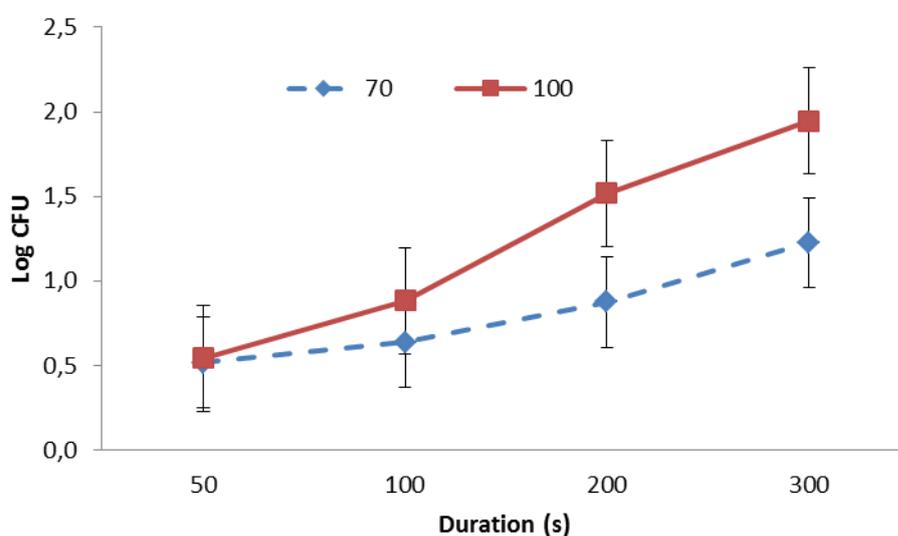


Figura 1. Effetto dell' ampiezza ($P=0.240$) e della durata ($P=0.057$) nella differenza (Log CFU) tra il controllo e il trattato per *E. coli*.

Dal grafico possiamo notare come l'effetto dell'ampiezza (A) sull' abbattimento logaritmico di *E.coli* non sia significativo in quanto il *p-value* risulta maggiore di 0.1. Per quanto riguarda la durata, invece, si può affermare che abbia un'influenza significativa sull' abbattimento logaritmico del microorganismo, infatti, possiamo notare come per entrambi i trattamenti già dopo i 100 secondi ci sia una diminuzione di circa mezzo logaritmo. In particolare, per il trattamento più intenso (100%) a 300s l'abbattimento risulta di ben 2 logaritmi mentre per quello più leggero (70%) è leggermente minore ma si aggira comunque attorno ad 1 logaritmo. *Inoltre*, Tutte le interazioni tra gli effetti fissi (ampiezza, durata e tempo di deterioramento) mostrano un *P-value* maggiore di 0.300 ciò dimostra che le interazioni non sono significative nell'influenzare l'abbattimento microbico.

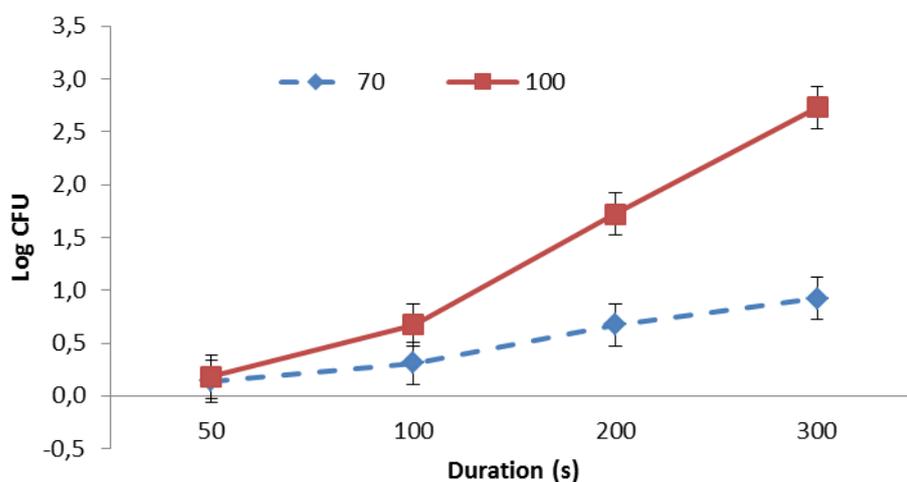


Figura 2. Effetto dell' ampiezza ($P = 0.111$) e della durata ($P = 0.011$) e la loro interazione ($P = 0.066$) nella differenza (Log CFU) tra il controllo e il trattato per *P. fluorescens*.

In questo caso si può notare una differenza significativa tra il latte trattato e il controllo per *P. fluorescens* dato sia dalla durata del trattamento che dall'interazione tra la durata e l'ampiezza dello stesso. Infatti si può notare come già il trattamento a 200s provochi un abbattimento logaritmico >0.5 per il trattamento a 70% e di quasi due logaritmi per il trattamento più intenso (100%). A 300s *Pseudomonas* cala di ben 3 logaritmi dopo 100% per 300s mentre rimane attorno ad 1 logaritmo per il trattamento meno intenso 70% per 300s.

Le interazioni tra gli effetti fissi mostrano un *P-value* maggiore di 0.500 quindi anche in questo caso non sono significative per quanto riguarda l'efficacia di abbattimento.

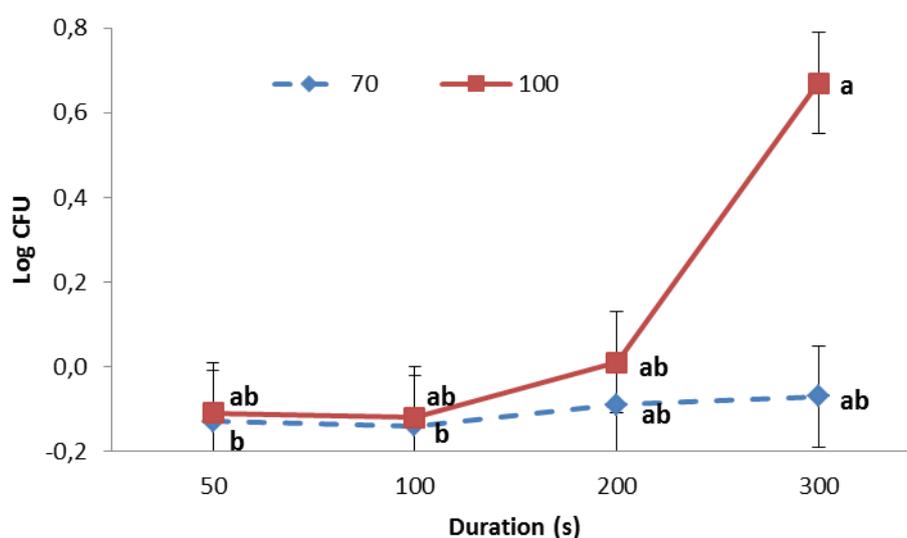


Figura 3 Effetto dell' ampiezza ($P = 0.056$) e della durata ($P = 0.016$) e la loro interazione ($P = 0.144$) nella differenza (Log CFU) tra il controllo e il trattato per *S. aureus*

Per quanto riguarda *S. aureus*, (Figura 3), si nota una differenza significativa tra i trattamenti 70% x 50s e 70% x 100s e il trattamento 100% x 300s (evidenziata dalle lettere diverse ^{a, b}: P<0.05 in accordo con il PDIFF secondo Bonferroni) dove il trattamento più intenso sembra provocare un abbattimento di circa 0.7 logaritmi, mentre trattamenti più blandi sembrano addirittura portare ad un aumento delle CFU rispetto al controllo. Tale effetto è probabilmente dovuto al fatto che *S. aureus* in determinate condizioni forma aggregati e che i trattamenti US blandi li rompano senza danneggiare il microorganismo ma rendendo i nutrienti più disponibili alle singole cellule incrementandone, quindi, la crescita, come riscontrato da Gao et al. (2014) per *Enterobacter aerogenes*.

Questo sottolinea la significativa differenza sulla diminuzione di *S. aureus* segnata dalla durata, dall'ampiezza e dalla loro interazione, sebbene i trattamenti non incidano in modo efficace sulla inibizione microbica di questo batterio.

Le altre interazioni tra gli effetti fissi (ampiezza, durata e tempo di deterioramento) mostrano un *P-value* maggiore di 0.150, questo potrebbe indicare la loro influenza significativa sebbene non così incisiva sull'abbattimento logaritmico.

4.1.2. Challenge test su *Debaryomyces*

Il metodo di analisi statistica di *Debaryomyces hansenii*, come sottolineato nei paragrafi precedenti, differisce da quelli utilizzati per i batteri sopra descritti in quanto i dati relativi ad esso non erano normalmente distribuiti (*W-value* <0.90). Per questo motivo è stato applicato il metodo non parametrico di *Kruskal-Wallis* (PROC NPAR1WAY) che, per valutare le differenze tra i trattamenti, utilizza come criterio di comparazione la mediana dei dati ottenuti.

Tabella 1. media, mediana e range di differenza (Log CFU) tra le ampiezze (70% e 100%) tra il controllo e latte trattato con US in base all' ampiezza (n = 12) per *Debaryomyces hansenii*

	Media	Mediana	Range	P
tempo, 0 h				
70	0.25	0.20	-0.05 - 0.82	
100	2.09	1.90	0.18 - 4.61	0.092
tempo, 48 h				
70	0.34	0.13	-0.06 - 1.76	
100	1.93	1.44	0.04 - 5.57	0.115

In accordo con il test non parametrico di *Kruskal-Wallis*, la differenza tra le due ampiezze (70% e 100%) è: $P = 0.092$ ($\chi^2 = 2.84$) al tempo 0 h e $P = 0.115$ ($\chi^2 = 2.48$) dopo 48 ore. Questo evidenzia come al tempo zero ci sia un'influenza significativa data dall'intensità di trattamento in quanto la mediana dell'abbattimento logaritmico del trattamento più intenso (100%) ha un valore maggiore rispetto a quella del trattamento più blando (70%). Dopo le 48 ore, invece, tale differenza non sembra essere più significativa in quanto il *range* tra le varie ripetizioni risulta molto elevato.

Il test non parametrico di *Kruskal-Wallis* mostra un P -value= 0.386 ($\chi^2 = 0.75$) per l'effetto del tempo (0 vs. 48 h) che sta ad indicare come questo non sia significativo.

Tabella 2. Media, mediana and range di differenza (Log CFU) tra le durate (50s, 100s, 200s e 300s) tra il controllo e il latte trattato con US in base alla durata ($n = 6$) per *Debaryomyces hansenii*:

	Mean	Median	Range	P
Time, 0 h				
50	0.13	0.18 ^b	-0.05 - 0.19	
100	0.29	0.18 ^b	0.03 - 0.77	
200	2.17	1.93 ^a	0.21 - 4.61	
300	2.10	1.79 ^a	0.22 - 4.61	0.024
Time, 48 h				
50	0.08	0.08	-0.06 - 0.21	
100	0.20	0.14	0.01 - 0.53	
200	2.02	2.23	0.05 - 3.57	
300	2.24	1.72	-0.05 - 5.57	0.231

In accordo con il test non parametrico di *Kruskal-Wallis* la differenza tra le durate P -value = 0.024 ($\chi^2 = 9.39$) al tempo 0 h risulta essere significativa, ovvero all'aumentare del tempo di sonicazione, l'abbattimento di *D. hansenii* sembra aumentare. Dopo 48 ore il P -value = 0.231 ($\chi^2 = 4.30$) questo sta ad indicare che la durata del trattamento perde il suo effetto significativo.

L'andamento dei dati al tempo zero sottolinea la presenza di un gap evidenziato dalle lettere ^a, ^b. I valori delle colonne differiscono significativamente in quanto P -value < 0.05 e questo sta ad indicare come tra i 50s e i 100s i valori non differiscono in modo significativo mentre il passaggio tra i 100s e i 200s evidenzia un abbattimento

logaritmico significativo di più di dieci unità. Anche a seguito dei 200s, i valori sembrano non differire significativamente. Questo potrebbe rilevare l'efficacia del trattamento per *D. hansenii* solo a seguito di durate uguali a 200s e non risulta necessario prolungare la durata ulteriormente in quanto non sembra aumentare la capacità di abbattimento logaritmico di *D. hansenii*, almeno fino ai 300 s.

Debaryomyces hansenii è un lievito comune presente in diversi substrati naturali e in vari tipi di formaggi (Barnett et al., 2000, Quiros et al., 2006). La sua prevalenza nel settore lattiero caseario (Deak e Beuchat, 1996) può essere garantita dalla sua capacità di resistere a basse temperature e ad elevate concentrazioni di soluti possono crescere in terreni contenenti fino a 4% di NaCl a differenza di *S. cerevisiae* che è inibito a 1.7 % (Onishi, 1963). Recentemente è stato, però, descritto nelle patologie umane come responsabile delle infezioni sanguigne, e raramente di altre infezioni (Carrega et al., 1997; Krcmery and Kunova, 2000; Prinsloo et al., 2003, Quindos et al., 1994). In altri casi è stato definito responsabile della malattia associata alla candida (Gupta et al., 2006, St-Germain, and Laverdiere. 1986., Wagner et al., 2005). Tuttavia nella maggior parte dei casi riportati l'identificazione è stata fatta basandosi su metodi fenotipici e, specialmente per quanto riguarda l'associazione della responsabilità di *D. hansenii* nel provocare la candidosi è stata associata alla difficoltà di distinguerlo fenotipicamente dalla *Pichia guilliermondii* (Nishikawa et al, 1997, Nishikawa et al, 1996) così si verificano frequenti errori di identificazione.

L'analisi svolta da Desnos-Olliver (2008) su tutti gli isolati di *D. hansenii* o *P. guilliermondii*. ha voluto identificare la differenza tra le due specie senza basarsi su un'analisi fenotipica ma sulla base dello studio delle sequenze nucleotidiche e i risultati hanno rivelato come il 58% degli isolati come *D. hansenii* erano stati classificati erroneamente e appartenevano a ben sei specie diverse (*D. hansenii*, *P. guilliermondii*, *P. caribbica*, *C. palmioleophila*, *C. haemulonii* type II, and *C. lusitaniae*).

Gli stessi studi hanno affermato che *D. hansenii* non sembra essere la causa di Candida e rappresenta una specie frequentemente presente nella microflora intestinale in persone che amano i formaggi.

D. hansenii è inoltre considerato un lievito di notevole interesse tecnologico (Baronian, 2004, Ratledge and Tan, 1990) in quanto è possibile sfruttare la loro osmotolleranza per alcune applicazioni tecnologiche perché permette una produzione quasi sterile ed elevate quantità di reagente disponibile, condizioni che consentirebbero di ridurre i costi di produzione soprattutto nel settore agroalimentare (Breuer and Harms, 2006). Un altro vantaggio da considerare per l'utilizzo di *D. hansenii* nella produzione tecnologica di formaggio è data dalla sua caratteristica di essere uno dei lieviti oleosi ovvero quei lieviti con capacità di accumulo dei lipidi fino al 70% della loro massa secca (Ratledge and Tan, 1990) che poi metabolizzano e ossidano liberando composti volatili (Cameron et al., 2009). Arfi et al. (2002) ha rilevato che tali lieviti sintetizzano acidi volatili, composti di sapore alcolico e odore di formaggio e di composti carbonilici e che possono sintetizzare S-metiltioacetato, il composto volatile

dello zolfo predominante nel formaggio, e in misura minore metionale, che si trova per esempio in *Cheddar e Camembert*. Esso contribuisce in tal modo allo sviluppo di un forte sapore *Cheddar* (Ferreira and Viljoen, 2003) che probabilmente deriva dalla decarbossilazione enzimatica dell'acido 4-metiltio-2-ossidobutirrico. La capacità di *D. hansenii* di influenzare le proprietà sensoriali dei formaggi è già stata sfruttata utilizzandolo come cultura starter (Seiler and Busse, 1990). Van den Tempel e Jacobsen (2000) hanno indagato il contenuto di enzimi di vari ceppi di *D. hansenii* e hanno trovato una peptidasi con attività sui peptidi β -caseina-derivati, che si presume abbia un'influenza molto significativa nella proteolisi nel formaggio. Kumura et al. (2002) hanno inoltre illustrato la capacità di *D. hansenii* isolato dal formaggio di metabolizzare la caseina (sia α che β - caseina). Tramite il suo metabolismo è, inoltre, in grado di modificare il microambiente nel formaggio a vantaggio di alcuni batteri desiderati, *Penicillium roqueforti* e proteggere il formaggio contro le fermentazioni indesiderate come quelle provocate da *Clostridium butyricum* e *C. tyrobutyricum*, in quanto compete per i nutrienti e produce metaboliti antimicrobici, sia extra che intracellulari (Deiana et al., 1984; Fatichenti et al., 1983; Van den Tempel and Jacobsen, 2000). Welthagen e Viljoen (1998) insieme a Laubscher e Viljoen (1999) hanno suggerito che la capacità di *D. hansenii* di moltiplicarsi nel formaggio, insieme alla sua capacità di assimilare lattato, citrato, lattosio e galattosio fanno sì che si possa pensare a questo organismo come possibile componente di colture starter per la produzione di formaggio. Inoltre anche le sue capacità di utilizzare acetato come unica fonte di carbonio, di assimilare (ma non fermentare) lattosio e di fermentare ed assimilare il glucosio in misura limitata (Fatichenti et al., 1983) sono molto importanti per la produzione di formaggio.

Durante la crescita nel latte, *D. hansenii* produce solo piccole quantità di acidi grassi liberi e di aminoacidi liberi (prevalentemente acido glutammico, glicina, arginina, prolina e alanina (Roosita and Fleet, 1996), metabolizza piccole quantità di acido succinico e produce piccole quantità di etanolo (< 5 g/l) e acido lattico durante la maturazione di formaggio danese. In diversi tipi di formaggi stagionati, come ad esempio il *Limburger*, il *Tilsiter*, il *Port Salut* e il *Danbo danese*, lo sviluppo di un appropriata flora batterica superficiale composta da batteri lattici e aerobi ha dimostrato di essere influenzata dal metabolismo degli acidi lattici da parte dei lieviti, in particolare *D. hansenii*. Questo ha permesso di ipotizzare che *D. hansenii* potrebbe fornire importanti fattori di crescita per i microorganismi come vitamine ed amminoacidi insieme ai componenti aromatici e lipolitici e enzimi proteolitici che contribuiscono al processo di maturazione quindi è importante che durante il trattamento con gli US non sia inibito ma rimanga vivo e vitale per favorire la caseificazione e competere con i microorganismi indesiderati e ciò è garantito utilizzando un trattamento che preveda una durata inferiore ai 200s.

4.1.3. Challenge test su *Cl. Sporogenes*

Dai risultati ottenuti a seguito dei trattamenti con US del latte crudo e del latte UHT abbiamo scelto di riportare solamente i dati relativi al latte UHT in quanto, per questa tipologia, le analisi sono state svolte in doppio e la caratteristica del latte (praticamente sterile) ha permesso di ottenere risultati più precisi. La scelta di trattare l'inoculo termicamente prima di contaminare il latte è stata presa per assicurare che nel campione fossero effettivamente presenti solo spore e non forme vegetative.

Per quanto riguarda il trattamento con ultrasuoni del latte UHT inoculato con *Cl. sporogenes* sono emersi i seguenti risultati:

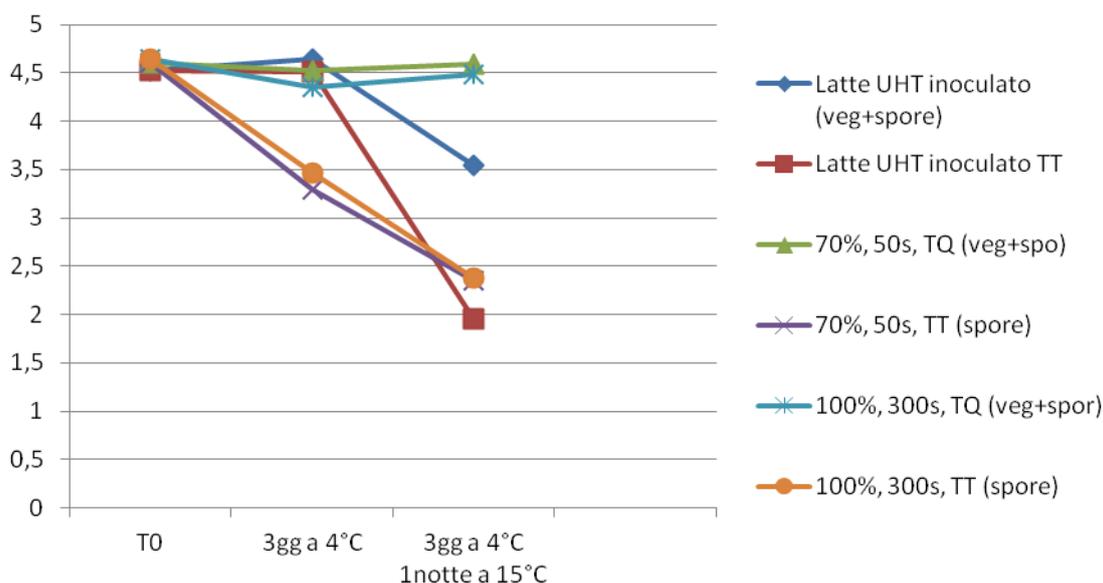


Figura 4: confronto tra le due ampiezze A (70% e 100%) sull'abbattimento logaritmico delle diverse tipologie di campione al t0, dopo tre giorni a 4°C e dopo 1 notte a 15°C. La linea blu e quella rossa individuano i due controlli ovvero il campione 4a (latte UHT tal quale) e 4b (latte UHT trattato termicamente).

Il grafico riporta le conte batteriche stando al seguente ragionamento:

- Per t₀ si intende la conta a seguito dei tre giorni a 37°C
- Per t 3gg a 4°C si intende la conta delle piastre preparate in t₀ e contate dopo 48 ore a 37°C (in questo modo l'effetto che si vuole misurare è l'abbattimento microbico dopo 3 giorni a 4°C e il trattamento con US su TT e TQ per entrambe le combinazioni (70% 50s e 100% 300s)
- Per t 3gg a 4°C e una notte a 15°C si intende invece la conta dei campioni trattati a seguito di una notte a 15°C e successivo trattamento con US su TT e TQ per entrambe le combinazioni (70% 50s e 100% 300s) dopo incubazione a 37°C per 48 ore.

La carica iniziale di *Cl. sporogenes* (10⁷CFU/ml) inoculata in 500ml (diluizione che porta ad una carica finale di circa 10⁴-10⁵CFU/ml ovvero 4 logaritmi). Questo evidenzia come a t₀ la carica sia rimasta invariata a seguito del trattamento. Si presume che ciò

possa essere dovuto dal fatto che le spore danneggiate siano state compensate dalle forme vegetative che sotto l'effetto degli ultrasuoni abbiano prodotto altre spore. Questa affermazione può essere considerata anche nella seconda parte dell'esperimento dove si nota come la concentrazione per il latte TQ sonicato ad entrambe le intensità e durate rimanga la stessa e in questo caso si può presumere anche che, a seguito dell'incubazione a 4°C, le spore e le forme vegetative siano rimaste quiescenti senza quindi diminuire o crescere. Osservando i dati relativi ai campioni TT si nota, invece, una diminuzione fino a 3.5 logaritmi per entrambe le intensità di trattamento (100% e 70%). I risultati relativi al conteggio a seguito di 3 giorni a 4°C ed una notte a 15°C non verranno considerati in quanto i dati indicano dei valori anomali che entrano in contrasto.

Stando a questi risultati si potrebbe affermare che la sonicazione potrebbe essere efficace in latti contaminati solamente da spore in quanto le forme vegetative, a seguito del trattamento, si presume, non completamente efficace a provocarne la morte cellulare, entrano in fase di sporulazione generando nuove spore. A supporto di questa affermazione Sanz et al., (1985) afferma che l'abilità di certe specie di microrganismi di produrre spore provvede a garantire una maggior protezione rispetto alle forme vegetative e le spore formate, che sono resistenti al calore, sono similmente resistenti agli ultrasuoni quindi sono necessarie intensità e durate di trattamento maggiori. Un'altra teoria afferma che l'iniziale inefficacia del trattamento potrebbe essere dovuta al fatto che a bassa potenza le onde di US sono in grado di rompere o disperdere il gruppo di batteri ma non sono abbastanza forte per danneggiare le cellule del *Clostridium*. Precedenti studi (Koda et al., 2003; Joice et al., 2011) hanno scoperto che il trattamento ad alte frequenze e bassa potenza di US ha un effetto di disgregazione sui gruppi di batteri e molecole che sembrerebbe aumentare la disponibilità di nutrienti per i microrganismi causando un aumento del loro numero, come da noi rilevato per *S. aureus*. Inoltre è stato segnalato che gli il trattamento a bassa intensità migliora il metabolismo microbico e stimola le attività fisiologiche.

Un'alternativa al trattamento US con elevate intensità, che causerebbero una perdita delle caratteristiche organolettiche rilevante, sarebbe quella di applicarli con intensità minori ma a seguito della pastorizzazione e questo potrebbe risultare un metodo efficace per eliminare le spore senza la necessità di utilizzare trattamenti ad elevate temperature per un tempo eccessivo, come la sterilizzazione o l'UHT, che incidono fortemente sulle caratteristiche organolettiche del prodotto. Inoltre, i dati rivelati dal grafico evidenziano come il trattamento più leggero (70% per 50s) incida sull'abbattimento logaritmico allo stesso modo di quello più intenso (100% per 50s), questo contribuirebbe a far preferire il trattamento ad US agli altri metodi sopra descritti sia perché modificherebbe le caratteristiche organolettiche in modo meno percepibile sia perché non è possibile utilizzare un latte UHT o sterilizzato per la caseificazione in quanto i trattamenti rendono impossibile la coagulazione del latte a causa dell'eccessiva denaturazione delle proteine e della mancanza di flora microbica necessaria.

A supporto della capacità da parte della sonicazione di migliorare la caseificazione si è verificato che, per entrambe le intensità è stato possibile osservare la coagulazione del latte a formaggio anche se con elevata acidità al gusto. L'aumento dell'acidità (SH),

più evidente nel trattamento più intenso, è probabilmente correlato alla idrolisi dei trigliceridi e il conseguente aumento dei livelli di acidi grassi liberi nel latte (Walstra et al., 2006), mentre l'effetto di cavitazione, con la conseguente liberazione di energia meccanica, potrebbe provocare la rottura della membrana dei globuli di grasso e ciò indurrebbe alla coagulazione. Meyer et al.,(2006) affermano che questo fenomeno provocherebbe la formazione di nuovi globuli di grasso con la superficie coperta dalla porzione idrofoba delle particelle di caseina. Questi globuli sono di dimensioni minori e quindi riducono sia il tempo di coagulazione del caglio, sia la consistenza del coagulo (Bermúdez - Aguirre et al., 2008) e tendono a formare raggruppamenti anche con le proteine del siero producendo in questo modo una struttura ideale per la produzione di formaggio. I cambiamenti della dimensione e della composizione dei globuli di grasso permetterebbero quindi di migliorarne la resa.

La garanzia di eliminare le spore di *Cl. sporogenes* contribuirebbe inoltre a diminuire i rischi di gonfiore tardivo nei formaggi di cui il microorganismo è responsabile (Le Bourhis, 2007). La possibile combinazione del trattamento ad ultrasuoni con processi termici e a pressione controllata contribuirebbe ad un miglior abbattimento delle spore e permettendo una migliore qualità del prodotto con l'aumento del gusto, della consistenza e dell'aspetto oltre che alla minor richiesta di energia e conseguente calo dei costi di produzione (Earnshaw et al.,1995; Piyasena et al., 2003; Ordonez et al., 1984; McClements, 1995; Arroyo et al., 2011).

4.2. ANALISI SENSORIALE

Durante l'analisi sensoriale erano sufficienti 19 risposte corrette per affermare l'esistenza, con una probabilità del 95%, di una differenza percepibile tra i campioni trattati ed il controllo di riferimento(RIF). Il risultato del test duo-trio ha rivelato la capacità dei valutatori di discriminare per il 99% il latte trattato dal controllo (Marchesini et al., 2012) nel nostro caso solo per la A (100% 50s), mentre per le altre combinazioni il riconoscimento è stato addirittura del 99,9%. Sono state, quindi, raccolte le informazioni relative alle caratteristiche olfattive e gustative solo dei giudici che hanno dimostrato la capacità di riconoscere il campione uguale al controllo. I giudici hanno percepito in tutti i campioni trattati l'odore di cotto e/o bruciato che si faceva più marcato con l'aumentare dell'intensità (ampiezza e durata) del trattamento subito.

I risultati hanno mostrato come, per il latte trattato per 200s con intensità del 70%, poco più del 35% dei valutatori abbia percepito sapore di gomma e di bruciato mentre il 20% abbia affermato di il sapore di vecchio e di cartone. Per il trattamento con ampiezza 100% e durata 200s più del 50% ha percepito l'odore di bruciato e quasi il 40% hanno percepito l'odore di gomma, di bollito e pungente. Tali indicazioni segnalano una differenza significativa tra le due ampiezze soprattutto per tempi uguali o superiori a 200s.

Questi risultati indicano che è necessario trattare il prodotto per durate inferiori a 200s per minimizzare il sapore di bruciato causa di rifiuto sensoriale del latte sonicato

e confermano quanto dichiarato da *Chouliara et al.* (2010) che affermano che per permettere l'accettazione del latte trattato dal punto di vista della percezione sensoriale, sono necessari trattamenti non maggiori a due minuti (Marchesini et al., 2012).

Dall'analisi di Engin and Yuceer (2012) sono stati studiati gli acidi grassi volatili liberati a seguito del trattamento ed è emerso che il butirrico, il pentanoico e l'esanoico sono risultati più alti nel latte trattato rispetto ad altri campioni di latte. Da questo si può ricavare che la nota acida/pungente percepita, a seguito del trattamento 100% per 300s applicato alle spore, anche dai valutatori che hanno eseguito il panel test sui campioni contaminati e sonicati, deriva soprattutto dall'acido butirrico e da quello esanoico. Engin and Yuceer (2012) affermano, inoltre, che le intensità più elevate di questi acidi grassi nel latte US potrebbero essere correlate ad effetti di cavitazione e danni sulla membrana dei globuli di grasso causati dall'applicazione degli US. Tuttavia Riener et al., (2009) ha individuato altri acidi grassi quali benzene, toluene, 1,3 butadiene e alifatici nel latte trattato ad elevate intensità di US, queste differenze potrebbero derivare dai diversi metodi di estrazione utilizzati.

4.3. ANALISI DEI DIVERSI ABBATTIMENTI LOGARITMICI

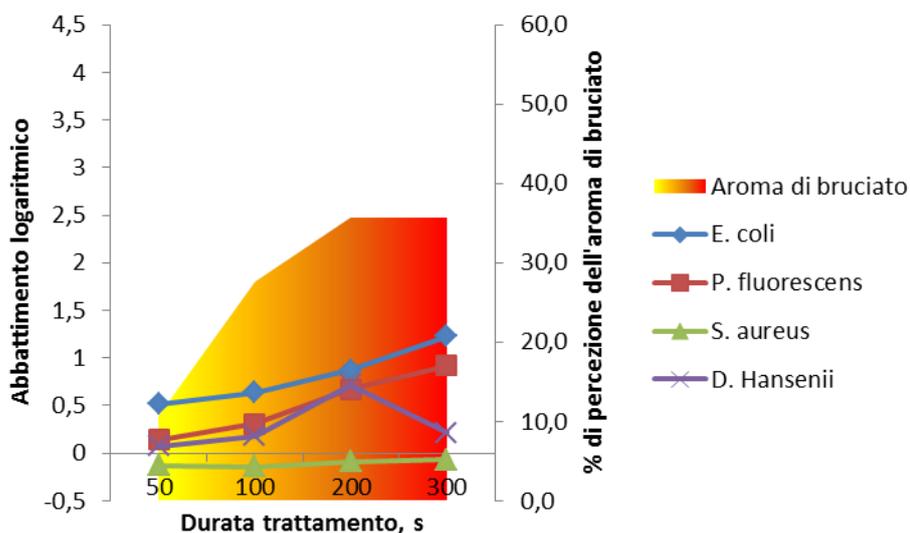


Fig 5: abbattimento logaritmico e % di bruciato percepita dai valutatori a seguito del trattamento 70% per varie durate (50s, 100s, 200s, 300s).

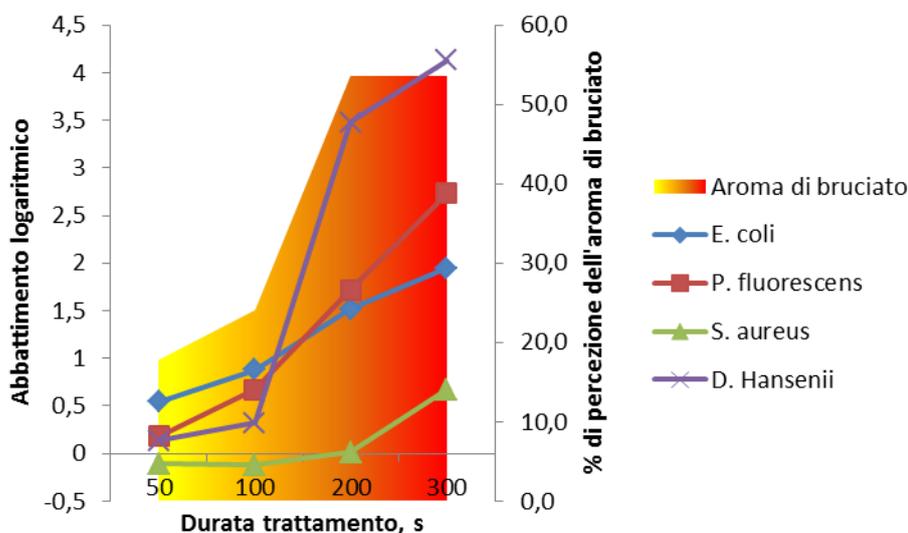


Fig. 6: abbattimento logaritmico e % di bruciato percepita dai valutatori a seguito del trattamento 100% per varie durate (50s, 100s, 200s, 300s).

I grafici sopra indicati consentono di avere una visione globale sull'effetto dell'abbattimento logaritmico per i diversi microorganismi trattati, e riportano anche la percentuale di valutatori che, durante il *Panel test*, ha percepito il gusto di bruciato nei campioni trattati con la durata maggiore (200s).

Nota: a seguito dei risultati ottenuti dopo un tempo di trattamento di 200s è stato stimato che per sonicazioni per durate maggiori avremmo ottenuto risultati almeno uguali o superiori quindi non abbiamo approfondito.

Confrontando l'andamento della percentuale di valutatori che hanno percepito l'aroma di bruciato a seguito del panel test tra le due ampiezze e le relative combinazioni di durata è possibile affermare la significativa differenza tra la percentuale di percezione tra le due ampiezze, infatti a seguito del trattamento più intenso (100%) già dopo i 200s più del 50% dei valutatori ha avvertito l'aroma di bruciato nel campione trattato, mentre per il trattamento 70% è stato individuato da poco più del 35%. La differenza tra le ampiezze (A) per la durata 100%, invece, non sembra essere significativa (per entrambi inferiore al 30%), mentre dopo i 50s la differenza tra le due ampiezze (70% e 100%) è del 10%.

Per quanto riguarda l'abbattimento logaritmico nel complesso è evidentemente come il trattamento meno intenso (70%) risulti meno efficace rispetto a quello del trattamento più intenso (100%) per tutte le tipologie di durata (50s, 100s, 200s, 300s). Infatti, prendendo in considerazione il primo grafico riguardante il trattamento meno intenso (70%), possiamo affermare che:

- Il microorganismo più sensibile risulta essere *E. coli* con un abbattimento alla massima durata (300s) che arriva a poco più di 1 di un logaritmo. Questi dati coincidono con quelli riportati da Engin and Yuceer (2012) Per questo microorganismo in particolare la differenza di durata del trattamento risulta essere significativa, infatti è possibile notare un aumento quasi costante dell'abbattimento logaritmico del batterio.

- Anche *Pseudomonas* sembra comportarsi allo stesso modo di *E. coli* in quanto all' aumentare della durata del trattamento subisce un calo sempre maggiore fino ad arrivare a circa 1 Log a 300s.

- Per quanto riguarda *D. hansenii* notiamo un iniziale inefficacia del trattamento che sembra mantenere i valori più o meno stabili tra i 50s e i 100s mentre il a 200s segna un aumento quasi fino ad 1 Log ma che a seguito dei 200s sembra ritornare ai valori iniziali e quindi sembra non essere più efficace.

Il trattamento 70% risulta inoltre inefficace per lo *S. aureus* che rimane sotto la soglia dell'abbattimento per ogni durata applicata, sembra addirittura che ci sia un aumento delle CFU rispetto al controllo. Tale effetto è probabilmente dovuto al fatto che *S. aureus* in determinate condizioni forma aggregati e che i trattamenti US blandi li rompano senza danneggiare il microorganismo rendendo i nutrienti più disponibili alle singole cellule incrementandone, quindi, la crescita, come riscontrato da Gao et al. (2014) per *Enterobacter aerogenes*.

Considerando, invece, il trattamento più intenso (100%) notiamo le seguenti differenze:

- Il microorganismo più sensibile al trattamento per durate maggiori a 100s risulta essere il *D. hansenii* che tra i 200s e i 100s subisce un abbattimento logaritmico che passa da circa 0.4 a 3.5 per poi aumentare, sebbene non in modo significativo, di altri 0.5 Log a seguito del trattamento 200s.

- Tra gli altri batteri, *E. coli* e *P. fluorescens* subiscono un calo compreso tra 0.5 e 1 Log dopo i 100s che tende ad aumentare a 2 Log per il primo e fino a 3 Log per la seconda. Questo evidenzia come la differenza dell'abbattimento tra le due ampiezze (A) per questi due microorganismi sia significativa per *P. fluorescens*, evidenziata dall'efficacia maggiore data dall' ampiezza (100%); mentre per *E. coli* la differenza tra le due ampiezze non risulta essere significativa in quanto il calo logaritmico varia di circa 0.5 Log.

- Anche in questo caso lo *S. aureus* fino a durate di 200s sembra addirittura aumentare ma, a differenza del trattamento meno intenso (70%), a 300s si nota un abbattimento logaritmico di quasi 1 Log questo indica la significativa differenza tra le ampiezze di e la durata di trattamento e, soprattutto dalla loro interazione sebbene anche nel caso di intensità maggiore l'efficacia antimicrobica non sia così rilevante. La crescita iniziale può essere anche in questo caso associata alla dispersione delle molecole e del microorganismo nel latte.

Il diverso comportamento dei microorganismi in risposta al trattamento US è stato studiato già a partire dal 1960 (Earnshaw et al., 1995). Ci sono numerose teorie disponibili sul meccanismo degli effetti biocidi degli ultrasuoni (Gao et al., 2014). E, sulla base delle informazioni disponibili in letteratura, è ovvio che vi sono opinioni contrastanti e diverse speculazioni sul meccanismo di inattivazione dei patogeni ultrasuoni per quanto riguarda le loro proprietà. Alcuni affermano che l'effetto battericida degli ultrasuoni è associabile all'effetto della cavitazione dato dalla formazione e il successivo scoppio di bolle che, all'interno del mezzo può esplicarsi in due diversi modi a seconda dell'intensità della propagazione dell'onda ultrasonica. Nel caso di un ciclo con molte oscillazioni, l'effetto provocato è la formazione di piccole

bolle di gas che a seguito del passaggio degli ultrasuoni nel liquido iniziano a oscillare e a vibrare creando microcorrenti generando una forza di sfregamento che causa un effetto di taglio sulle membrane delle molecole presenti oltre che la liberazione di radicali liberi e di prodotti molecolari altamente reattivi con relativo danno ai microorganismi (Villamiel e de Jong, 2000; Butz and Tauscher, 2002; Russell, 2002). L'effetto associato ad un ciclo con minori oscillazioni si distingue perché le bolle, essendo di maggiori dimensioni, tendono a collassare liberando momentaneamente elevate pressioni e temperature che bombardano localmente la membrana cellulare a tal punto da danneggiare la parete (Scherba et al., 1991). Queste elevate temperatura e pressioni localizzate bombardano la membrana cellulare a tal punto da danneggiarla e addirittura rimuovere particelle dalle superfici (Earnshaw R.G., 1995). Inoltre parte dell'energia può essere assorbita per il riscaldamento del mezzo (Floros & Liang, 1994) ma la liberazione di energia è temporanea e solo il liquido nei pressi del fenomeno vi è coinvolto; pertanto solo un piccolo quantitativo di cellule vi è interessato. L'effetto della pressione dello scoppio delle bolle, inoltre, produce la distruzione della struttura della membrana cellulare a seguito della rottura della parete (Earnshaw R.G., 1995) ma anche in questo caso l'effetto di taglio risulta inversamente proporzionale alla distanza tra il collasso della cavitazione e la membrana plasmatica (Maisonhaute et al., 2002).

Tuttavia, sebbene l'inattivazione di batteri conferita da trattamenti ad US ad alta potenza sia ben noto e ampiamente studiato, il rapporto tra l'efficacia degli ultrasuoni nel disattivare i batteri e la loro azione sulle proprietà fisico-chimiche non è ancora ben compreso. Per esempio, alcuni studi hanno dimostrato che i batteri gram-negativi erano più sensibili all'inattivazione ultrasonica dei gram-positivi (Monsen et al., 2009), mentre altri ricercatori non riscontrato alcuna differenza significativa (Scherba et al., 1991; Cameron, 2007). È stato segnalato che le cellule più grandi sono più suscettibili agli ultrasuoni di quelle piccole e batteri a forma di bastoncino erano più sensibili di cellule a forma coccosa (Alliger, 1975), ed anche in questo caso alcuni studi hanno confermato il contrario (Cameron, 2007). Gao et al., (2014) hanno sonicato con una frequenza di 20KHz *E. aerogenes*, un batterio gram-negativo a forma di bastoncino, *B. subtilis*, un batterio gram-positivo a forma di bastoncino e *S. epidermidis*, un cocco gram-positivo in diverse fasi della loro crescita per verificare queste affermazioni. Oltre a notare che la fase di crescita influenza notevolmente l'efficacia del trattamento US, infatti in fase esponenziale i microorganismi risultavano più sensibili, hanno evidenziato che *E. aerogenes*, a seguito della sonicazione, è passato da una forma bastoncino nella fase stazionaria ad una coccosa in quella esponenziale; questo dato potrebbe confermare la teoria della maggior resistenza delle forme cocciche. Tutti e tre i microorganismi hanno comunque subito una deformazione della parete con conseguente distruzione dell'integrità della struttura e fuoriuscita del materiale intracellulare. Da questo studio è emerso che la struttura responsabile della maggior resistenza da parte di alcuni batteri sembra essere la parete cellulare, infatti i gram-positivi hanno una parete cellulare più spessa di quelli gram-negativi (Drakopoulou, 2009; Gao et al., 2014). La parete cellulare quindi contribuirebbe a fungere da barriera smorzatrice dell'effetto di cavitazione grazie alla sua fluidità.

Una possibile spiegazione della resistenza dei batteri al trattamento tramite US è legata alla rigidità relativa al modulo di Young, che può essere misurata con il microscopio a forza atomica. Lo studio ha evidenziato che *S. aureus*, che ha uno dei più bassi valori di modulo di Young, è molto più resistente agli ultrasuoni rispetto all'*E. coli*,

noto per essere facilmente inattivato tramite il trattamento ad US avendo un valore di *Young* molto elevato.

Numerosi studi hanno, inoltre, evidenziato una differente efficacia del trattamento con ultrasuoni tra l'applicazione nei cibi e quella nel brodo microbiologico (Lee et al., 1989). Per esempio, i cibi ad elevato contenuto di grassi riducono l'effetto battericida degli ultrasuoni e questa differenza sembra derivare dagli effetti intrinseci dell'azione degli US o dalla differente penetrazione e propagazione dell'energia degli stessi (Earnshaw R.G.,1995).

Il Comitato Consultivo Nazionale sui criteri microbiologici per i prodotti alimentari (2006) ha concluso che l'effetto del trattamento US è risultato limitato per quanto concerne alla pastorizzazione dei cibi. L'efficienza degli US dipende dal tipo di microorganismo sottoposto al trattamento, i vari studi hanno evidenziato che le spore sono relativamente resistenti all'effetto e questo comporterebbe alla necessità di utilizzare trattamenti di maggior intensità e durata termici per rendere il prodotto sicuro che si ripercuoterebbe, però, sulle caratteristiche organolettiche mentre per gli altri microorganismi i pareri sull'efficacia sono tutt'ora discordanti. Se gli ultrasuoni fossero utilizzati in qualsiasi applicazione pratica, quindi, dovrebbero essere utilizzati in combinazione con trattamenti termici, a pressioni controllate od altri (Piyasena et al., 2003), in quanto risultano molto più efficaci del trattamento individuale degli stessi (Ordonez et al., 1984; McClements, 1995; Arroyo et al., 2011).

5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti a seguito di questi studi hanno confermato che l'applicazione di Ultrasuoni ad elevate intensità è un'alternativa promettente ai metodi di sanitizzazione fin ora utilizzati. La sonicazione infatti si è rivelata utile nell'abbattimento dei diversi microorganismi testati, anche se diminuzioni significative per il trattamento ad ampiezza minore (70%) si sono verificati solo per lunghe durate. A questa intensità, però, gli US sembrano non essere risultati efficaci per l'abbattimento di *S. aureus*. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che il microorganismo, essendo gram-positivo sia più resistente grazie al maggiore spessore della sua parete cellulare. Per quanto riguarda il trattamento con ampiezza maggiore (100%) l'abbattimento è risultato significativo già a seguito dei 100s per *E. coli*, *P. fluorescens*, mentre solo successivamente ai 200s per *S. aureus* e *D. Hansenii*. Per quanto riguarda *D. hansenii*, viste le proprietà positive del lievito a proposito della caseificazione, sarebbe necessario utilizzare un trattamento al di sotto dei 200s per evitare la sua inibizione. La sonicazione del latte contaminato con *Cl. sporogenes* ha rivelato come in assenza di trattamento termico per entrambe le combinazioni 70% x 50s e 100% x 300s non vi sia alcun effetto significativo in quanto sembrerebbe che le spore danneggiate vengano compensate dalle forme vegetative che sotto l'effetto degli ultrasuoni producono altre spore. L'associazione con il trattamento termico, invece, ha permesso la distruzione delle forme vegetative e quindi dopo 3 giorni si è verificato un abbattimento significativo di 3,5 Log per entrambi i trattamenti.

Sulla base dei dati preliminari ottenuti in questo studio si può concludere che gli Ultrasuoni ad intensità 70% e durate inferiori ai 200s potrebbero essere utilizzati successivamente a trattamenti termici come la pastorizzazione per: eliminare le spore di *Cl. sporogenes* e quindi diminuire il rischio di gonfiore tardivo e non danneggiare *D. hansenii* soprattutto se utilizzato come starter. La possibile combinazione del trattamento ad ultrasuoni con processi termici e a pressione controllata contribuirebbe, inoltre, ad un miglior abbattimento dei microorganismi in generale, a migliorare la caseificazione e a diminuire la percezione di sapori anomali già individuati dal 10% dei valutatori dopo il trattamento meno intenso (70% 50s) quindi garantirebbe una maggiore qualità del prodotto migliorandone il gusto, la consistenza e l'aspetto oltre che una minor richiesta di energia e conseguente calo dei costi di produzione (Earnshaw et al., 1995; Piyasena et al., 2003; Ordonez et al., 1984; McClements, 1995; Arroyo et al., 2011).

Sono necessari quindi ulteriori studi per capire come questi processi fisici possano essere sfruttati al fine di ottenere prodotti sicuri da punto di vista igienico-sanitario e con sempre migliori caratteristiche organolettiche.

6. BIBLIOGRAFIA

- Alliger, H. 1975. *Ultrasonic Disruption*. *Am. Lab.* 10, 75-85.
- Arfi K, Spinnle HE, Tache R, Bonnarme P. 2002. Production of volatile compounds by cheese-ripening yeasts: requirement for a methanethiol donor for S-methyl thioacetate synthesis by *Kluyveromyces lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 503–510.
- Arroyo C, Cebrian G, Pagan Rand Condon S. 2011. Inactivation of *Cronobacter sakazakii* by ultrasonic waves under pressure in buffer and foods. *Int J Food Microbiol*, 144, 446–454
- Barnett, J. A., R. W. Payne, and D. Yarrow. 2000. *Yeasts: characteristics and identification*, 3rd ed. Cambridge, University Press, Cambridge.
- Baronian KHR. 2004. The use of yeasts and moulds as sensing elements in biosensors. *Biosens Bioelec*, 19, 953–962.
- Bermúdez-Aguirre, D., Mawson R., Barbosa-Cánovas G.V. 2008. Microstructure of fat globules in whole milk after thermo-sonication treatments. *Journal of Food Science*, 73, pp. E325–E332.
- Bermúdez-Aguirre, D., Corradini, M.G., Mawson, R., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2009). Modeling the inactivation of *Listeria innocua* in raw whole milk treated under thermo-sonication. *Innovative food Science and Emerging Technologies*, 10. 172-178.
- Brennan J.G. (2006). *Food Processing Handbook*. UK :Edited by James G. Brennan Copyright © 2006 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 3-527-30719-2. 16 Benning Way, Wokingham Berks.
- Breuer H., and Harms H. 2006. *Debaryomyces hansenii* an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Wiley Inter Science*, 23, 415–437.
- Butz, P., Tauscher, B., 2002. Emerging technologies: chemical aspects. *Food Research International* 35 (2/3), 279– 284.
- Cameron, M. 2007. *Impact of low-frequency high-power ultrasound on spoilage and potentially pathogenic dairy microbes*, University of Stellenbosch, South Africa, Ph.D. Dissertation.
- Cameron, M., McMaster, L. D., & Britz, T. J. 2009. Impact of ultrasound on dairy spoilage microbes and milk components. *Dairy Science & Technology*, 89, 83-98.
- Cappelli P. e Vannucci V. 2013. *Chimica degli alimenti. Conservazione e trasformazioni*. Bologna: Zanichelli editore S.p.A., 2005. pp 404-427.
- Carrega, G., G. Riccio, L. Santoriello, M. Pasqualini, and R. Pellicci. 1997. *Candida famata* fungemia in a surgical patient successfully treated with fluconazole. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 16, 698–699.
- Chouliara, E., Georgogianni, K.G., Kanellopoulou, N., & Kontominas, M.G. 2010. Effect of ultrasonication on microbiological, chemical and sensory properties of raw, thermized and pasteurized milk. *International Dairy journal*, 20, 307-313.
- Deak T, Beuchat LR. 1996. *Handbook of Food Spoilage*. CRC Press: New York.
- Deiana P, Fatichenti F, Farries GA, et al. 1984. Metabolization of lactic and acetic acids in Pecorino Romano cheese made with a combined starter of lactic acid bacteria and yeast. *Le Lait* 64, 380–394.
- Desnos-Ollivier M., Ragon, M., Vincent Robert-Dorotheé Raoux, Jean-Charles Gantier and Françoise. 2008. *Debaryomyces hansenii* (*Candida famata*), a Rare Human Fungal Pathogen Often Misidentified as *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*). *Journal Clinical Microbiology*, 46(10), 3237.

Diekema, D. J., S. A. Messer, A. B. Brueggemann, S. L. Coffman, G. V. Doern, L. A. Herwaldt, and M. A. Pfaller. 2002. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1298–1302.

Drakopoulou, S., Terzakis, S., Fountoulakis, M.S., Mantzavinos, D., Manios, T. 2009. Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultrasonics Sonochemistry* 16, 629–634.

Earnshaw R.G., Appleyard J. & Hurst R.M. (1995). Understanding physical inactivation processes: Combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. *International Journal of Food Microbiology*, 28.197-219.

Engin B. and Yuceer Y. K. 2012. Effects of ultraviolet light and ultrasound on microbial quality and aroma-active components of milk. *J Sci Food Agric*, 92, 1245-1252.

Faticenti F, Bergere JL, Deiana P, Farris GA. 1983. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *C. butyricum*. *J Dairy Res* 50, 449–457.

Fellows, P., 2000. *Food Processing Technology: Principles and Practice*, 2nd ed. CRC Press, New York.

Ferreira A, Viljoen BC. 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 86, 131–140.

Floros, J. D., & Liang, H. 1994. Acoustically assisted diffusion through membranes and biomaterials. *Food Technology*, 48, 79±84.

Gaffney, B.J. (1997). Process for making cheese from enzyme curds. US patent no. US 005629037.

Gao, S., Lewis, G. D., Ashokkumar, M., Hemar, Y. 2014. Inactivation of microorganisms by low-frequency high-power ultrasound: 1. Effect of growth phase and capsule properties of the bacteria. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21, 446–453.

Gracià, M.L., Burgos, J., Sanz, B., & Ordóñez, J.A. (1989). Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *Journal of applied bacteriology*, 67, 619-628.

Gupta, A., H. Mi, C. Wroe, B. Jaques, and D. Talbot. 2006. Fatal *Candida famata* peritonitis complicating sclerosing eritonitis in a peritoneal dialysis patient. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 2036–2037.

Harvey, E.N., Loomis, A.L. 1929. The destruction of Luminous bacteria by high frequency sound waves, *Journal of Bacteriology*, 17, 373–376.

Hougaard, A., Vestergaard, J.S. Varming, C., Bredie, W., L., P., & Hipsen, R. 2011. Composition of volatile compounds in bovine milk heat treated by instant infusion pasteurization and their correlation to sensory analysis. *International Journal of Dairy Technology*, 64, 34-44.

Isaacs, N.S., Chilton, P. and Mackey, B. 1995. Studies on the inactivation of microorganism by high pressure. In: D.A. Ledward, D.E. Johnson, R.G. Earnshaw and A. Hasting (editors) *High pressure Food Processing*, Nottingham University Press.

ISO 10399. 2004. Sensory analysis, Methodology, Duo-trio test. Geneva: International Organization for Standardization.

ISO 22935-2. 2009. Milk and milk products, sensory analysis- Part2: Recommended methods for sensory evaluation. Geneva: International Organization for Standardization.

Jong de, P., Bouman, S., & van der Linden, H. J. L. J. 1992. Fouling of heat treatment equipment in relation to the denaturation of b-lactoglobulin. *Journal of Society of Dairy Technology*, 45, 3±9.

Jong de, P. 1996. Modelling and optimization of thermal treatments in the dairy industry. Thesis ISBN 90-9009034-7.

- Joyce, E., Al-Hashimi, A., Mason, T.J. 2011. Assessing the effect of different ultrasonic frequencies on bacterial viability using flow cytometry, *Journal of Applied Microbiology* 110, 862–870.
- Karatapanis, A., Badeka, A., Riganakos, K., Savvaidis, I., & Kontominas, M.G. 2006. Changes in flavor volatiles of whole pasteurized milk as affected by packaging material and storage time. *International Dairy Journal*, 16, 750-761.
- Kivelä, T. 1996. Easier cheesemould cleaning by ultrasonics. *Scandinavian Dairy Information*, 10, 34-35.
- Koda, S., Kimura, T., Kondo, T., Mitome H. 2003. A standard method to calibrate sonochemical efficiency of an individual reaction system, *Ultrasonics Sonochemistry* 10, 149–156.
- Krcmery, V., and A. Kunova. 2000. *Candida famata* fungemia in a cancer patient: case report. *J. Chemother.* 12:189–190.
- Kumura H, Takagaki K, Sone T, et al. 2002. Casein digestion by *Debaryomyces hansenii* isolated from cheese. *Biosci Biotechnol Biochem*, 66, 1370–1373.
- Lan, L., and Xu J., 2006. Multiple gene genealogical analyses suggest divergence and recent clonal dispersal in the opportunistic human pathogen *Candida guilliermondii*. *Microbiology*, 152, 1539–1549.
- Laubscher PJ, Viljoen BC. 1999. In *The Occurrence, Growth and Survival of Yeasts in Matured Cheddar*, Laubscher PJ, Viljoen BC (eds). University of the Free State: Bloemfontein, South Africa, 77–95.
- Le Bourhis, A.G., Doré J., Carlier J.F., Chamba J.F., Popoff M.R., Tholozan J.L. 2007. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 154-163.
- Lee, B.H., Kermasha, S. and Backer B.E. 1989. Thermal ultrasonic and ultraviolet inactivation of salmonella in thin films of aqueous media and chocolate. *Food Microbiol.* 6, 143-152.
- Maisonhaute, E., Prado, C., White, P.C., Compton R.G. 2002. Surface acoustic cavitation understood via nanosecond electrochemistry. Part III: Shear stress in ultrasonic cleaning, *Ultrasonics Sonochemistry*, 9, 297–303.
- Marchesini, G., Balzan, S., Montemurro, F., Fasolato, L., Andrighetto, I., Segato, S. & Novelli, E. 2012. Effect of ultrasound alone or ultrasound coupled with CO₂ on the chemical composition, cheese-making properties and sensory traits of raw milk. *Journal of Food Science and Emerging Technologies*, 16, 391-397.
- Marsili, R. T. 2003. Flavours and off- flavours in dairy food. In H. Roginski, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.) *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 1069-1081). London: Academy Press.
- McClements, D.J., 1995. Advances in the application of ultrasound in food analysis and processing. *Trends in Food Science and Technology* 6 (9), 293–299.
- Meyer, S., Berrut S., Goodenough T.I.J., Rajendram V.S., Pinfield V.J., Povey M.J.W. 2006. A comparative study of ultrasound and laser light diffraction techniques for particle size determination in dairy beverages. *Measurement Science and Technology*, 17, pp. 289–297.
- Monsen, T., Lovgren E., Widerstrom M., Wallinder L. 2009. In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections, *Journal of Clinical Microbiology*, 47, 2496–2501.
- Müller, H. 1992. Die Käseausbeute als Kostenfaktor. *Deutsche Milchwirtschaft*, 37, 1131±1134.
- National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 2006. Requisite scientific parameters for establishing the equivalence of alternative methods of pasteurization. *J Food Protect*, 69(5), 1190–1216

- Nishikawa, A., T. Sugita, and T. Shinoda. 1997. Differentiation between *Debaryomyces hansenii*/*Candida famata* complex and *Candida guilliermondii* by polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*,19,125–129.
- Nishikawa, A., H. Tomomatsu, T. Sugita, R. Ikeda, and T. Shinoda. 1996. Taxonomic position of clinical isolates of *Candida famata*. *J. Med. Vet. Mycol*, 34, 411–419
- Onishi H. 1963. Osmophilic yeasts. *Adv Food Res*, 12, 53–94.
- Ordonez, J.A., Sanz, B., Hernandez, P.E., Lopez-Lorenzo, P., 1984. A note on the effect of combined ultrasonic and heat treatments on the survival of thermotolerant streptococci. *Journal of Applied Bacteriology* 54, 175– 177.
- Pfaller, M. A., and D. J. Diekema. 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 133–163.
- Pfaller, M. A., D. J. Diekema, M. Mendez, C. Kibbler, P. Erzebet, S. C.Chang, D. L. Gibbs, and V. A. Newell. 2006. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *J. Clin. Microbiol.* 44,3551–3556.
- Piyasena, P., Mohareb, E., McKellar, R.C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology.* 87, 207– 216.
- Prinsloo, B., G. F. Weldhagen, and R. W. Blaine. 2003. *Candida famata* central nervous system infection. *S. Afr. Med. J.* 93, 601–602.
- Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F. & Cotter P.D. 2013. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology reviews*, volume 37, 664-698.
- Quindos, G., F. Cabrera, M. C. Arilla, A. Burgos, R. Ortiz-Vigon, J. L. Canon, and J. Ponton. 1994. Fatal *Candida famata* peritonitis in a patient undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis who was treated with fluconazole. *Clin. Infect. Dis.* 18, 658–660.
- Quiros, M., P. Martorell, M. J. Valderrama, A. Querol, J. M. Peinado, and M. I. de Silloniz. 2006. PCR-RFLP analysis of the IGS region of rDNA: a useful tool for the practical discrimination between species of the genus *Debaryomyces*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90, 211–219.
- Rampilli, M., Andreini, R. 1992. Evaluation of colour components in sterilized milk. *Italian Journal of Food Science*,4, 285-291.
- Ratledge C, Tan K-H. 1990. In *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, Verachtert HJ, De Mot R (eds). Marcel Dekker:New York, 223–253.
- Riener J, Noci F, Cronin DA, Morgan DJ and Lyng T. 2009. Characterization of volatile compounds generated in milk by high intensity ultrasound. *Int Dairy J*, 19,269–272.
- Riesz, P., & Kondo T. 1992. Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. *Free Radical Biology & Medicine.* 13, 247-270.
- Roostita R, Fleet GH. 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 205–219.
- Russell, N.J.2002. Bacterial membranes: the effects of chill storage and food processing. An overview, *International Journal of Food Microbiology*, 79, 27–34.
- Sanz, P., Palacios, P., Lopez, P. and Ordonez, J:A. 1985. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of bacillus stearothermophilus spores. In: G:J. Dring, D:J: Ellars and G.W. Gould (editors). *Fundamental and Applied Aspect of Bacterial Spores*, Academic Press, New York, pp.251-259.
- Seiler H, Busse M. 1990. The yeasts of cheese brines. *Journal Food Microbiology*, 11, 289–304.

Sherba, G., Weigel R.M. and O'Brien, J.R. 1991. Quantitative assessment of the germicidal efficiency of ultrasound energy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 2079-2084.

St-Germain, G., and M. Laverdiere. 1986. *Torulopsis candida*, a new opportunistic pathogen. *J. Clin. Microbiol.* 24, 884-885.

Sun, H., Masuda, F., Kawamura, S., Himoto, J.C., Asano, K., Kimura, T. 2011. Effect of electric current of ohmic heating on no thermal injury to streptococcus thermophilus in milk. *Journal of Food Process Engineering*, 34, 878-892.

USDA. 2000. U.S. Food and Drug Administration Report. *Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies: Ultrasound*. Published June 2, 2000.

UNI ISO 16649-2:2010. *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la conta di Escherichia coli beta glucuronidasi-positiva - Parte 2: Tecnica della conta delle colonie a 44 °C che utilizza 5-bromo-4-cloro-3-indolil beta-D-glucuronide*

UNI EN ISO 6888-2:2004 *Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la conta di stafilococchi coagulasi-positivi (Staphylococcus aureus e altre specie) - Tecnica che utilizza il terreno agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno.*

Van den Tempel T, Jacobsen M. 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowialipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int Dairy Journal*, 10, 263-270.

Villamiel M., de Jong P. 2000. Inactivation of *pseudomonas fluorescens* and *streptococcus thermophilus* in Trypticase Soy Broth and total bacterial in milk by continuous-flow ultrasonic treatment and conventional heating. *Journal of Food Engineering*, 45, 171-179.

Vercet, A., Lòpez, P., & Burgos, J. 1997. Inactivation of heat-resistant lipase and protease from *Pseudomonas fluorescens* by Manothermoutrasonication. *Journal of Dairy Science*, 80, 29-36.

Wagner, D., A. Sander, H. Bertz, J. Finke, and W. V. Kern. 2005. Breakthrough invasive infection due to *Debaryomyces hansenii* (teleomorph *Candida famata*) and *Scopulariopsis brevicaulis* in a stem cell transplant patient receiving liposomal amphotericin B and caspofungin for suspected aspergillosis. *Infection* 33, 397-400.

Walstra, P., Wouters J.T.M., Geurts T.J. 2006. *Dairy science and technology* (2nd ed.). Boca Ratón : CRC Taylor and Francis.

Welshagen JJ, Viljoen BC. 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *Int J Food Microbiol* 41, 185-194.

1929. REGIO DECRETO n. 994 del 9 Maggio 1929. Approvazione del regolamento sulla vigilanza igienica del latte destinato al consumo diretto. *Gazzetta Ufficiale* n. 146 del 24 Giugno 1929.

1973. Il decreto ministeriale 30 agosto 1973 reca: "Autorizzazione al trattamento mediante radiazioni gamma, a scopo antigerminativo, di patate, cipolle ed aglio". *Gazzetta Ufficiale* n. 79 del 04-04-2001.

LEGGI 3 maggio 1989, n. 169 recante la disciplina del trattamento e della commercializzazione del latte alimentare vaccino. *GU* n.108 del 11-5-1989.

1992 DECRETO LEGISLATIVO n. 109 del 27 gennaio 1992. Attuazione delle direttive n. 89/395/CEE e n. 89/396/CEE concernenti l'etichettatura, la presentazione e la pubblicità dei prodotti alimentari.

1997. Regolamento (CE) n. 258 del 1997 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 27 gennaio 1997 che stabilisce le norme specifiche in materia di nuovi prodotti e i nuovi ingredienti alimentari.

2001. DECRETO LEGISLATIVO n.94 del 30 gennaio 2001. Attuazione delle direttive 1999/2/CE e 1993/3/CE concernenti gli alimenti e i loro ingredienti trattati con radiazioni ionizzanti. Gazzetta Ufficiale n. 79 del 04-04-2001.

2002. DECRETO del Ministero della salute del 17 giugno 2002 che fissa le disposizioni per il trattamento di microfiltrazione nel processo di produzione del latte alimentare. Gazzetta Ufficiale n. 178 del 31 Luglio 2002.

2003. Decreto Ministeriale del 24 luglio 2003 che disciplina il sistema di rintracciabilità del latte al fine di assicurare la più ampia tutela degli interessi del consumatore. (GU n. 179 del 4-8-2003)

2004. Regolamento (CE) n. 853 del 2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce le norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

2004. Regolamento (CE) n. 852 del 2004 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 che stabilisce le norme specifiche in materia di igiene dei prodotti alimentari.

2007. Conferenza Stato-Regioni del 25 gennaio 2007 intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n.131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano in materia di vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana.

2008. Agenzia Nazionale Stampa Associata (ANSA). Batterio infetta bimbi, sospetti latte e carne crudi. 2008-12-03. www.ANSA.it. 19:22.

2009. Gazzetta Ufficiale n. 10 della Repubblica Italiana del 14 gennaio 2009, approvazione ordinanza del 10 dicembre 2008 riguardante le Misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana. Pag. 11.

2010. UNI EN ISO 6887-5:2010 DEL 07 OTTOBRE 2010. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Preparazione dei campioni di prova, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'analisi microbiologica. Parte 5: Regole specifiche per la preparazione di latte e prodotti derivati e della loro sospensioni per l'esame microbiologico quando i campioni richiedono una preparazione diversa dai metodi generali specificati nella UNI EN ISO 6887-1.

2012. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010. EFSA Journal, 10(3):2598.

2012. LEGGE 8 novembre 2012, n. 189. Conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 13 settembre 2012, n. 158, recante disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un piu' alto livello di tutela della salute. (12G0212) (G.U. n.263 del 10-11-2012 - Suppl. Ordinario n. 201).

2013. Gazzetta Ufficiale n. 24 del 29 gennaio 2013, DECRETO 12 dicembre 2012 recante le informazioni obbligatorie e misure a tutela del consumatore di latte crudo o crema cruda, in attuazione dell'art. 8, commi 6 e 9, del decreto-legge 13 settembre 2012, n. 158, recante "Disposizioni urgenti per promuovere lo sviluppo del Paese mediante un piu' alto livello di tutela della salute" convertito, con modificazioni, dalla legge 8 novembre 2012, n. 189. (13A00727) GU n.24 del 29-1-2013.