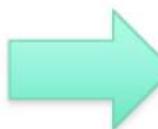


FATTORI INTRINSECI CHE INFLUENZANO LO SVILUPPO MICROBICO NEGLI ALIMENTI E LE MISURE DI CONTROLLO

Il concetto di ecosistema applicato al cibo descrive come un alimento interagisce con i microrganismi che lo vivono. Proprio come in natura, anche qui c'è uno scambio continuo di energia e sostanze. L'alimento non è qualcosa di statico: è parte di un sistema vivo, dove batteri, lieviti e altri microrganismi influenzano il suo aspetto, il gusto e la conservazione.

QUALITA'

L'insieme delle proprietà e caratteristiche di un prodotto o servizio che gli conferiscono l'attitudine a soddisfare bisogni espressi o impliciti
(UNI EN ISO 8402)



Non è un concetto univoco e può cambiare in funzione del consumatore finale



fattori intrinseci (propri dell'alimento): Questi elementi determinano quanto è favorevole l'ambiente per la crescita dei microrganismi.

estrinseci (ambientali): Questi fattori influenzano lo sviluppo microbico dall'esterno.

di processo (trattamenti subiti): Questi trattamenti possono ridurre o modificare la presenza di microrganismi.

impliciti (interazioni microbiche)

Questi fattori si influenzano reciprocamente.

Ad esempio, un trattamento (fattore di processo) può cambiare l'umidità del cibo (fattore intrinseco), che a sua volta cambia la capacità dei microbi di vivere lì.

**“In quali alimenti pensi
che crescano più
facilmente i
microrganismi?”**

Fattori intrinseci	pH Attività dell'acqua (a_w) Potenziale redox Composizione chimica e struttura dell'alimento Ossigeno Antimicobici naturali
Fattori estrinseci	Temperatura Umidità relativa
Fattori di processo	Trattamenti termici Trattamenti innovativi non termici Packaging tradizionali e innovativi
Fattori impliciti	Mutualismo Competizione Commensalismo Amensalismo

I Fattori Intrinseci sono le proprietà chimico-fisiche innate dell'alimento che ne determinano l'idoneità alla crescita microbica, influenzando il metabolismo e l'ecofisiologia dei microrganismi.

Questi fattori sono a loro volta modificati dai processi di trasformazione e dall'attività della microflora esistente (microbiota).

I principali fattori intrinseci includono:

- pH,
- attività dell'acqua (aw),
- disponibilità di ossigeno,
- potenziale redox (Eh),
- composizione e la struttura dell'alimento,
- l'eventuale presenza di sostanze antimicrobiche.

Il Controllo Microbico: pH e Attività dell'Acqua aw come Fattori Intrinseci Chiave

Le caratteristiche chimico-fisiche proprie dell'alimento, rappresentano la prima linea di difesa (o il primo fattore di rischio) per la sicurezza e la qualità microbiologica.

Tra questi, il pH (acidità) e l'attività dell'acqua (aw) (disponibilità di acqua libera) sono i determinanti ecologici più potenti e più sfruttati nelle strategie di conservazione. La loro manipolazione influenza direttamente il metabolismo e la sopravvivenza dei microrganismi.

Il Fattore pH

Il pH è la misura dell'acidità, calcolata come l'inverso del logaritmo della concentrazione di ioni idrogeno

$$\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$$

Per ogni specie microbica, il pH definisce i limiti operativi:

pH minimo (sotto cui non si moltiplica),

pH massimo (sopra cui non si moltiplica)

pH ottimale (velocità massima di sviluppo).

In base al pH ottimale, i microrganismi si classificano in:

Neutrofili: (pH ottimale 6-8) — la maggior parte dei patogeni.

Acidofili: (pH ottimale acido) — es. Batteri Lattici, lieviti.

Alcalofili/Basofili: (pH ottimale alcalino) — rari in ambito alimentare.

L'aumento dell'acidità, tramite aggiunta diretta di acidi (es. aceto) o processi fermentativi, è un metodo efficace per controllare la crescita. I **batteri Gram negativi** sono generalmente più sensibili ai bassi valori di pH rispetto ai **Gram positivi**. I **funghi filamentosi** e i **lieviti** tollerano i valori di pH più bassi tra tutti i gruppi.

Microrganismi	pH
Batteri	
Batteri acetici	2,8
<i>Shigella</i> spp.	3,8
Batteri lattici	3,2–4,4
<i>Salmonella</i> spp.	3,8–4,5
Enterobatteri	4,0–4,6
<i>Staphylococcus</i> spp.	4,2
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,2–4,3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	4,4
<i>Bacillus cereus</i>	4,4–4,9
<i>Aeromonas</i> spp.	4,5
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,5–4,8
<i>Brucella</i> spp.	4,5–5,1
<i>Bacillus</i> spp.	4,5–5,2
<i>Escherichia coli</i>	4,6
<i>Clostridium botulinum</i> A-B	4,7–4,8
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	4,8–5,0
<i>Campylobacter jejuni</i>	4,9–5,5
<i>Clostridium botulinum</i> E	5,0
<i>Vibrio vulnificus</i>	5,0
<i>Clostridium perfringens</i>	5,0–5,5
<i>Pseudomonas</i> spp.	5,6
<i>Vibrio cholerae</i>	6,0
Lieviti	
<i>Candida</i>	1,5–2,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,3
Fungi filamentosi	
<i>Aspergillus</i>	1,6
<i>Penicillium</i> spp.	1,6–1,9
<i>Fusarium</i> spp.	1,8

Valori minimi e massimi

Microrganismo	Minimo	Massimo
<i>E. coli</i>	4	9
<i>S. typhi</i>	4,5	8
Enterococchi	4	9
Lattococchi	4	8
<i>Lactobacillus</i> spp.	3,5	7,5
Muffe	1,5-2	11
Lieviti	2-2,5	8-9

Fattori intrinseci: pH

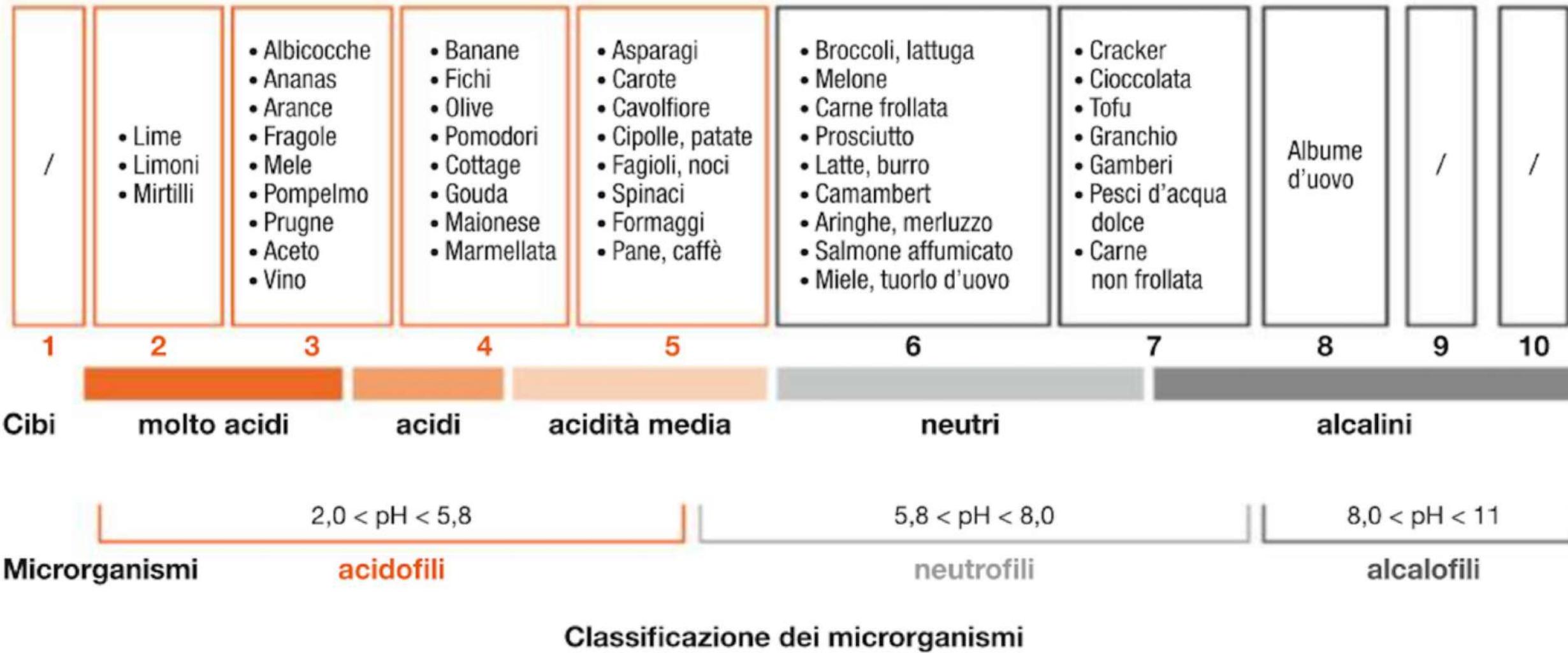
Latte – Limone – Pane – Carne – Yogurt – Aceto – Pesce

In quali di questi alimenti
pensi crescano più
microrganismi e perchè?

Gli alimenti freschi non trasformati hanno valori di pH molto variabili e possono essere suddivisi in:

- **alimenti molto acidi** ($\text{pH} < 3,7$) in cui possono crescere solo i microrganismi più acidurici
- **alimenti acidi** ($3,7 < \text{pH} < 4,6$) che supportano la crescita di microrganismi acidurici e la sopravvivenza di alcuni patogeni (es. *Salmonella*, *Shigella*; *C. botulinum* è inibito)
- **alimenti con acidità intermedia** ($4,6 < \text{pH} < 5,5$) che supportano la crescita e/o la sopravvivenza di molti microrganismi, incluso diversi patogeni, incluso *C. botulinum*.
- **alimenti neutri**, con un pH compreso tra $5,6 < \text{pH} < 7,5$, in cui possono crescere la maggior parte dei microrganismi.
- **alimenti alcalini**, con un $\text{pH} > 7,5$ (fino a 11), sono rari (albume d'uovo e alcuni prodotti fermentati alcalini).

La scala di pH degli alimenti



L'Influenza del pH sulla Crescita Microbica

Microrganismi Neutrofili

La maggior parte dei microrganismi di interesse alimentare ha un pH ottimale di crescita intorno alla **neutralità** (pH 7).

Microrganismi Acido-Tolleranti/Acidurici

Gruppi come i **batteri lattici** sono capaci di tollerare e crescere anche a **valori di pH più bassi** (es. fermentazioni).

Resistenza ai Bassi pH

In generale: **Funghi filamentosi e Lieviti/Batteri** (più resistenti). **Batteri Gram-Positivi/Batteri Gram-Negativi** (più sensibili). *esistono eccezioni specifiche di specie/ceppo.*

Ruolo Patogeno

Il pH influenza la produzione di tossine. Ad esempio, pH < 4.6 è il *cut-off* per la **crescita e la produzione di neurotossina** di *Clostridium botulinum*.

Controllo del pH Negli Alimenti

Modifica e Controllo del pH Negli Alimenti

Metodo	Meccanismo	Esempi
1. Indiretto (Fermentazione)	Microrganismi (es. Batteri Lattici) consumano zuccheri e producono acidi organici (principalmente acido lattico e acetico), abbassando il pH.	Yogurt, formaggi fermentati, crauti, pane a lievitazione naturale.
2. Diretto (Aggiunta di Acidi)	Aggiunta diretta di acidi organici deboli o acidi inorganici forti .	Sottaceti, succhi di frutta, salse (maionese), prodotti da forno, bevande analcoliche.

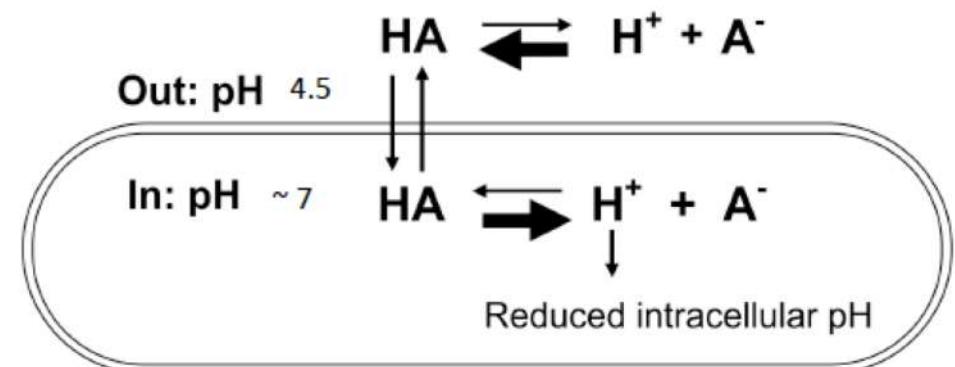
Meccanismo d'Azione degli Acidi Organici

Gli **acidi organici** esercitano la loro funzione antimicrobica principalmente nella loro **forma indissociata (non ionizzata)**. Questa forma, essendo lipofila (solubile nei grassi), è in grado di **attraversare la membrana citoplasmatica** della cellula microbica per semplice diffusione (passiva), senza che la cellula debba impiegare energia per il trasporto.

Una volta all'interno della cellula, dove il pH è tipicamente neutro o quasi neutro (intorno a 7.0-7.5), l'ambiente è più alcalino rispetto al pK_a^* dell'acido.

Questo induce la **dissociazione** dell'acido organico (rilascio di un protone, H^+) e l'accumulo della **forma dissociata (anione)** all'interno della cellula.

*Il pK_a è il pH al quale il 50% dell'acido è in forma indissociata e il 50% è in forma dissociata.



Un acido nella forma dissociata non entra facilmente nella cellula → acidi inorganici (forti) (Acido cloridrico (HCl), Acido solforico (H_2SO_4) etc...)

Un acido nella forma non dissociata entra facilmente nella cellula → acidi organici (deboli)

L'Importanza degli Acidi Organici Deboli

Gli acidi organici deboli (es. lattico, acetico, citrico) sono più efficaci degli acidi forti a parità di pH per la loro capacità di agire come **conservanti**.

- **Meccanismo:** Quando sono in forma **indissociata**, possono facilmente attraversare la membrana cellulare per **diffusione passiva**.
- **Effetto Intracellulare:** Una volta all'interno, si **dissociano**, rilasciando protoni (H^+)
- **Conseguenza:** Questo causa una **diminuzione del pH citoplasmatico**, denaturazione o inibizione delle proteine e riduzione delle attività metaboliche o morte cellulare.

Acido Organico debole	pKa (circa)	Utilizzo Tipico (Alimenti)	Principale Attività Antimicrobica	Note
Acido Acetico (E260)	4.76	Sottaceti, condimenti, pane	Batteri, Lieviti, Muffe	Principio attivo nell'aceto.
Acido Lattico (E270)	3.86	Yogurt, formaggi, salumi, olive	Batteri (soprattutto i <i>Clostridium</i>)	Prodotto naturalmente nella fermentazione.
Acido Sorbico (E200-E203)	4.76	Prodotti da forno, succhi, vino, formaggi	Muffe e Lieviti	Efficace anche a pH più elevati rispetto ad altri, ma l'attività cala drasticamente sopra pH 6.0.
Acido Benzoico (E210-E213)	4.20	Bevande analcoliche (soft drinks), conserve di frutta	Lieviti e Muffe	Uno dei più potenti a basso pH; viene metabolizzato e detossificato dall'uomo.
Acido Propionico (E280-E283)	4.87	Prodotti da forno (pane)	Muffe e Batteri filamentosi	Particolarmente efficace contro le muffe che causano la "malattia della corda" nel pane.

Acido Lattico in Prodotti Carni Fresche

- **Applicazione:** La spruzzatura superficiale di **acido lattico** (1-2%) su carni bovine e pollame dopo la macellazione.
- **Obiettivo:** inibendo patogeni superficiali come *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella*.

Diacetato di Sodio in Prodotti Affettati Sottovuoto

- **Composto:** Sale dell'acido acetico.
- **Applicazione:** Aggiunto in quantità controllate (es. 2%) in prodotti carnei pronti al consumo (*Ready-to-Eat - RTE*), come wurstel o carni cotte affettate e confezionate sottovuoto.
- **Obiettivo:** Estendere la *shelf-life* e inibire specificamente la crescita di **patogeni psicrotrofi** (*L. monocytogenes*),

Risposta dei microrganismi al basso pH

Le cellule microbiche tentano di mantenere l'omeostasi neutralizzando o espellendo protoni rilasciati dalla dissociazione, evitando quindi la denaturazione di proteine-enzimi

L'omeostasi nei microrganismi è il processo mediante il quale la cellula batterica mantiene stabili le proprie condizioni interne, nonostante le variazioni dell'ambiente esterno.

Resistenza Crociata (Stress Adattamento)

L'adattamento a un fattore di stress (es. acidità) può conferire **resistenza indiretta** verso altri fattori (stress termico, salinità).

Regolazione delle Successioni

Il pH (e gli acidi organici) regola la successione naturale delle popolazioni microbiche nei prodotti fermentati.

L'esposizione di *Salmonella serovar Typhimurium* a pH 5,8 durante la fase di crescita la rende meno sensibile sia al **cloruro di sodio** (stress osmotico) sia al **calore**.

Questo è critico per la sicurezza alimentare: un microrganismo precedentemente stressato in un ambiente acido diventa più difficile da uccidere con la pasteurizzazione.

Nelle **fermentazioni spontanee dei cereali**, il pH basso elimina rapidamente le specie più sensibili (es. **Enterobacteriaceae**), spianando la strada alla dominanza di **Leuconostoc**, poi **Weissella** e infine **Lactobacillus sp.**, che è il più resistente all'acidità.

**Perché il miele o la
marmellata non si
alterano facilmente?**

Fattori intrinseci	pH Attività dell'acqua (a_w)  Potenziale redox Composizione chimica e struttura dell'alimento Ossigeno Antimicobici naturali
Fattori estrinseci	Temperatura Umidità relativa
Fattori di processo	Trattamenti termici Trattamenti innovativi non termici Packaging tradizionali e innovativi
Fattori impliciti	Mutualismo Competizione Commensalismo Amensalismo

L'attività dell'acqua (a_w) è definita come il rapporto tra la pressione di vapore dell'acqua presente in un sistema e la pressione di vapore dell'acqua pura, misurate alla stessa temperatura:

$$a_w = \frac{p}{p_0}$$

dove:

- p = pressione di vapore dell'acqua nel prodotto
- p_0 = pressione di vapore dell'acqua pura alla stessa temperatura

Il Controllo Microbico Tramite l'Attività dell'Acqua (a_w)

L'attività dell'acqua (a_w) è una misura della **disponibilità di acqua libera** nell'alimento, che è fondamentale per la crescita microbica, le reazioni chimiche e le attività enzimatiche.

Non è sinonimo di contenuto totale di umidità, poiché l'acqua può essere legata a soluti o alla matrice alimentare.

Sensibilità dei microrganismi all' a_w

- **Batteri Gram-negativi:** richiedono valori di a_w più elevati.
- **Batteri Gram-positivi:** tollerano valori più bassi.
- **Lieviti e funghi:** sono i più resistenti a basse attività dell'acqua.

Categoria microbica	Caratteristica principale	Range di a_w tollerato
Xerofili	Crescono in ambienti poveri d'acqua	$\leq 0,75$
Alofili / Alotolleranti	Tollerano elevate concentrazioni saline	variabile
Osmofili	Tollerano elevate concentrazioni di zuccheri	variabile

a_w Range	Classificazione Alimento	Stabilità e Rischio Microbico	Esempi
$a_w < 0.62$	Bassa a_w	Molto stabile, lunga <i>shelf-life</i> . Nessun patogeno cresce. Rischio di alterazione basso (solo deterioramento minimo).	Latte in polvere, cioccolato, miele, crackers, pasta secca.
$a_w 0.62 - 0.90$	Intermedia a_w	Stabile. Non necessita di refrigerazione. Consente lo sviluppo di Funghi e Lieviti (alotolleranti/osmofili).	Prosciutti stagionati, formaggi a lunga stagionatura, frutta secca, marmellate.
$a_w 0.90 - 0.95$	Elevata a_w	Deperibile. Necessita di refrigerazione. Consente la crescita di molti alteranti e patogeni.	Formaggi a pasta molle, salumi fermentati (freschi).
$a_w > 0.95$	Altissima a_w	Altamente deperibile. Necessita di refrigerazione o barriera. Crescita della maggior parte dei patogeni e deterioranti.	Carne fresca, pollame, latte, uova, formaggi freschi, yogurt.

Minimi di a_w richiesti per la moltiplicazione di alcuni microrganismi alla loro temperatura ottimale di crescita (Leister e Radel, 1978).

a_w	Batteri	Lieviti	Muffe
0.98	Alcuni <i>Clostridium pseudo-monas</i>		
0.97	Alcuni ceppi di <i>Cl. perfringens</i> , <i>Cl. botulinum</i> E		
0.96	<i>Flavobacterium</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Shigella</i>		
0.95	<i>Alcaligenes</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Cl. perfringens</i> e <i>Cl. botulinum</i> A e B, <i>Enterobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Serratia</i> , <i>Vibrio</i>		
0.94	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Vibrio</i>		
0.93	<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>		<i>Rhizopus</i> , <i>Mucor</i>
0.92		<i>Rhodotorula</i> , <i>Pichia</i>	
0.91	<i>Corynebacterium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i>		
0.90	<i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Vibrio</i>	<i>Hansenula</i> , <i>Saccharomyces</i>	
0.88		<i>Candida</i> , <i>Debariomyces</i> , <i>Hanseniaspora</i> , <i>Torulopsis</i>	<i>Cladosporium</i>
0.87		<i>Debaryomyces</i>	
0.86	<i>Staphylococcus</i>		<i>Paecilomyces</i>
0.80		<i>Saccharomyces</i>	<i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Emericella</i> , <i>Eremascus</i>
0.75			<i>Aspergillus</i> , <i>Wallemia</i>
0.70			<i>Eurotium</i> , <i>Chrysosporium</i>
0.62		<i>Saccharomyces</i>	<i>Eurotium</i> , <i>Monascus</i>

Attività dell'acqua (a_w) ed umidità relativa negli alimenti

L'umidità relativa (UR) dell'ambiente che circonda l'alimento non influenza direttamente lo sviluppo microbico, ma può interferire con la conservazione e con i valori di a_w del prodotto.

UR (Umidità Relativa) = quantità complessiva di acqua libera (a_w) e acqua legata presenti all'interno di un alimento.

UR elevata → provoca assorbimento di acqua, con conseguente perdita delle caratteristiche strutturali e organolettiche del prodotto. Inoltre, favorisce lo sviluppo di lieviti, funghi filamentosi e batteri aerobi, a causa della condensazione superficiale dell'acqua.

UR bassa → può causare la perdita di umidità dalla superficie del prodotto, compromettendo negativamente le caratteristiche sensoriali (come consistenza, aroma e sapore).

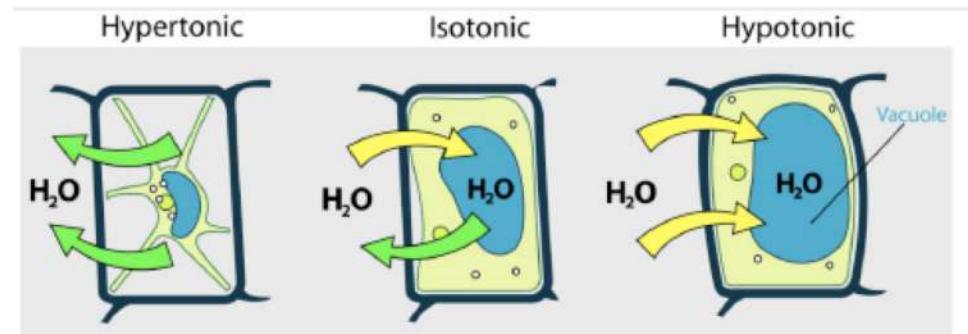
Metodi per la riduzione dell' a_w

Metodi per la Riduzione dell' a_w

La riduzione dell' a_w può essere ottenuta attraverso:

Rimozione fisica dell'acqua → mediante processi di disidratazione (essiccamiento, liofilizzazione, concentrazione).

Aggiunta di soluti → mediante disidratazione osmotica, che riduce la disponibilità di acqua libera legando le molecole d'acqua ai soluti disciolti (es. zuccheri, sali).



Metodo	Meccanismo	Effetto Microbico	Esempi di Prodotti
Essiccazione (Drying)	Rimozione fisica dell'acqua per evaporazione (calore/vuoto). Riduzione dell' a_w fino a < 0.70 .	Inibizione della crescita (soprattutto patogeni sporigene, es. <i>Clostridium</i>), ma sopravvivenza in stato VBNC.	Vegetali/frutta essiccati, carne/pesce essiccati (<i>stockfish</i>).
Concentrazione (Condensazione)	Rimozione fisica di acqua da liquidi (evaporatori, membrane). Spesso combinata con soluti.	Rischio di crescita se non abbinato a un trattamento termico adeguato, a causa dell'aumentata termoresistenza a bassa a_w .	Succhi concentrati, conserve di pomodoro, latte condensato.
Salagione (NaCl)	Disidratazione Osmotica. Aggiunta di sale (a secco o in salamoia). Riduce l' a_w e ha un'azione antimicrobica.	Azione selettiva. Favorisce microrganismi alofili (<i>Tetragenococcus</i>) e alotolleranti (<i>S. aureus</i> fino al 20%, <i>L. monocytogenes</i> fino al 10%).	Formaggi, salumi, pesce salato.

Aggiunta di Zuccheri

Disidratazione Osmotica. Aggiunta di saccarosio/glucosio. Azione antimicrobica **meno intensa** del sale. Favorisce lieviti osmofili (*Zygosaccharomyces rouxii*), funghi filamentosi. Sopravvivenza di spore (*C. botulinum* nel miele).

Marmellate, frutta candita, miele, latte condensato zuccherato.

Liofilizzazione/Spray Drying

Tecniche avanzate (sublimazione o atomizzazione in aria calda/secca). $a_w < 0.3$.

Ottima stabilità. Usate per conservare le colture microbiche (starter). Rischio di ricontaminazione post-processo

Latte in polvere, semilavorati in polvere (spezie), starter microbici.

Risposta dei microrganismi all' a_w

Al diminuire della attività dell'acqua nell'ambiente, i m.o. reagiscono mediante produzione e accumulo di

SOLUTI COMPATIBILI

Osmoliti

Proteine

Alcoli

Zuccheri

Concetto Chiave

Osmoregolazione

Utilizzo di Soluti Specifici

Fattori intrinseci: a_w

Spiegazione

In ambienti ad alta osmolarità (bassa a_w), la cellula microbica deve contrastare la perdita di acqua accumulando **soluti** (amminoacidi, zuccheri, ammine quaternarie) all'interno.

Le diverse specie hanno preferenze per specifici soluti compatibili per mantenere la corretta osmolarità intracellulare.

Esempio

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae* (usato in panificazione e birrificazione) accumula **glicerolo** come soluto compatibile per crescere in ambienti ricchi di zuccheri (alta osmolarità). La sua capacità di controllare questo accumulo è fondamentale per la sopravvivenza in matrici come gli sciroppi o le marmellate.

Listeria monocytogenes utilizza principalmente **prolina e betaina** per fronteggiare lo stress osmotico. Questa capacità le permette di proliferare a basse temperature anche in alimenti salati o fermentati (alotolleranza), rappresentando un rischio significativo nella catena del freddo.

Xerofilia/Alotolleranza

La tolleranza alla bassa a_w è un forte vantaggio competitivo in alimenti essiccati o salati.

Il lievito *Debaryomyces hansenii*, importante nella maturazione dei salami mediterranei, tollera concentrazioni di NaCl fino all'11%. I **funghi filamentosi xerotolleranti** possono crescere prodotti come frutta secca, spezie o cereali.

Stress Osmotico e Stress Generale

L'attivazione di specifici fattori indotti dallo stress osmotico è un meccanismo che conferisce una resistenza generale agli stress della conservazione.

L'attivazione di **fattori indotti dallo stress osmotico** in batteri come *E. coli* e *Salmonella* è cruciale: essa prepara la cellula a resistere anche ad altre condizioni avverse (come il basso pH o il calore), aumentando la sua capacità di sopravvivenza nell'alimento.

**Perché alcune conserve
possono sviluppare tossine
pericolose se non sono
preparate correttamente (es.
botulino)?**

Fattori intrinseci	pH Attività dell'acqua (a_w) Potenziale redox Composizione chimica e struttura dell'alimento Ossigeno Antimicobici naturali
Fattori estrinseci	Temperatura Umidità relativa
Fattori di processo	Trattamenti termici Trattamenti innovativi non termici Packaging tradizionali e innovativi
Fattori impliciti	Mutualismo Competizione Commensalismo Amensalismo

Ossigeno e potenziale ossidoriduttivo

La disponibilità o l'assenza di **ossigeno** è un fattore intrinseco cruciale che modella il potenziale di colonizzazione di un alimento da parte del microbiota.

L'ossigeno è una specie chimica estremamente reattiva e potenzialmente tossica, portando a una differenziazione tradizionale dei microrganismi in quattro categorie principali in base al loro rapporto con l' O_2

- **Aerobi**: necessitano di O₂ per la crescita (funghi, alcuni lieviti, *Pseudomonas* spp..) (respirazione aerobica)
- **Anaerobi obbligati** : O₂ rappresenta una sostanza tossica (clostridi) (fermentazione o respirazione anaerobica)
- **Anaerobi facoltativi**: crescono in presenza ed assenza di O₂ (lieviti, entrobatteri..) (respirazione aerobica/fermentazione)
- **Microaerofili**: necessitano di una minima tensione di O₂ per la crescita (meccanismo energetico variabile)

Effetti dell'ossigeno sui microrganismi

L'ossigeno, quando viene assorbito dalle cellule, può generare specie reattive dell'ossigeno (ROS), cioè sostanze tossiche per la cellula stessa.

Tra queste si trovano:

- il **radicale superossido (O_2^-)**
- il **perossido di idrogeno (H_2O_2)**

Queste molecole sono altamente tossiche e causano danno ossidativo a:

Membrane cellulari.

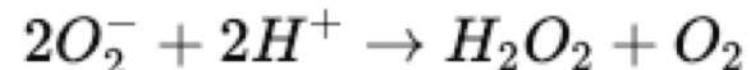
DNA (potenziali mutazioni).

Costituenti cellulari essenziali (enzimi, proteine).

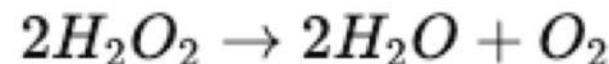
Sistemi enzimatici di difesa

Molti microrganismi possiedono **enzimi specifici** che li proteggono dagli effetti tossici dell'ossigeno:

- Batteri aerobi, anaerobi facoltativi e batteri lattici producono l'**enzima superossido dismutasi (SOD)**, che catalizza la conversione del radicale superossido in perossido di idrogeno e ossigeno:



- Il **perossido di idrogeno (H_2O_2)**, a sua volta tossico, viene eliminato dall'**enzima catalasi**, che lo degrada in acqua e ossigeno:



- I **batteri lattici**, privi di catalasi, eliminano il perossido di idrogeno grazie all'**enzima perossidasi**.

Potenziale redox (Eh)

Il potenziale redox (Eh), espresso in millivolt (mV), rappresenta la tendenza di un sistema a cedere o ad acquisire elettroni:

un valore **positivo** di Eh indica un ambiente **ossidante** (tendenza ad acquistare elettroni),

un valore **negativo** di Eh indica un ambiente **riducente** (tendenza a cedere elettroni).

Le reazioni di ossidoriduzione (redox) costituiscono la base del metabolismo microbico, poiché sono fondamentali per la generazione di energia.

L' Eh agisce inoltre come fattore selettivo essenziale, influenzando la crescita e l'attività dei microrganismi.

Esso può variare in funzione di fattori intrinseci (composizione del substrato, pH, presenza di ossigeno, attività enzimatica) e fattori di processo (trattamenti termici, fermentazione, confezionamento, ecc.)

I microrganismi hanno intervalli di crescita specifici in relazione all' Eh del substrato:

Categoria Microbica	Intervallo Eh Tipico (mV)	Rilevanza Alimentare e Metabolismo	Esempio Pratico
Aerobi	Alto (Eh +400 a +500 mV)	Richiedono un ambiente ossidante per usare O ₂ come accettore finale di elettroni.	La superficie di una carne fresca confezionata in atmosfera aerobia (alto Eh) favorisce lo sviluppo di batteri aerobi alteranti come le <i>Pseudomonas</i> .
Anaerobi Facoltativi	Medio-Basso (Eh +300/500 mV)	Flessibili; usano O ₂ se disponibile, altrimenti cambiano a fermentazione (basso Eh).	Le Enterobacteriaceae possono crescere sia sulla superficie che in profondità in un formaggio, adattandosi al gradiente di O ₂ e Eh
Anaerobi Obbligati	Basso-Negativo Eh+100 a Eh -300 mV)	Non tollerano l'ossigeno; richiedono un ambiente fortemente riducente.	La crescita di <i>Clostridium botulinum</i> (produttore di tossine) è favorita in prodotti a basso Eh come alimenti in scatola, sottovuoto o carni molto fresche (dove il Eh è naturalmente basso).

Fattori che Modificano il Potenziale Redox

L' Eh iniziale di un alimento è determinato dalla sua composizione chimica e può essere drasticamente modificato dai processi:

- **Fattori Intrinseci:**
 - **Frutta e Vegetali freschi:** Hanno bassi valori di Eh grazie alla presenza di **acido ascorbico** (Vitamina C) e **zuccheri riducenti** che fungono da antiossidanti.
 - **Carne fresca:** Ha un basso Eh (riducente) grazie ai gruppi -SH associati alle proteine (es. mioglobina) che sono potenti agenti riducenti.
- **Fattori di Processo:**
 - La **macinatura** di carne intera, che espone i tessuti all'aria e dissolve l'ossigeno, fa passare l' Eh da un valore negativo a uno positivo

Impatto Microbico: I microrganismi stessi modificano l' Eh. Lo **sviluppo microbico** e il consumo di O₂ da parte di aerobi o facoltativi abbassano l'Eh permettendo la successiva crescita di specie che altrimenti non potrebbero svilupparsi (es. anaerobi).

La conoscenza del rapporto dei microrganismi con l'ossigeno è fondamentale per le **tecniche di confezionamento** e per prevedere l'alterazione.

Confezionamento in Atmosfera Modificata (MAP): Per prolungare la *shelf-life* della carne fresca, si utilizza un alto contenuto di O₂ (aerobi obbligati) per mantenere il colore rosso. Un'alta concentrazione di O₂ può inibire la crescita di patogeni anaerobi e facoltativi.

Sottovuoto: L'assenza di ossigeno è una strategia per inibire gli aerobi obbligati (*Pseudomonas*), ma crea un rischio critico per gli **anaerobi obbligati** come *Clostridium botulinum*.

Alimenti Fermentati: Nei prodotti in cui l'O₂ è consumato rapidamente dai microrganismi facoltativi o è escluso (es. fermentazione di crauti o olive in salamoia), si favorisce la crescita dei batteri lattici e si inibiscono i microrganismi di alterazione aerobi.

Fattori intrinseci	pH Attività dell'acqua (a_w) Potenziale redox Composizione chimica e struttura dell'alimento Ossigeno Antimicobici naturali
Fattori estrinseci	Temperatura Umidità relativa
Fattori di processo	Trattamenti termici Trattamenti innovativi non termici Packaging tradizionali e innovativi
Fattori impliciti	Mutualismo Competizione Commensalismo Amensalismo

Composizione Nutrizionale: Selettività e Utilizzo

Gli alimenti sono substrati nutritivi estremamente ricchi, favorendo la crescita di una vasta gamma di specie.

I microrganismi traggono energia dall'ossidazione di composti ridotti. La loro esiguità nutrizionale è variabile, con **funghi** e **lieviti** generalmente meno esigenti dei batteri (Gram negativi meno esigenti dei Gram positivi).

Fonti

Fonti Energetiche

L'alimento fornisce principalmente carboidrati semplici, ma i microrganismi più adattabili (con specifici enzimi) possono utilizzare zuccheri complessi (amidi, cellulosa) o lipidi.

Esempio

Il lievito non convenzionale *Yarrowia lipolytica*, è in grado di utilizzare **lipidi** (acidi grassi e triacilgliceroli) come substrato energetico. Per questo motivo, può svilupparsi in matrici come **oli vegetali** o emulsioni ricche di grassi.

Fonti Azotate

I composti semplici, come gli **amminoacidi**, sono preferiti dalla maggior parte dei microrganismi rispetto a peptidi e proteine. Alcuni possono utilizzare l'azoto inorganico (ione ammonio o nitrati).

La limitazione di amminoacidi liberi in un succo di frutta pastorizzato a lungo termine può inibire la crescita dei batteri più esigenti, ma non quella di lieviti o batteri acetici che riescono a metabolizzare **azoto inorganico** o altre fonti più complesse.

Fattore di Selezione

La composizione nutrizionale di un alimento (es. alto contenuto di lattosio nel latte) favorisce specie specifiche, a discapito di altre.

Nel **latte**, l'abbondanza di lattosio, proteine e lipidi favorisce i **Batteri Lattici** (*Lactococcus*, *Lactobacillus*) che possiedono i sistemi enzimatici per degradare questi composti, dominando l'ecosistema iniziale.

Struttura e Microambienti: L'Effetto Barriera

La struttura fisica dell'alimento incide profondamente sullo sviluppo microbico, specialmente per come gestisce la compartmentalizzazione e la protezione dalle sollecitazioni esterne (come i trattamenti termici).

Compartmentalizzazione

La distribuzione di acqua, nutrienti e antimicrobici in diverse fasi (es. emulsioni olio in acqua o acqua in olio) condiziona lo sviluppo.

Protezione Termica

Le modifiche microstrutturali indotte dai trattamenti (es. coagulazione proteica) possono proteggere fisicamente i microrganismi.

Eterogeneità Strutturale

Alimenti solidi presentano habitat diversi (microstrutture disomogenee) con gradienti distinti di determinanti ecologiche (pH, aw).

Esempio

Le **emulsioni Acqua in Olio** (es. margarina) sono microbiologicamente più stabili. I microrganismi restano confinati in minuscole **goccioline acquose** isolate dalla fase continua grassa, limitando l'accesso ai nutrienti e l'interazione tra le cellule.

Quando le **uova** vengono sottoposte a pasteurizzazione, la **coagulazione** di proteine come l'ovotransferrina aumenta la **viscosità** del sistema. Questa elevata viscosità rallenta il trasferimento di calore, **proteggendo** i microrganismi e rendendo il trattamento termico meno efficace.

In un **formaggio stagionato**, la **crosta** (più secca e spesso con pH più alto) favorisce lo sviluppo di **muffe e batteri della superficie**, mentre la parte interna (più umida e acida) favorisce la permanenza e l'attività degli **starter lattici**.

Fattori intrinseci	pH Attività dell'acqua (a_w) Potenziale redox Composizione chimica e struttura dell'alimento Ossigeno Antimicobici naturali
Fattori estrinseci	Temperatura Umidità relativa
Fattori di processo	Trattamenti termici Trattamenti innovativi non termici Packaging tradizionali e innovativi
Fattori impliciti	Mutualismo Competizione Commensalismo Amensalismo

Presenza di Antimicobici

Gli alimenti contengono o accumulano sostanze con attività antimicrobica, che influenzano o inibiscono lo sviluppo microbico. Queste molecole possono essere di origine **vegetale, animale o prodotte dagli stessi microrganismi.**

Antimicobici di Origine Vegetale (Oli Essenziali e Composti Fenolici)

Le matrici vegetali sono ricche di **oli essenziali e composti fenolici** che agiscono come meccanismi di difesa naturali della pianta

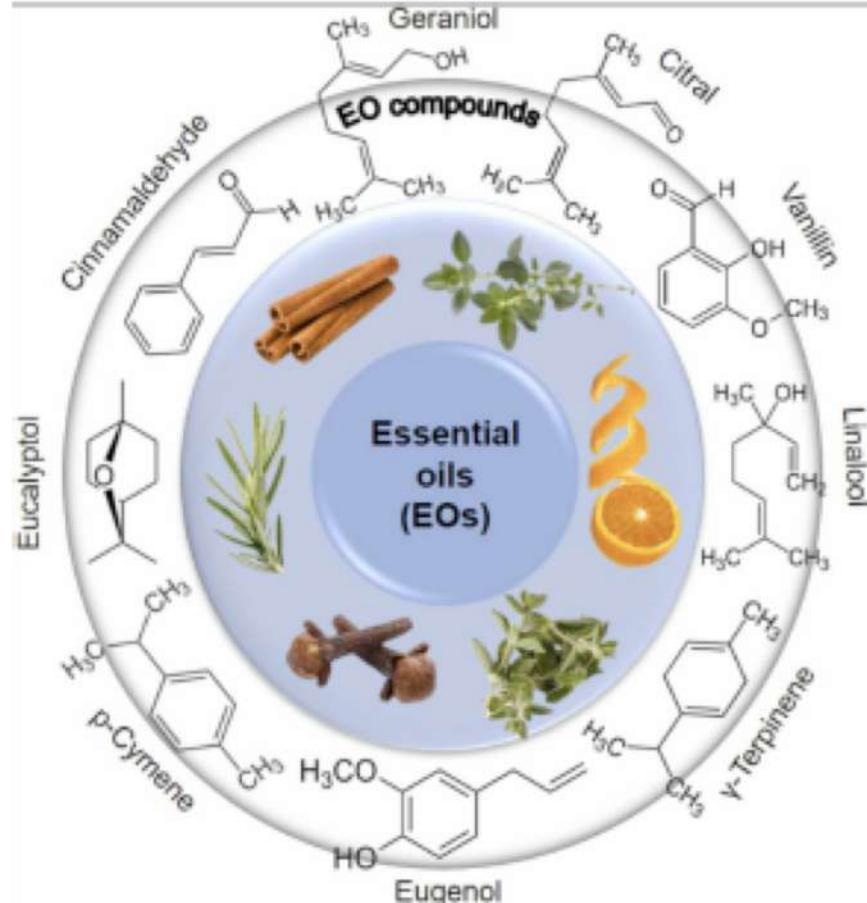
effetto antimicobico da terpeni e fenoli: olio di chiodi di garofano (cariofillene, eugenolo), di timo (timolo), di origano (carvacrolo), di menta (geraniolo), di cannella (cinnamaldeide, eugenolo), di basilico (geraniolo, linalolo, acido cinnamico)

Spezie → effetto antimicrobico dovuto alla presenza di metaboliti appartenenti alle classi dei flavonoidi, tannini, glicosidi, terpeni e fenoli.

Rosmarino, origano, pepe, curcuma, zenzero, curry,...

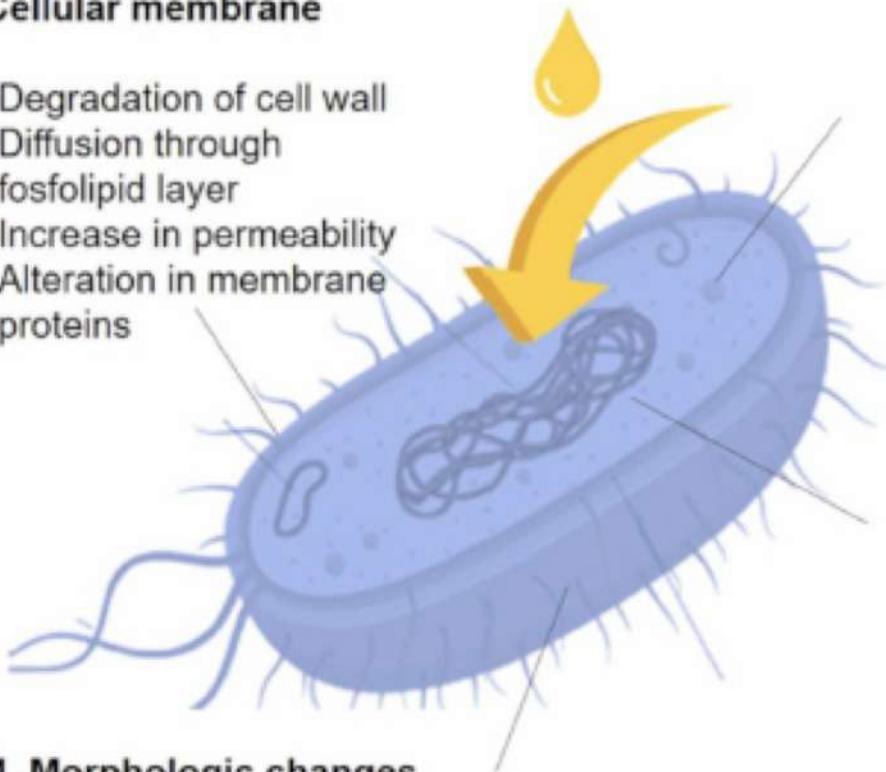
Ricchi anche in oli essenziali





1. Cellular membrane

- Degradation of cell wall
 - Diffusion through fosfolipid layer
 - Increase in permeability
 - Alteration in membrane proteins



2. Cytoplasm

- Effect on cytoplasmic enzymes
 - Increase in extracellular ATP
 - Depletion of proton pump
 - Leakage of metabolites, ions, proteins and nucleic acids

3. Genetic material

- Alterations in genes expression.
 - Reduction of virulence factors (e.g. proteolytic activity and biofilm formation)
 - Incapacity of replication

4. Morphologic changes

- Deformation, loss of shape and cell shrinkage

	Spiegazione	Esempio Pratico
Meccanismo d'Azione Idrofobico	L'attività antimicrobica degli oli essenziali, data la loro natura idrofobica, è primariamente dovuta alla capacità di penetrare la membrana citoplasmatica , alterandone la struttura e la funzionalità (es. forza proton motrice).	I terpeni e terpenoidi, come il timolo (presente nel timo), danneggiano le membrane cellulari. Questa idrofobicità spiega la maggiore attività verso i Gram positivi (privi della membrana esterna protettiva dei Gram negativi).
Correlazione Volatilità/Efficacia	L'attività antimicrobica è correlata alla volatilità (tensione di vapore) dei composti: maggiore è la volatilità, maggiore è l'attività, poiché aumenta la solubilità nelle membrane.	L'efficacia di oli essenziali in carni marinate o succhi di frutta può essere incrementata se usati in combinazione con fattori che ne aumentano la tensione di vapore, come alte temperature (trattamenti termici blandi) o omogeneizzazione ad alta pressione.
Produzione da Interazione Microbica	I composti antimicrobici e aromatici possono essere esaltati dalla co-fermentazione di ceppi complementari.	Nelle paste acide (lievito madre), la cofermentazione tra lieviti e batteri lattici aumenta la concentrazione di acidi fenolici (anti-microbici) e di molecole aromatiche (lattoni, furanoni), migliorando la sicurezza e la qualità organolettica.

Fonte	Componenti Antimicobici Chiave	Target Microbico Principale	Considerazioni d'Uso
Spezie (in toto)	Flavonoidi, Tannini, Terpeni, Fenoli.	<i>L. monocytogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>Bacillus spp.</i>	Richiedono alte quantità per l'efficacia, il che può alterare l'aroma del prodotto.
Oli Essenziali (OE)	Terpeni, Terpenoidi, Fenoli (Carvacrolo, Timolo, Eugenolo).	Ampio Spettro (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>).	Forma concentrata ed efficace. L'attività varia in base alla composizione chimica (principio attivo).

Antimicobici di Origine Animale

Lisozima

Enzima che idrolizza il legame beta-glicosidico del peptidoglicano, rendendolo attivo principalmente contro i batteri Gram positivi

Il lisozima, presente nelle uova e usato come additivo, è stato con omogeneizzazione ad alta pressione per migliorarne l'efficacia contro *Listeria monocytogenes* (Gram positivo) nel latte. L'alta pressione modifica la struttura del lisozima, aumentando la sua affinità per la membrana micobica.



Lisozima da uovo:

- Enzima antimicrobico utilizzato nel processo produttivo
- Considerato additivo
- Idrolizzare del legame tra componenti del peptidoglicano, nei batteri Gram positivi (sporogeni; caseificazione Grana Padano)



Proteine Antimicrobiche

Esempi includono lattoferrina e lattoperossidasi nel latte, e ovotransferrina nell'uovo.

La lattoferrina, proteina presente nel latte, ha azione batteriostatica perché lega il ferro (nutriente essenziale), limitandone la disponibilità per i microrganismi patogeni o alteranti.

Controllo microbico tramite conservanti

I **conservanti** sono sostanze (naturali o aggiunte) che estendono la *shelf-life* e migliorano la sicurezza degli alimenti, primariamente **inibendo lo sviluppo microbico** e rallentando reazioni enzimatiche indesiderate.

Molti composti con azione conservante sono **naturalmente presenti** (es. olio, aceto) o sono **prodotti microbicament**e (es. acidi organici, batteriocine). I conservanti aggiunti deliberatamente rientrano nel **Reg. CE 1333/2008** e sono classificati come **additivi alimentari** (codici E200-E299, spesso definiti "conservanti artificiali"). L'obbligo di etichettatura è essenziale per la trasparenza.

Acidi Organici e Loro Sali

Acidi come l'acetico, il lattico e il citrico (trattati in precedenza) agiscono principalmente abbassando il pH e danneggiando le cellule. Altri acidi organici, come il **propionico**, il **benzoico** e il **sorbico**, e i loro sali, sono usati specificamente come conservanti e hanno meccanismi d'azione più complessi. La loro efficacia è spesso **pH-dipendente**, agendo al meglio in forma indissociata.

Importanza Selettiva

I conservanti spesso hanno un'azione **selettiva**. Ad esempio, i propionati sono ben tollerati da lieviti e batteri lattici, permettendone l'uso in prodotti da forno lievitati. I sorbati non interferiscono con i batteri lattici e sono quindi usati come fungistatici in prodotti fermentati (es. formaggi).

Conservante (Codice E)	Target Microbico Principale	Range di Azione	Esempi di Applicazione
Acido Propionico (E280) e Sali	Funghi filamentosi	Ampio	Formaggi (trattamento superficiale), prodotti da forno preconfezionati.
Acido Benzoico (E210) e Sali	Lieviti, Funghi filamentosi	Ottimo a pH bassi ($2.5 < \text{pH} < 4.5$), nullo vicino alla neutralità.	Bevande, succhi di frutta, marmellate, condimenti.
Acido Sorbico (E200) e Sali	Lieviti, Funghi filamentosi, alcuni Batteri (<i>Salmonella</i>, <i>S. aureus</i>).	$3.0 < \text{pH} < 6.0$.	Formaggi, prodotti da forno, succhi, carni/pesci conservati.
Anidride Solforosa e Solfiti (E220-E228)	Lieviti, Batteri Gram-Negativi	SO_2 (forma attiva) prevale a $\text{pH} < 4.0$.	Vino, birra, succhi, frutta secca/fresca, crostacei.

Nitrati e Nitriti (E249-E252)

• **Ruolo Essenziale:** Utilizzati nelle **carni curate** (salumi) per due scopi principali:

- **Sicurezza Igienico-Sanitaria:** Inibizione cruciale di *Clostridium botulinum* (bloccano la produzione di ATP).
- **Qualità Sensoriale:** Stabilizzano il colore rosso tipico della carne (*nitrosomioglobina*).

• **Rischio Sanitario:** I nitriti possono reagire con ammine e formare **nitrosammime**, composti potenzialmente cancerogeni. Per mitigare questo rischio, è comune l'aggiunta di **antiossidanti** come l'acido ascorbico (Vitamina C) e i suoi sali.

Antimicobici prodotti da microrganismi

Batteriocine: Peptidi Microbici

Le batteriocine sono **peptidi a sintesi ribosomiale** prodotti dai batteri, particolarmente efficaci contro patogeni e alteranti (spesso della stessa specie o di specie affini).

I produttori più rilevanti sono i **Batteri Lattici** (LAB), i propionibatteri e alcuni corineiformi.

Classe

Classe I (Lantibiotici)

Classe II

Batteriolisine

Descrizione

Peptidi modificati post-traduzionalmente (es. lantionina).

Piccoli peptidi non modificati e **termostabili**, spesso con attività ad ampio spettro.

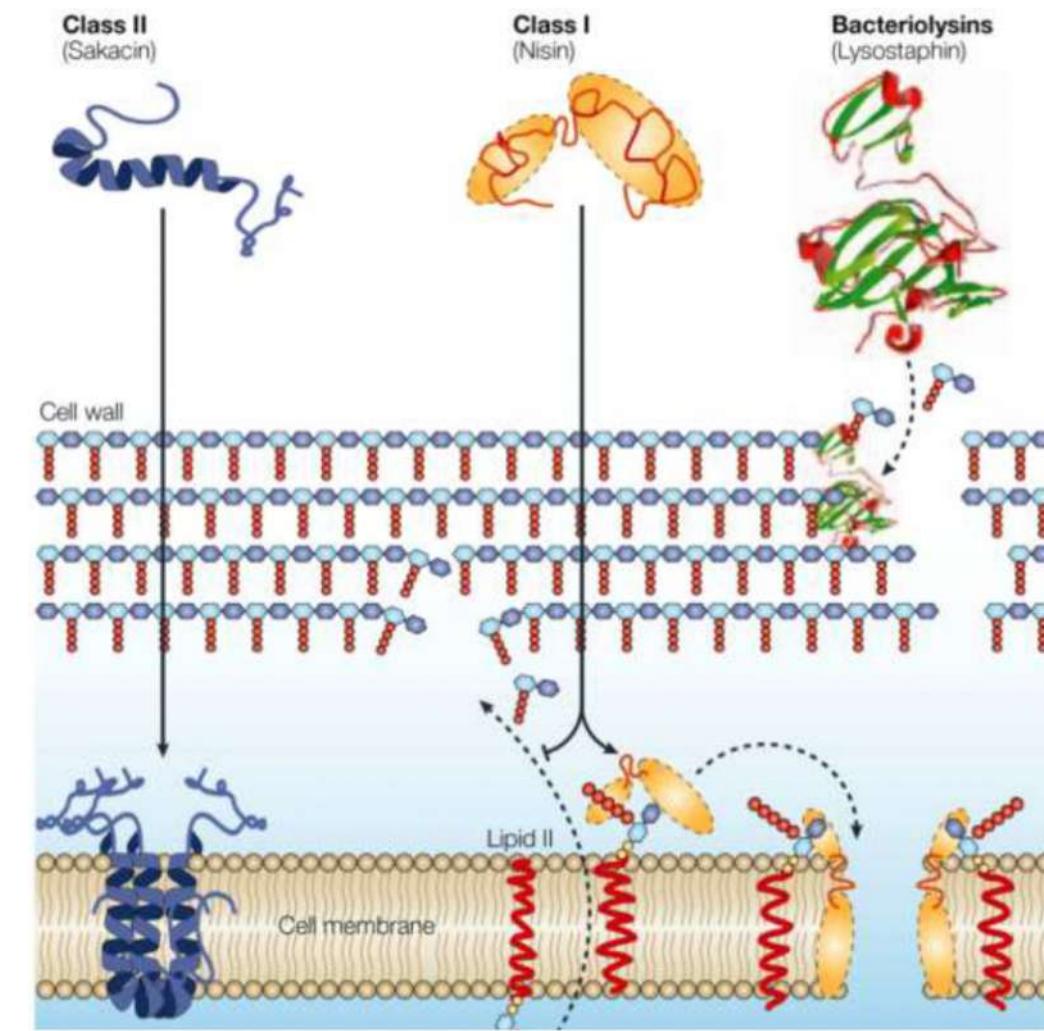
Peptidi di grandi dimensioni, generalmente **termolabili** e con spettro d'azione ristretto.

Esempi

Nisina (E234)

Pediocina PA1, Sakacina K.

Helveticina.



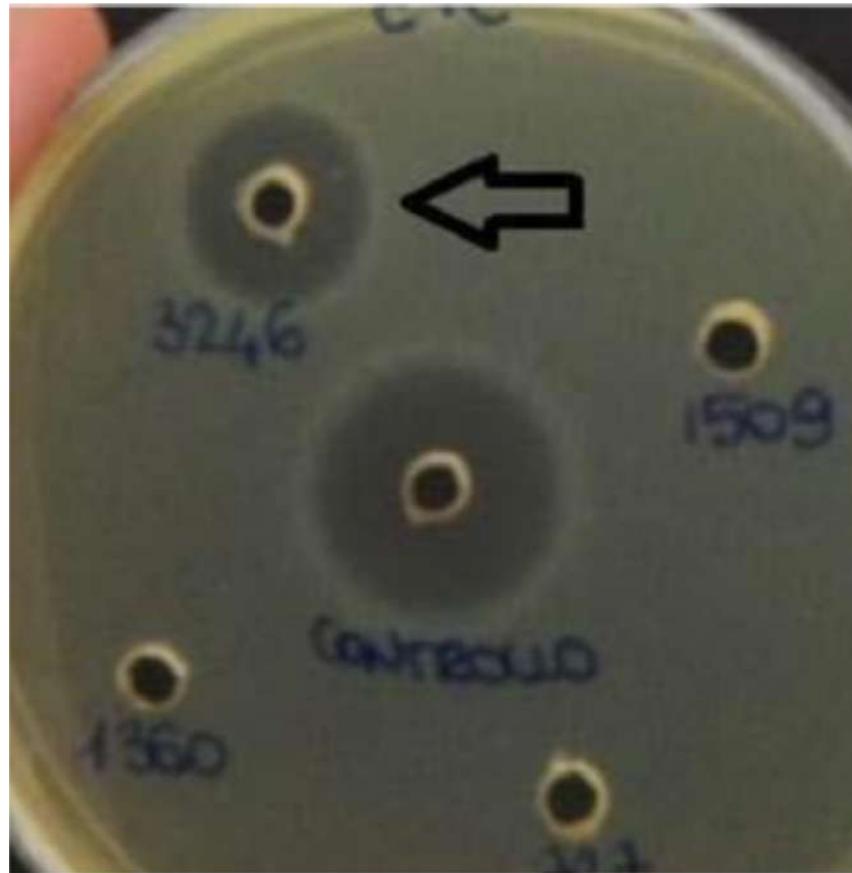
Classe I- Formazione di pori nella membrana

Classe II- Depolarizzazione membrana

Batteriolisine - Idrolisi della parete cellulare

La Nisina (E234)

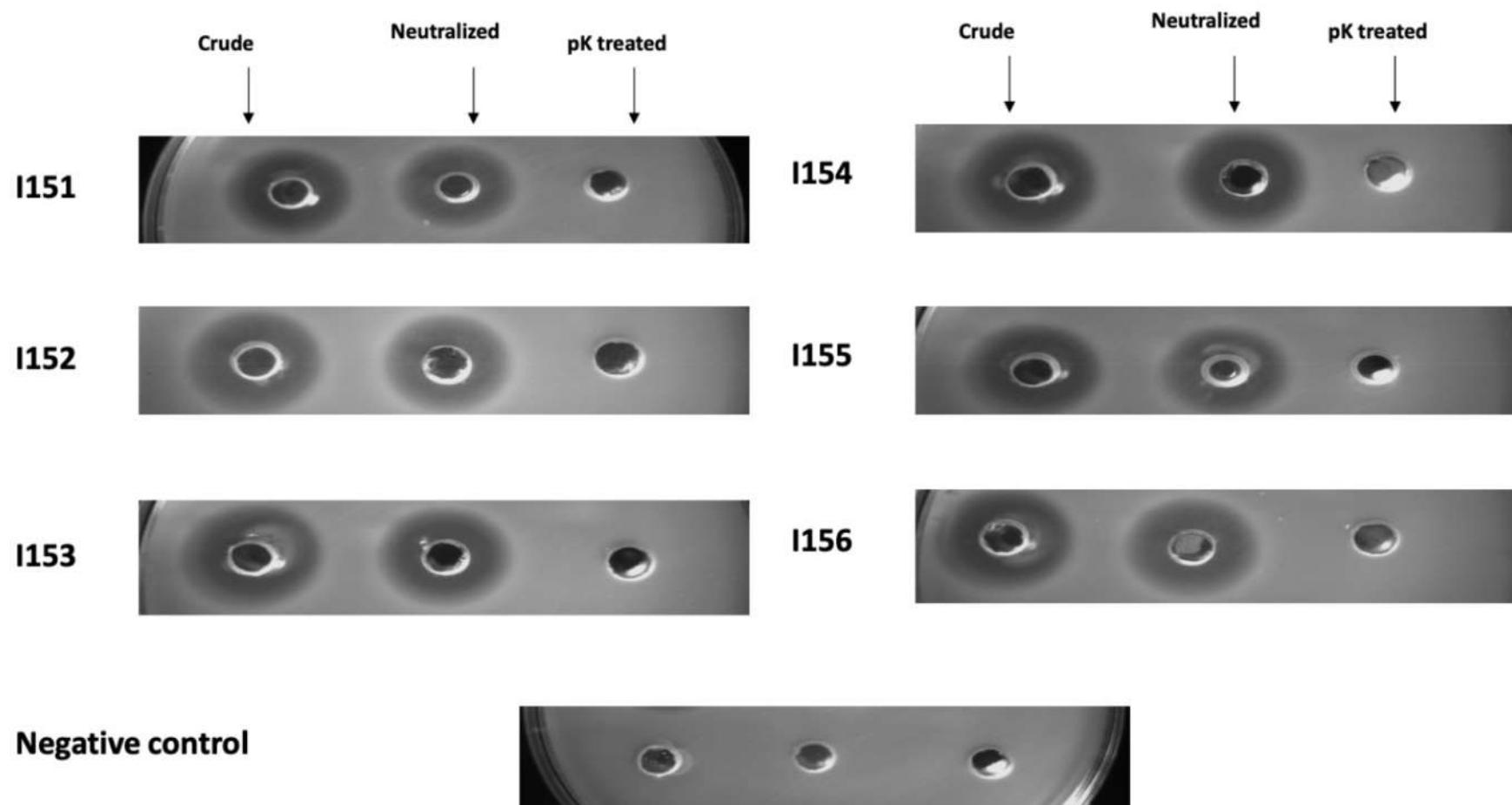
- Prodotta da *Lactococcus lactis*, peptide contenente 34 aminoacidi (3354 Da). Unica batteriocina autorizzata come additivo alimentare (E234).
- **Target:** Patogeni sporigeni come *Clostridium botulinum* e agenti del *flat-sour* (*Geobacillus stearothermophilus*) nelle conserve.
- **Beneficio:** Consente l'uso di trattamenti termici più blandi e/o la riduzione di conservanti chimici (es. benzoati, sorbati), migliorando la qualità del prodotto finale.



Ricerca di batteri produttori di batteriocine: metodica *Agar Well Diffusion Assay* (AWDA)

- a) Alone per la brodocoltura senza trattamento (*Crude*): indica inibizione
- b) Alone per la brodocoltura con pH neutralizzato (*Neutralized*): indica inibizione non legata ad acidificazione
- c) Assenza di alone per la brodocoltura con aggiunta di un enzima proteolitico (*pK treated*): conferma la natura proteica dell'inibizione

Agar Well Diffusion Assay



Batteriocine dei Gram–: caratteristiche generali

I Gram– (come *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) producono batteriocine molto diverse da quelle dei Gram+, sia per dimensione che per meccanismo d’azione.

Le due principali categorie sono:

- ◆ a) Colicine

Prodotte soprattutto da *Escherichia coli* (da cui il nome).

Sono proteine di grandi dimensioni (30–80 kDa), termolabili, codificate da plasmidi (col-plasmidi).

- ◆ b) Bacteriocine simili (es. piocene, klebsicine, etc.)

- *Pseudomonas aeruginosa* → produce piocene

- *Klebsiella pneumoniae* → klebsicine

- *Serratia* spp. → serracine

- *Enterobacter cloacae* → cloacine

I principali meccanismi:

Formazione di pori nella membrana citoplasmatica → perdita di ioni e metaboliti → morte cellulare.

Degradazione del DNA o dell'RNA → blocco della sintesi cellulare.

Inibizione della sintesi proteica o del trasporto di nutrienti.

Caratteristica

Gram+

Struttura

Peptidi piccoli (1–10 kDa)

Codifica

Spesso cromosomica o plasmidica

Meccanismo

Pori, interferenza con parete cellulare

Spettro d'azione

Più ampio

Esempio

Nisine (*Lactococcus lactis*)

Gram-

Proteine grandi (30–80 kDa)

Generalmente plasmidica

Pori, DNasi, RNasi

Molto ristretto

Colicine (*E. coli*)

Ruolo ecologico e applicazioni

- **Competizione ambientale:** limitano la crescita di ceppi rivali nello stesso habitat.
- **Ecologia intestinale:** *E. coli* può produrre colicine per competere con altri enterobatteri.
- **Potenziale biotecnologico:** in studio come *alternativa agli antibiotici* o per *biocontrollo micoblico* negli alimenti, anche se **meno usate** delle batteriocine Gram+.