

## **ABSTRACT**

Lo scopo di questo lavoro era di verificare la riduzione di lieviti e muffe nell'aria confinata in celle di stagionatura, sulle superfici dei carrelli, nella crosta del formaggio Asiago Pressato, a seguito dell'azione dell'ozono prodotto da un apposito apparecchio.

La commercializzazione dei formaggi freschi secondo le esigenze della Grande Distribuzione Organizzata e le nuove vie di esportazione, comportano l'adozione di linee tecnologiche ed accorgimenti produttivi nuovi atti a ridurre l'utilizzo di conservanti aggiunti e capaci di garantire adeguata shelf - life, anche per il prodotto porzionato.

Con il lavoro di tesi si è voluto quindi studiare un metodo alternativo di controllo delle muffe e dei lieviti, valutarne l'efficacia di conseguenza poter produrre un prodotto porzionato e confezionato sotto vuoto senza conservanti facendo riferimento ad una specifica realtà produttiva: Lattebusche (Stabilimento di Sandrigo - VI).

Sarà innanzitutto necessario accennare gli aspetti legati all'ozono, alle tipologie di lieviti e muffe, alla tecnologia del formaggio Asiago Pressato, dando poi spazio alla parte sperimentale per individuare la quantità di lieviti e muffe presenti (UFC/ml) nell'aria delle celle, nelle superfici e nel formaggio in sperimentazione con l'insufflaggio di ozono in aria di una delle due celle rispetto al prodotto di controllo in ambiente senza ozono.

## **1.0. INTRODUZIONE**

### **1.1. OZONO - Cenni storici**

L'Ozono rappresenta la forma attivata e trivalente dell'ossigeno ed è un gas naturalmente presente nell'atmosfera terrestre, presente nei vari strati in concentrazioni diverse, dove si forma fotochimicamente, nella stratosfera ad opera dei raggi ultravioletti sull'ossigeno. La formula dell'ossigeno è  $O_2$ , mentre quella dell'ozono è  $O_3$ .

L'ossigeno, ma soprattutto l'ozono, sono in grado di assorbire i raggi ultravioletti solari, con un meccanismo che consente una formazione continua di ozono nell'atmosfera. L'ozono è indispensabile per la vita sulla terra per la capacità di assorbire i raggi ultravioletti perché, se non filtrati, essendo raggi ricchi di energia, determinerebbero la denaturazione delle proteine e quindi la distruzione di ogni forma di vita.

Oltre a questo effetto protettivo ha anche un effetto tossico sull'uomo, che può essere causato da una prolungata esposizione all'ozono con concentrazioni superiori a 0,3 mg/m<sup>3</sup> (limite tossico stabilito dall'Unione Europea e dal Decreto Legislativo n°183 del 21 maggio del 2004).

Si distingue facilmente per il suo caratteristico odore pungente, che è possibile riconoscere dopo i temporali.

Fu scoperto per la prima volta da un chimico olandese Van Mauren nel 1785, in prossimità di una scarica elettrica. Nella descrizione dei suoi esperimenti, citò la nozione di odore caratteristico, ma fu solo nel 1840 che Christian Schönbein ne identificò la sua natura di gas chiamandolo con il nome di OZONO che in Greco significa appunto odore, aveva notato lo stesso odore caratteristico durante i suoi esperimenti, che Van Marum aveva provato ad identificare precedentemente. Inoltre, Schönbein è ricordato come la prima persona che ricercò i meccanismi di reazione tra ozono e materia organica.

Dopo il 1840 furono realizzati molti studi sul meccanismo di disinfezione con ozono.

Il primo generatore di ozono fu prodotto a Berlino da Von Siemens.

Esso scrisse inoltre un libro sull'applicazione dell'ozono in acqua.

Ciò portò alla realizzazione di un certo numero di progetti pilota, durante il quale venne ricercato il meccanismo di disinfezione con ozono.

Il chimico francese Marius Paul Otto (figura 1) ricevette un dottorato dall'università francese, per il suo saggio sull'ozono. Fu la prima persona a fondare un'azienda specializzata nella produzione di installazioni ad ozono: "DES Eaux et de l'Ozone di Compagnie "

Successivamente nel 1867 fu confermata la sua struttura di molecola triatomica dell'ossigeno. Il suo potere microbicida è noto sin dalla fine dell'800.

Le prime applicazioni tecniche dell'ozono ebbero luogo a Oudshoorn, Paesi Bassi, nel 1893.

Dal 1906 esiste a Nizza il primo impianto di purificazione acque municipali con ozono.

Durante gli anni precedenti la prima Guerra Mondiale, ci fu un aumento nell'uso delle installazioni di ozono in diversi paesi. Intorno al 1916, 49 installazioni di ozono erano in uso in tutta l'Europa (26 delle quali situate in Francia). Tuttavia, questo aumento cessò presto in seguito. Ciò fu conseguenza della ricerca sui gas tossici, che portò allo sviluppo del cloro.

Questo disinfettante sembrò essere un'alternativa adatta all'ozono, in quanto non aveva imperfezioni nella gestione, come bassa garanzia applicativa ed basso rendimento nella produzione di ozono. La produzione dell'ozono non raggiunse il suo record precedente fino a dopo la seconda guerra mondiale.

Nel 1940, il numero di installazioni dell'ozono in uso in tutto il mondo crebbe intorno a 119. Nel 1977 questo numero aumentò a 1043 installazioni. Più della metà erano situate in Francia. Intorno al 1985, il numero di installazioni a base di ozono applicate fu valutato > 2000.

Oggi, il cloro è ancora preferito all'ozono nella disinfezione dell'acqua. Tuttavia, negli ultimi decenni l'applicazione dell'ozono ricominciò nuovamente ad aumentare ancora. Ciò fu causato dalla scoperta dei trialometani (THM) come sottoprodotto nocivo della disinfezione tramite cloro, nel 1973.

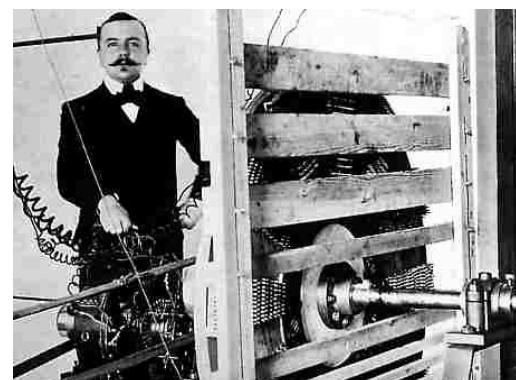


Figura 1: Marius Paul Otto

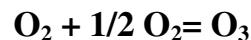
Di conseguenza, gli scienziati iniziarono a cercare disinfettanti alternativi . Un altro problema fu un aumento di microinquinanti organici difficilmente smaltibili in acque superficiali. Questi residui sembrarono essere ossidabili con ozono più velocemente che con il cloro ed i composti del cloro.

Inoltre l'ozono risultò disattivare persino quei microorganismi in grado di sviluppare resistenza ai disinfettanti, come il Criptosporidio. [1]

## 1.2. Proprietà dell'ozono

La sua instabilità molecolare non gli consente di poter essere immagazzinato, quindi viene prodotto in prossimità del suo utilizzo.

La sua formazione è ottenuta per mezzo di una scarica elettrica che ha il potere di separare gli atomi delle molecole di O<sub>2</sub>, che si combinano con altri formando così:



A temperatura ambiente è incolore e irritante con un odore pungente.

Allo stato liquido, solido e gassoso è molto instabile, soprattutto ad elevate concentrazioni.

L'ozono è il più forte agente ossidante, molto più reattivo dell'ossigeno e dieci volte più del cloro ed è in grado di distruggere batteri, funghi, insetti e virus con grande efficienza. [17]

L'ozono reagisce con le sostanze organiche contenente doppi legami (insature), determinandone la scissione.

All'inizio l'ozono reagisce con i doppi legami determinandone la scissione. Tale reazione è detta ozonolisi. Nella prima parte della reazione agisce a livello del doppio legame formando un *ozonide primario* instabile che degenera rapidamente formando un *carbonile* e un *zwitterione*. Quest'ultimo è molto reattivo, in presenza di sostanze come l'acqua forma i *perossidi*, in assenza di sostanze molto reattive forma gli *ozonidi*. [18]

### **1.3. Biochimica dell'ozono**

#### **Effetti sul metabolismo**

In quanto potente ossidante, l'ozono influenza il metabolismo a diversi livelli.

Accelerà l'utilizzo del glucosio da parte delle cellule per aumentata glicosi che aumenta la disponibilità di ATP nelle cellule e quindi nei tessuti, soprattutto quello nervoso; interviene nel metabolismo delle proteine per la sua affinità con i gruppi sulfidrilici, reagendo così con gli amminoacidi essenziali come la metionina e il triptofano oppure con la cisteina che contiene zolfo; reazione diretta con gli acidi grassi insaturi che vengono trasformati in composti idrosolubili. [7]

### **1.4. Interazione dell'ozono con i microrganismi**

Murray nel 1997 sostenne che l'attacco dell'ozono agli strati superficiali dei batteri gram negativi e positivi sia localizzabile alla matrice lipoproteica liposaccaridici con conseguente rottura e permeabilizzazione della membrana cellulare con lisi finale della cellula.

L'ozono agisce anche sui componenti intracellulari degradando le lipoproteine cellulari, con conseguente denaturazione dei vari enzimi e ossidando i gruppi sulfidrilici cellulari (SH), riducendo in misura notevole la loro capacità nel degradare gli zuccheri e nel produrre gas. La morte del batterio viene attribuita ai cambiamenti di permeabilità cellulare seguita da lisi. Tuttavia la lisi cellulare non è la causa principale ma il risultato di un'azione violenta e prolungata di ossidazione a livello gassoso e liquido.

Esperimenti di laboratorio, svolti da Scott nel 1975, hanno dato chiara evidenza delle modalità di attacco dell'ozono alle sostanze nucleiche dell'*Escherichia Coli*. Relativamente alla *Legionella pneumophila*, una serie di esperimenti hanno dimostrato che con una concentrazione di ozono pari a 0,21 mg/l, con un tempo di contatto di 5 minuti, l'inattivazione ottenuta è superiore al 99%, indipendentemente dalla temperatura e dal pH dell'acqua.

Agisce anche danneggiando il materiale genetico.

Questo meccanismo è sostanzialmente identico per batteri, virus e spore.

Furono testate culture batteriologiche (*E. coli*, *Salmonella sp.*, *Sthayilococcus aureus* *aureus* e *Bacillus subtilis*) con una diluizione da  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  cfu/ml, sono state esposte all'ozono a diversi intervalli (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 minuti).

La vitalità delle cellule alle concentrazioni di  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  cfu/ml fu osservata dopo 30 minuti di esposizione all'ozono.

Le matrici ultrastrutturali mostravano una deformazione, profonda rottura dopo 90 minuti e una superficie collassata dopo 60 minuti di trattamento con ozono.

Questo studio supporta l'idea che il meccanismo di inattivazione dei batteri con ozono è causato dalla distruzione della membrana della cellula con reazione finale di lisi.

Con le dovute precauzioni l'ozono può essere usato per combattere la carica microbica in acqua. [14]

Per quanto riguarda i virus, il primo luogo di azione dell'ozono e' sempre il rivestimento proteico reagendo con le proteine che lo compongono secondo gli esperimenti di Reisser, nel 1976.

L'ozono modifica il rivestimento usato dal virus per attaccarsi alle superfici cellulari ed attacca le proteine del virus scomponendo l'acido ribonucleico (RNA) in diverse parti. Nel 1982 secondo Sproul, l'ozono agisce anche sul DNA del virus, liberando gli acidi nucleici che lo compongono.

Tuttavia studi recenti sul virus del tabacco, svolti da Shrinriki nel 1988, hanno dimostrato che l'ozono agisce contemporaneamente sulle proteine che costituiscono il rivestimento dell'RNA e sull'RNA stesso diminuendone la quantità .Il virus perde le sue capacità infettive a causa dell'alterazione profonda del suo rivestimento.

Nei confronti dei miceti, invece, il potere disinsettante si basa sull'alterazione degli enzimi della membrana citoplasmatica con inibizione della sintesi dell'ergosterolo.

Per le spore esami di laboratorio condotti da Rickloff nel 1987 hanno dimostrato che un tasso di concentrazione di ozono pari a 10 mg/l, con un tempo di 10 minuti, portano ad un'inattivazione superiore al 99% di *Bacillus* e *Clostridium*.

L'ozono è molto efficace contro **microrganismi patogeni** quali:

- *Bacillus cereus* (e relative spore)
- *Legionella pneumophila*
- *Mycobacterium fortuitum*
- *Pseudomonas fluorescens*

- *Staphylococcus aureus*
- *Coxsackie virus*
- *Enteric virus*
- *Virus Epatite A*
- *Rotavirus*
- *Poliovirus tipo1*

contro **funghi** quali:

- *Candida parapsilosis*
- *Candida tropicalis* [16]

Gli studi condotti sull'uso dell'ozono come agente conservante degli alimenti, con i dosaggi adeguati, dimostrano un prolungamento della shelf - life dei prodotti, senza cambiamenti della qualità sensoriale e senza produzione di composti tossici nell'ambiente.

Inoltre è stato dimostrato che l'ozono ha azione detossificante sulle micotossine e pesticidi presenti in alcuni prodotti e riduce la formazione di trimetilamina nei pesci. I forti poteri di demolizione ossidativa del gas dissolto in acqua e dei radicali liberi idrossilici rendono dunque l'ozono battericida, sporicida, virocida, fungicida e protozoocida, in tempi più brevi ed in concentrazioni minori di quelle necessarie perché il cloro abbia la stessa attività e con un meccanismo che è ben lontano da quelli che rendono possibile e frequente l'insorgenza di resistenza microbica agli antibiotici. Il suo potenziale di ossidazione (redox) è inferiore solamente a quello del fluoro.

L'effetto dell'Ozono sui microorganismi è influenzato da vari fattori tra i quali:

- **TEMPERATURA:** i dati riportati in letteratura sono variabili e riferibili a particolari microorganismi;
- **pH:** la stabilità dell'Ozono aumenta con il diminuire del pH;
- **UMIDITA':** i microorganismi sono più sensibili in ambiente con elevata umidità;
- **SUBSTRATO:** la presenza di materiale organico diminuisce l'azione dell'Ozono in seguito ad un legame con esso;

- AGGREGAZIONI MICROBICHE: la presenza di ammassi microbici permette una maggiore sopravivenza degli stessi.

Tabella n.1: Tempi indicativi morte microrganismi. [24]

| MUFFE                  | MINUTI / SECONDI     |
|------------------------|----------------------|
| <i>Oospora lactis</i>  | 18 secondi           |
| <i>P. roqueforti</i>   | 45 secondi           |
| <i>P. expansum</i>     | 36 secondi           |
| <i>A. glaucus</i>      | 2 minuti- 26 secondi |
| <i>A. flavus</i>       | 2 minuti- 45 secondi |
| <i>Mucor racemosus</i> | 58 secondi           |

| LIEVITI                           | MINUTI / SECONDI |
|-----------------------------------|------------------|
| <i>Saccharomyces ellipsoideus</i> | 22 secondi       |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   | 22 secondi       |
| <i>Saccharomyces spp.</i>         | 29 secondi       |

| VIRUS                         | MINUTI / SECONDI      |
|-------------------------------|-----------------------|
| Batteriofagi                  | 10 secondi            |
| Virus del mosaico del tabacco | 12 minuti- 15 secondi |
| Virus di Ebola                | 20 minuti             |

| BATTERI                   | MINUTI / SECONDI |
|---------------------------|------------------|
| <i>Spore di bacilli</i>   | 36 secondi       |
| <i>Staphylococcus spp</i> | 10 secondi       |
| <i>Shigella spp.</i>      | 1 minuto         |
| <i>Legionella spp.</i>    | 19 minuti        |
| <i>L. monocytogenes</i>   | 11 secondi       |
| <i>S. lactis</i>          | 14 secondi       |

### 1.5. Efficacia dell'azione disinettante dell'ozono - Confronto con altri disinettanti

L'ozono è un disinettante molto potente. La tabella 1 confronta i valori Ct (concentrazione \* tempo) di vari disinettanti per la disattivazione dei virus. Sebbene il cloro sia molto adatto alla disattivazione di batteri e virus, non può essere usato per disattivare i protozoi.

La tabella 2 mostra il tasso di disinfezione per le cisti di Giardia. In tale tabella si può vedere che il cloro e le clorammine hanno valori Ct più bassi. Ciò significa che l'ozono è un disinettante più potente per disattivare questo microorganismo. I protozoi Criptosporidio sono difficilmente disattivati dal cloro e dalle clorammine. Il valore Ct per la disattivazione del cloro varia fra 3000 e 4000 mg min/L per disattivazione 1 - log (= disattivazione del 90%).

Tabella n. 2: Valori - Ct per la disattivazione dei virus da parte di vari disinettanti.  
[25]

| Disinfectant                  | Units                  | Inactivation |       |               |
|-------------------------------|------------------------|--------------|-------|---------------|
|                               |                        | 2-log        | 3-log | 4-log         |
| Chlorine <sup>1</sup>         | mg · min/L             | 3            | 4     | 6             |
| Chloramine <sup>2</sup>       | mg · min/L             | 643          | 1,067 | 1,491         |
| Chlorine Dioxide <sup>3</sup> | mg · min/L             | 4.2          | 12.8  | 25.1          |
| Ozone                         | mg · min/L             | 0.5          | 0.8   | 1.0           |
| UV                            | mW · s/cm <sup>2</sup> | 21           | 36    | not available |

CT values were obtained from AWWA, 1991.

<sup>1</sup> Values are based on a temperature of 10°C, pH range of 6 to 9, and a free chlorine residual of 0.2 to 0.5 mg/L.

<sup>2</sup> Values are based on a temperature of 10°C and a pH of 8.

<sup>3</sup> Values are based on a temperature of 10°C and a pH range of 6 to 9.

Tabella n. 3: Valori Ct per la disattivazione della ciste di Giardia da parte di vari disinfettanti.[25]

| Disinfectant                  | Inactivation (mg · min/L) |       |         |       |         |       |
|-------------------------------|---------------------------|-------|---------|-------|---------|-------|
|                               | 0.5-log                   | 1-log | 1.5-log | 2-log | 2.5-log | 3-log |
| Chlorine <sup>1</sup>         | 17                        | 35    | 52      | 69    | 87      | 104   |
| Chloramine <sup>2</sup>       | 310                       | 615   | 930     | 1,230 | 1,540   | 1,850 |
| Chlorine Dioxide <sup>3</sup> | 4                         | 7.7   | 12      | 15    | 19      | 23    |
| Ozone <sup>3</sup>            | 0.23                      | 0.48  | 0.72    | 0.95  | 1.2     | 1.43  |

CT values were obtained from AWWA, 1991.

<sup>1</sup> Values are based on a free chlorine residual less than or equal to 0.4 mg/L, temperature of 10°C, and a pH of 7.

<sup>2</sup> Values are based on a temperature of 10°C and a pH in the range of 6 to 9.

<sup>3</sup> Values are based on a temperature of 10°C and a pH of 6 to 9.

Sebbene la solubilità dell'ozono diminuisce quando aumenta la temperatura, il tasso di disinfezione aumenta ogni 10°C (fattore 2 o 3). All'interno della gamma di 0 - 30°C, questi due fattori diminuiscono uno rispetto all'altro. Il tasso di disinfezione dell'ozono varia leggermente in un range di pH di 6 – 8,5. Per certi microorganismi resistenti (come *Giardia Muris*), il tasso di disinfezione aumenta a pH più elevato. Per le altre specie di microorganismi avviene il contrario.

Altri vantaggi derivanti dall'applicazione dell'ozono sono:

- Nessun sapore e odore residuo dopo il trattamento;
- Minima formazione del sottoprodotto di disinfezione (soprattutto quando il bromo è assente);
- L'ozono può rimuovere i precursori del sottoprodotto di disinfezione (sostanze che introducono la formazione dei sottoprodotti di disinfezione).

## 1.6. L'ozono e l'uomo

Una limitazione dell'uso dell'Ozono nella conservazione degli alimenti consiste nella sua tossicità, perché è un gas irritante le mucose e a livelli elevati (1000 mg/l.) può risultare mortale.

Possono manifestarsi vari sintomi quali:

Tabella n. 4: effetti causati dall'ozono in ambito tissutale polmonare ed extra - polmonare. [26]

| Danni polmonari  | Danni extrapolmonari  |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"><li>- Flogosi delle vie aeree</li><li>- Flogosi polmonare</li><li>- Edema polmonare</li><li>- Rottura di lisosomi</li><li>- Alterazioni strutturali delle cellule epiteliali cigliaate</li><li>- Fibrosi polmonare</li></ul> | <ul style="list-style-type: none"><li>- Paratiroidite</li><li>- Aumento o diminuzione fagocitosi dei polimorfonucleati</li><li>- Minore o maggiore resistenza all'emolisi</li><li>- Debole effetto mutageno nei leucociti .</li></ul> |

I limiti sono di 0,06 ppm per otto ore al giorno per cinque giorni a settimana o 0,3 ppm per al massimo 15 minuti.

Tabella n.5: Effetti tossici dell'ozono espressi in ppm. [Decreto Legislativo n°183 del 21 maggio del 2004]

|                 |  |
|-----------------|--|
| 0,01 ~ 0,02 ppm | Si classifica solo come odore  |
| 0,1 ppm         | Odore molto intenso in alcune persone forte ed offensivo – provoca irritazioni al naso e all'esofago |

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| 0,2 ~ 0,5 ppm               | Se l'esposizione è prolungata oltre le 3 ore produce problemi alla vista anche irreversibili   |
| 0,5 ppm                     | Evidenti irritazioni del tratto respiratorio superiore   |
| 1 ~ 2 ppm                   | Attenzione: 2 sole ore di esposizione provocano emicrania, cefalea, mal di testa, dolori al torace, e gravi problemi al tratto respiratorio superiore, sete incontrollata, raffreddore. Ripetute esposizioni a questi livelli sono causa di intossicazione cronica |
| 5 ~ 10 ppm                  | Aumento frequenza cardiaca, edema polmonare  |
| 15 ~ 50 ppm                 | Gli animali di piccola taglia muoiono entro 2 ore dall'inizio dell'esposizione   |
| 50 Effetto fatale sull'uomo | La morte sopraggiunge entro 1 ora dall'inizio dell'esposizione   |

### Ricapitolando:

- Limite in ambiente chiuso 0,05 ppm così come indicato dalle norme sanitarie;
- Limite ambientale 0,1 ppm massimo, altrimenti poi diventa SMOG;
- Vita media dell'ozono: in soli 15/20 minuti a temperatura ambiente di 25°C. degrada quasi del tutto in ossigeno;
- A temperatura di 350°C. si degrada in 3 secondi;
- A temperatura di 500°C. si degrada in 1 secondo.

## 1.7. La disinfezione

Non lasciando alcun residuo chimico, l'Ozono è assolutamente ecologico. A riprova di ciò, l'Ozono è stato definito come un agente sicuro “GRAS” dall'Ente statunitense Food and Drug Administration (F.D.A.). Nel Luglio 1996 con Protocollo n. 24482, il Ministero della Sanità ha riconosciuto l'ozono come “PRESIDIO NATURALE PER LA STERILIZZAZIONE DI AMBIENTI”. La sua potente azione disinfettante, ad ampio spettro d'azione, viene utilizzata nella disinfezione delle acque e delle superfici, nella depurazione dell'aria e degli ambienti, nonché nella bonifica e decontaminazione dei terreni.

Molti studi hanno inoltre dimostrato che l'ozono è più efficace del cloro nell'eliminazione di alcuni virus che trovano grande vitalità nelle acque potabili

(come ad esempio il virus EBOLA). Per questo motivo l'ozono è largamente usato anche nell'igienizzazione delle piscine (dal 1984 tutte le piscine di nuoto dei Giochi Olimpici devono essere purificate con Ozono) dove induce un risparmio dell'80% di cloro, una riduzione del reintegro dell'acqua e non necessita di alcun intervento di personale in quanto l'impianto è automatizzato.

L'ozonizzazione delle piscine inoltre rende l'acqua più cristallina (in quanto riduce la concentrazione dei trialometani) e più filtrabile (rompendo le grosse molecole organiche).

In molte nazioni europee, ma anche in Canada, le acque reflue sono chiarificate con l'utilizzo dell'Ozono. Il vantaggio dell'ozono sui prodotti che sviluppano cloro libero, utilizzati spesso per la potabilizzazione dell'acqua, è che il primo sterilizza nettamente meglio sia nei confronti dei batteri che dei virus inoltre l'ozono non altera le caratteristiche dell'acqua, in particolare il sapore (Viebahn, 1977), e genera una minore quantità di sottoprodotti dannosi. [17]

## **1.8. Applicazioni dell'ozono nell'industria alimentare**

Viene di seguito riportata una sintesi delle applicazioni dell'ozono per la sanificazione degli alimenti.

### CARNE:

Kaess e collaboratori (1972) hanno trattato carne con ozono gassoso ad una concentrazione superiore a 2 µg/litro ottenendo un importante riduzione dei batteri alteranti (per esempio *Pseudomonas spp.*) e il colorito della carne trattata con meno di 0,6 µg/litro di ozono, non differiva dalla carne di controllo. [27]

Sempre Kaess e collaboratori (1973), usando contemporaneamente raggi UV (0,2 W/cm<sup>2</sup>) e ozono (0,5 µg/litro) hanno verificato un effetto sinergico inibitorio anche nei confronti delle muffe *Thannidium spp.* e *Penicillius spp.* [28]

Billion invece (1978), ha evidenziato l'effetto di una sensibile diminuzione in superficie dei germi aerobi mesofili e degli anaerobi solfito riduttori, dopo trattamenti con l'ozono, migliorando e prolungando la vita commerciale del prodotto. Kolodyarnaya (1975) verificò che trattando carne di bovino con l'ozono a concentrazioni di 10-20 µg/litro e conservandola a 0,4 °C con 85-90% di UR, inibiva la crescita microbica aumentandone la vita commerciale del 20-30%.

Rusch (1989) utilizzò l'ozono per inibire i microrganismi della carne conservata all'aria con una temperatura di 2,5-6 °C con UR del 92-95%. Questo trattamento all'inizio arrestò lo sviluppo delle Enterobacteriacee ma non quello delle *Pseudomonas spp.*, successivamente quando le carcasse vennero trattate ininterrottamente per nove giorni con 0,03 ppm a 1,6 °C con UR al 95%, si verificò la diminuzione dello sviluppo batterico sulla superficie. Tuttavia il trattamento risultava efficace solo con tagli di carne di grande dimensione. [29]

Dondo (1992) sperimentò l'impiego dell'ozono nella carne bovina refrigerata e verificò che l'ozono arrestava lo sviluppo batterico superficiale per vari giorni, ne migliorava le qualità sensoriali e diminuiva la formazione di composti azotati volatili. [30]

Horwarth (1985) scoprì che in presenza di ozono la crescita dei microrganismi, sulla superficie della carne, diminuiva in condizioni di refrigerazione, ma verificò anche che non c'era miglioramento in caso di pesante contaminazione della carne.

Jakschi (2004) invece, sperimentando l'effetto dell'ozono sulla contaminazione batterica della carne suina , non ebbe risultati positivi.

Lo speck è un prodotto tipico stagionato del nord - est Italia. La caratteristica presenza in superficie di muffe e il suo elevato contenuto proteico e lipidico rendono questo prodotto facilmente aggredibile da forme infestanti. Le condizioni ambientali (umidità e temperatura) richieste per la maturazione e la conservazione del prodotto ne permettono una crescita ottimale.

Le infestazioni da acari possono diventare un problema per le industrie sia per i danni diretti sul prodotto sia per il lavoro dispendioso lavoro di toelettatura.

Il controllo delle infestazioni da acari spesso avviene con l'utilizzo di prodotti chimici.

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di testare l'efficacia dell'ozono come possibile soluzione alle infestazioni da acari su prodotti carni stagionati.

Tutti gli stabilimenti presentavano massive infestazioni da acari nelle sale di stagionatura a partire dal terzo mese. *Tyrophagus putrescentiae* e *T. longior* erano le specie predominanti.

Il trattamento con ozono gassoso alle concentrazioni di 0,4 ppm avveniva per 8 ore al giorno per un periodo di 15 giorni.

In tutti gli stabilimenti si è osservato un graduale diminuzione delle forme infestanti con totale eliminazione dopo un periodo di 15 giorni a un mese.

Il trattamento è stato interrotto una settimana dopo la scomparsa degli acari dalla superficie dello speck. Le muffe caratteristiche sono ricomparse dopo un mese circa dalla sospensione del trattamento.

Il gas non ha mostrato alcun effetto ossidativo nei confronti del prodotto.

Valutando i risultati, l'ozono può essere un metodo alternativo per il controllo delle infestazioni da acari. [22]

#### **POLLAME E DERIVATI:**

L'ozono è stato usato anche per la disinfezione di incubatoi, uova incubate, carcasse di pollo, uova contaminate e acque di refrigerazione del pollame.

Sheldon (1986) valutò l'effetto dell'ozono sulla qualità dell'acqua di raffreddamento della vasca e delle carcasse di pollo in essa immerse. Le carcasse raffreddate in acqua potabile contenente ozono a 3,0 - 4,5 ppm per 45 minuti, presentavano conte microbiche più basse durante la loro conservazione rispetto a quelle non trattate.

Whistler (1989) effettuò delle prove sui contaminanti naturali di uova incubate. Le conte totali batteriche diminuirono notevolmente sui gusci delle uova trattate con acqua e ozono per due ore (l'ozono nella miscela dei gas era il 2,83% p/p). [31]

In un altro esperimento Kim (1991), usò ozono per distruggere i microrganismi presenti sulla carne di pollo, utilizzando una miscela di gas contenete ozono fluente in quantità di 1:500 ppm/minuti. Dopo 50 minuti vennero inattivati tutti i contaminanti microbici.

Al-Haddad (2005) non ha avuto risultati positivi dopo aver trattato carcasse di pollo con acqua ozonizzata o con ozono gassoso cercando di inibire *S. infantis* e *Ps.aeruginosa*.

Raduvskaya(1978) ha valutato la qualità e le caratteristiche organolettiche delle uova dopo ozonizzazione. Furono trattate con ozono gassoso (10-12 µg/litro d'aria) per sei ore e conservate ad una temperatura di -1°C per sei mesi con 86% di UR e a 29°C con 75%UR. Tutti i parametri quali: qualità sensoriali, cambi di acidità, perossidi e valori di acido tiobarbiturico del rosso d'uovo, presentavano valori migliori rispetto alle uova che non erano state trattate con l'ozono. [32]

### PESCE:

Per quanto riguarda il pesce è stato evidenziato che trattando l'ambiente con ozono gassoso per 4-6 minuti, vengono eliminati gli odori della pescheria.

Sono stati effettuati esperimenti anche su pesci come *Trachurus trachurus* e su *Caranx mertensi*. Immersendoli per 30-60 minuti in una soluzione con 0,6 ppm di ozono e 3% di Nacl si è verificato un prolungamento della vita commerciale del prodotto anche del 20 - 60%. [33]

### ALIMENTI SECCHI:

Nei grani dei cereali, nei piselli, fagioli e spezie sono molto presenti batteri quali *Bacillus spp.* e *Micrococcaceae*.

Dopo alcuni esperimenti Naitoh è stato dimostrato che trattando per 1 - 6 ore con 0,5-50 mg/ litro di ozono grani di cereali, farine di cereali, fagioli, piselli e spezie si ha una intesa attività microbicida. [34]

Sempre con piselli, fagioli e grani se trattati con 40 mg/litro di ozono si ha un miglioramento dei caratteri organolettici.

Nel caso di pepe bianco, cipolle e aglio si ha una riduzione di batteri e muffe se trattati con 5 - 20 ppm per 30 secondi o con 6,7 mg/litro per sei ore. [35]

### FRUTTA E VERDURA:

nel caso delle cipolle e patate, dopo trattamento con ozono 8 ore x 5 giorni, si è riscontrato una diminuzione della chemilusenza, diminuzione della attività catalasica, una inibizione di germi deterioranti e attività perossidasica. [36]

Trattando la lattuga con ozono gassoso nel Kim (1998) notò una distruzione dei batteri e muffe.

Sempre Kim (1993) con un trattamento di 60 minuti con 6 mg/litro di ozono, si è verificato una eliminazione dell'80 - 90% della popolazione batterica e un miglioramento dei caratteri organolettici nelle spezie. [37]

Nelle carote contaminate da *Botrytis cinerea* e *Sclerotinia sclerotiorum* dopo trattamento con 0,5 mg/litro/minuto per 8 ore al giorno per 28 giorni, Law e collaboratori nel 1994, come effetto finale ottennero un miglioramento dell'aspetto esteriore e una diminuzione dello sviluppo dei due funghi.

Il caffè fermentato è ottenuto rimuovendo la mucillagine attraverso la fermentazione. L'ozono e gli ultrasuoni sono usati in varie aree con grande flessibilità e risultati promettenti nei vari prodotti. Le potenzialità antimicrobiche e antiossidante di entrambi sono ben conosciuti, ma non sono ancora certi i meccanismi quando sono usati su materiale vivo. L'ozono e gli ultrasuoni sono stati applicati nella fase di pre-trattamento prima della fase di fermentazione del caffè aumentandone la sicurezza alimentare senza cambiamenti percettibili nella qualità della bevanda. [10]

Ci sono poche informazioni per ridurre i microrganismi nei datteri. In questo studio l'ozono viene applicato in forma gassosa con tre diverse concentrazioni (1, 3, 5 ppm) per quattro periodi di tempo (15, 30, 45, 60 minuti) sui frutti e la riduzione della conta batterica totale dove sono stati osservati coliformi, *staphylococcus aureus*, muffe e lieviti. I risultati dimostrarono l'efficacia dell'ozono a ridurre la popolazione microbica nei frutti. Non si sono trovati *E.coli* e *S.aureus* sulle piastre inoculate con campioni trattati con 5 ppm per 60 minuti. [11]

Nel 1997 Frange, per quanto riguarda patate, cipolle e barbabietole, dopo trattamento con 3 mg/litro di ozono, con una temperatura di 6 - 14°C e UR al 93 - 97 % riscontrò una bassa carica batterica e nessuna alterazione organolettica.

#### FORMAGGIO:

concentrazioni di ozono da 0,1 a 10 µg/litro nell'atmosfera della sala di stagionatura, inattivano dal 80 al 99% le spore delle muffe, senza modificare la qualità sensoriale del formaggio.

Vari tipi di formaggio vennero conservati a 2 - 4°C con 85 - 90% di umidità con ozono presente nell'atmosfera della sala di conservazione.

Le ricerche dimostrarono che la periodica ozonizzazione per meno di 4 ore ogni 2-3 giorni intervallati con concentrazione di ozono da 5 - 7 µg/litro presenti nell'aria, preveniva la formazione di muffe nel formaggio e nei materiali di confezionamento per almeno quattro mesi senza effetti avversi nelle proprietà chimiche e sensoriali del formaggio.

Horvath notò che la durata della conservazione del formaggio aumentava a 11 settimane con l'impiego dell'ozono a basse concentrazioni (0,02 mg/litro) durante la stagionatura.

Altri esperimenti condotti sul formaggio Cheddar indicarono che l'azione ossidante dell'ozono rimuove gli odori presenti nella sale di stoccaggio.

Shiler il metodo dell'ozonizzazione per prevenire le contaminazioni nei materiali di confezionamento del formaggio e per migliorare l'igiene. Per ottenere i migliori risultati l'ozono veniva emanato con concentrazione di 0,008 a 0,1 µg/litro per 1 - 3 ore al giorno con intervalli da 2 - 12 ore e dopo 10 o 30 giorni le forme venivano trattate con concentrazioni di ozono di 8 - 12 µg/litro per 2 - 4 ore.[6]

### **1.9. Altri impieghi dell'ozono**

L'ozono è anche impiegato per la neutralizzazione dei gas di scarico industriali contenenti solfati che sono molti sensibili all'ozono. Altre applicazioni industriali dell'ozono sono nell'ambito della ceramica, della microbiologia, nell'ossidazione dei materiali organici di sintesi, nella farmacia, nella raffinazione dello zucchero e della carta come decolorante, nella disinfezione di recipienti in vetro, ecc. L'uso dell'ozono in medicina è dettato da due considerazioni generali, una basata sul fatto che l'ozono ha effetti diretti e indiretti sul metabolismo e l'altra sul fatto che ha effetti biologici, con azione germicida e disinsettante, cicatrizzante, miglioramento della circolazione (riduzione viscosità ematica).

### **1.10. Microrganismi del formaggio causa di difetti**

Il formaggio contiene un numero più o meno elevato di microorganismi. Il latte rappresenta la prima fonte di contaminazione dei formaggi, un ulteriore momento di contaminazione si verifica al momento dell'aggiunta del caglio, il cui contenuto microbico è sempre molto elevato. Altre fonti di contaminazione sono riconducibili all'acqua, all'aria, ai recipienti e utensili e anche dall'uomo.

I microorganismi che possono rinvenirsi nel formaggio appartengono a svariate specie alcuni utili e altri dannosi.

Tra i microorganismi indesiderati in quanto sempre causa di fatti alterativi e che compongono la cosiddetta flora anticasaria, possiamo ricordare:

- Coli-aerogenes: che determina una cagliata spugnosa e di occhiature in

seguito alla produzione di gas. Sono i responsabili del così detto *gonfiore precoce*. In genere la loro presenza è limitata nel tempo (10 - 14 giorni) in quanto sensibili all'azione del pH.

- Sporigeni anaerobi: determinano la comparsa di fenomeni tardivi, in quanto nel primo periodo della maturazione del formaggio il loro sviluppo è ostacolato dall'ambiente acido. Sono i responsabili del *gonfiore tardivo* caratterizzato da occhiature irregolari emananti odori e sapore anomalo.
- Lieviti: il loro sviluppo, in particolare delle specie produttrici di gas, può determinare in certi tipi di formaggi la comparsa di occhiature. Anche i lieviti sono responsabili del gonfiore precoce.
- Muffe: in alcuni casi possono rappresentare un rischio, giacchè alcune muffe possono produrre micotossine, in altri invece possono risultare utili.

In base al ruolo svolto dalle muffe sul processo di maturazione dei formaggi, queste possono essere suddivise in tre categorie:

- a) Formaggi nei quali le muffe non intervengono durante la stagionatura
  - b) Formaggi la cui stagionatura viene assicurata dallo sviluppo di una sola specie fungina come nel caso di formaggi erborinati a pasta molle.
  - c) Formaggi per i quali vari generi di muffe intervengono durante la stagionatura per dare al prodotto un aspetto ed un gusto caratteristici.
- Stafilococchi: solitamente presenti nel latte di massa e che possono contaminare la cagliata, specie se le condizioni igieniche, in particolare del personale, non sono adeguate.

## 1.11. I Funghi

Le caratteristiche chimiche e chimico-fisiche degli alimenti sono tali da permettere la colonizzazione e lo sviluppo di un gran numero di microrganismi. Comunque, non tutti i gruppi di microrganismi che contaminano o che sono veicolati dagli alimenti hanno lo stesso impatto nella loro produzione, conservazione e consumo.

Sicuramente ai batteri spetta il ruolo più importante, sia come microrganismi utili che come patogeni e alteranti. Anche lieviti e muffe occupano un posto di rilievo, mentre virus, alghe e protozoi hanno un minore impatto. Batteri, lieviti e muffe svolgono ruoli diversi negli alimenti, dove sono in grado di moltiplicarsi. I virus non sono in grado di moltiplicarsi negli alimenti, pur potendo sopravvivere per lunghi periodi come particelle infettive.

Dunque, gli alimenti, rappresentano un veicolo importante di trasmissione dei virus. L'associazione dei virus con i processi produttivi degli alimenti è legata alla loro capacità di determinare severe e importanti malattie nell'uomo. Inoltre, i batterofagi (virus che hanno come ospite un batterio), determinano spesso il fallimento delle fermentazioni nella produzione di prodotti lattiero - caseari.

Inoltre è noto che la stagionatura del formaggio avviene in ambienti generalmente umidi, dove la presenza di muffe di varia natura è una costante.

I funghi comprendono un gran, eterogeneo e ubiquitario gruppo di organismi eterotrofi che vivono come parassiti o saprofiti o in associazione con altri organismi come simbionti.

La loro principale caratteristica distintiva è la struttura vegetativa filamentosa nota col nome di MICELIO. Esso consiste in un sistema di cellule riunite in lunghi filamenti chiamati IFE. L'ifa può essere vegetativa o riproduttiva. Le prime servono ad ancorare la muffa al substrato nutritivo e a prelevare da esso acqua, sali minerali e sostanze organiche necessarie alla loro alimentazione. Nel secondo caso permettono la riproduzione delle muffe, l'ifa si estende nell'aria e produce esospore libere (conidi) o in corpi fruttiferi (sporangi).

Il materiale nutritivo è assorbito dall'intera superficie del micelio e questo rappresenta un sistema molto efficiente per sfruttare le risorse del substrato. [9]

Ci sono dei funghi che non rientrano della descrizione perché sono unicellulari è il caso dei lieviti.

Nei lieviti il Tallo, cioè il corpo del fungo, non è rappresentato dal complesso del micelio, bensì dalle singole cellule.

Le ife fungine possono essere SETTATE (segmento ifale che consiste di una catena di cellule separate dalla parete cellulare, setti) o NON SETTATE( ifa multicellulare dove le singole cellule non risultano completamente separate tra loro), importanti per la loro classificazione.

In generale, la spora germina producendo l'ifa che cresce e si ramifica nella struttura complessa che rappresenta il micelio. A sua volta il micelio, a seconda del tipo di muffa e delle condizioni ambientali, produce le strutture riproduttive che a loro volta producono le spore sessuate e/o asessuate. Non sono mobili e la parete cellulare è costituita da chitina. [12]

Alcuni funghi possono liberare sostanze tossiche dette TOSSINE ( mico - tossine) che possono recare danni più o meno gravi a chi le ingerisce.

## 1.12 Le muffe

Il termine muffa sta ad indicare dei funghi sviluppati a colonia o diffusamente su alimenti o manufatti di varia natura senza formazione di grandi corpi fruttiferi. [12] Umidità dell'ambiente e muffe sono strettamente collegate in quanto la muffa attecchisce molto bene dove c'è presenza di acqua. [19]

.Le muffe sono largamente distribuite nell'ambiente e sono di grande interesse per il settore alimentare. La maggior parte di esse sono causa di alterazione di molti prodotti sia di origine vegetale che animale; altre sono importanti per la produzione e maturazione di alcuni formaggi e insaccati carni fermentati. Nei prodotti fermentati dell'industria lattiero-casearia la presenza dei miceti si accompagna invariabilmente ad un aumento del pH (minore acidità), dovuto alla produzione di ammine ed amminoacidi (tendenzialmente alcalini), per demolizione delle proteine presenti, ed al consumo per via ossidativa dell'acido lattico. Generalmente, è importante impedire lo sviluppo delle muffe nei caseifici; esistono però alcune importanti eccezioni a questa regola, vale a dire i processi di produzione dei formaggi a maturazione fungina. Sebbene esistano in commercio numerosi formaggi maturati mediante l'intervento delle muffe, essi possono essere raggruppati in due sole principali categorie: i formaggi erborinati, tipo Gorgonzola, ed i formaggi a crosta fiorita, tipo Camembert.

Ecco un semplice elenco delle principali specie di muffe :

- **Oomiceti:** *Phytophtora, Plasmopara;*
- **Zigomiceti:** *Mucor mucido, Mucor racemosus, Rhizopus stolonifer, Rhizopus nigricans, Rhizopus orysae, Thamnidium simplex, Thamnidium elegans;*

- **Ascomiceti:** *Byssoclamys fulva*, *Byssoclamys nivea*, *Eurotium amstelodami*, *Eurotium chevalieri*, *Neosartoria fischeri*;
- **Funghi imperfetti (Deuteromycota):** *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus parasiticus*, *Cladosporium erbarum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium avenaceum*, *Geotrichum candidum*, *Monilia fructigena*, *Penicillium expansus*, *Penicillium citrinum*, *Penicillium crysogenum*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti (glaucum)*, *Penicnalgiovense*.

#### **Esame visivo sulla superficie di un substrato:**

- Aspetto cotonoso: *Mucor*, *Rhizopus*, *Thamnidium*;
- Macchie nere: *Cladosporium herbarum* e *clorosporoides*;
- Macchie da giallo a verdi: *Penicillium spp.* ;
- Macchie bianche: *Sporotricum carnis*.

Si possono trovare in luoghi aventi determinati fattori che condizionano la loro crescita:

- presenza di umidità;
- bassa disponibilità di acqua;
- ampio range di pH;
- bassa temperatura;
- scarsa igiene durante la lavorazione;
- rottura della cagliata a grani troppo minuti;
- scarsa igiene ed umidità eccessiva dei locali di stagionatura;
- cagliata troppo asciutta;
- assi di stagionatura contaminati. [19]



Figura 2: esempio di piastra con colonie di muffe e muffe al microscopio [19]

### 1.13. I lieviti

Sono funghi prevalentemente unicellulari, l'aspetto consueto della forma vegetativa è una cellula rotonda o ovale, nettamente Gram positiva. La riproduzione assuata dei lieviti avviene attraverso gemmazione. L'attività fermentativa non è svolta da tutti i lieviti anzi sono piuttosto numerosi quelli dotati di sola attività respiratoria.

L' aspetto unicellulare si rinviene quando si sviluppano in condizioni normali di temperatura, aereazione, pressione ed umidità; in ambienti meno favorevoli, ad esempio quando c'è scarsità di ossigeno come negli strati più profondi dei terreni di cultura, i lieviti possono originare strutture specializzate chiamate pseudoife e clamidospore.

Le pseudoife si formano quando le gemme (cellule figlie) non si staccano dal corpo della madre, pur aumentando di volume e dando origine a sua volta a nuove gemme, si formano così una catena di cellule saldate le une le altre, che ricorda una ifa fungina.

Le clamidospore sono cellule rotondeggianti con una spessa parete ben visibile al microscopio, le quali sono direttamente impiantate sulle pseudoife; la loro funzione è quella di assicurare la persistenza del lievito anche in condizioni ambientali sfavorevoli. [2]

**Caratteristiche dei lieviti:**

La nutrizione: i lieviti possono moltiplicarsi se si trovano disciolti in :

1. composti del carbonio (quelli utilizzati dai lieviti sono: zuccheri a 6 atomi di carbonio, i polisaccaridi in particolare l'amido), l'acidolo acetico, l'acido

lattico, alcool etilico e metilico, i pentosi e gli idrocarburi.

2. Composti dell'azoto (ammoniaca, singoli amminoacidi o miscele di amminoacidi e i peptidi).
3. Altri elementi: sono necessari il fosforo, solfati, potassio, magnesio, calcio e altri elementi meno importanti.
4. Fattori di accrescimento: biotina, acido pantotenico, piridossina, tiamina, acido nicotinico, minositolo, variano poi in base alla specie.

Azioni dell'ossigeno: i lieviti mostrano due ben distinti comportamenti nei confronti dell'ossigeno.

1. Molti lieviti sono dotati esclusivamente di metabolismo aerobio privi di attività fermentativa
2. Molti lieviti sono dotati di attività respiratoria che di attività fermentativa. Le due attività si svolgono contemporaneamente.

Azione della temperatura e del pH: i lieviti sono organismi mesofili che trovano l'ottimo di temperatura a livello di 25 - 30°C. la temperatura massima di sviluppo non supera i 40°C salvo che per le specie del genere *Kluyveromyces* le quali tollerano valori superiori di qualche grado.

La temperatura minima si aggira attorno a 0 - 5°C

I lieviti sono organismi acidofili e prediligono valori di pH a livello 4 - 4,5. Il minimo di ph è inferiore a 3 e il massimo si aggira attorno a 7.

Azione delle concentrazioni zuccherine e saline: i lieviti tollerano bene concentrazioni zuccherine del 20 - 25% , al di sopra di questo valore l'aumento della pressione osmotica del mezzo provoca prima un rallentamento dello sviluppo, quindi il blocco, tranne per alcuni lieviti della specie *Zygosaccharomyces* e *Zygosaccharomyces rouxii* .

Le concentrazioni saline invece hanno effetti nettamente negativi nei confronti di quasi tutti i lieviti che sono organismi non alofili. [12]

#### **Fonti di contaminazione:**

- sistema di ventilazione;

- vie di comunicazione tra locali;
- scarichi;
- addetti alla produzione;
- superficie di adesione;
- lo stesso prodotto alimentare.

Anche i lieviti possono produrre tossine.

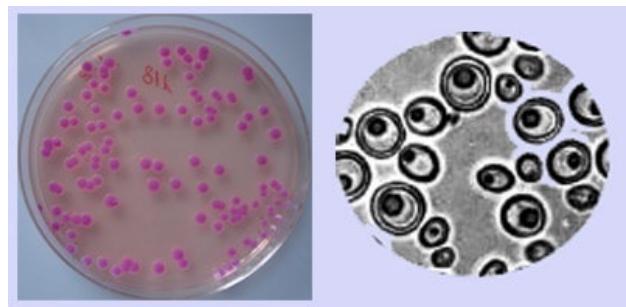


Figura 3: esempio di piastra con colonie di lieviti e lieviti al microscopio.[19]

## **2.0. LATTEBUSCHE**



Figura 4: sede Lattebusche di Belluno

Lattebusche è una cooperativa operante da oltre 50 anni nel settore lattiero caseario, con sede a Busche, nel Bellunese.

È una moderna struttura che rappresenta la maggiore concentrazione veneta nel settore lattiero-caseario. Nata nel 1954 grazie alla volontà di 36 soci, oggi Lattebusche raccoglie e lavora il latte dei 400 soci conferenti della cooperativa. Dislocata su 4 stabilimenti produttivi (Busche - Bl, Chioggia - Ve e Sandrigo - Vi, San Pietro in Gù - Pd), conta 200 dipendenti, 80 agenti, 10 depositi, 7 agenzie di distribuzione e 6 punti di vendita diretta (Bar Bianco).

Vengono lavorati giornalmente oltre 3.000 ettolitri di latte che danno vita ad un'ampia gamma di prodotti; dal latte fresco, allo yogurt, al gelato, fino ai formaggi, sia freschi che stagionati, il più noto dei quali è il Piave. Un'incisiva politica commerciale orientata al mercato ha inoltre permesso di allargare il campo di azione dell'azienda, che da semplice realtà locale è riuscita ad affermare la presenza del proprio marchio anche nelle altre regioni d'Italia e, con i formaggi stagionati, in tutto il mondo, con un fatturato annuale di oltre 80 milioni di euro.

## **2.1. Tracciabilità del latte come garanzia di qualità e sicurezza**

Con "tracciabilità" si intende la capacità di risalire lungo la filiera del latte, cioè il percorso che il latte compie dalle stalle di provenienza fino al consumatore finale; è importante conoscerla sia per chi produce il latte sia per chi lo compra in quanto si può sapere in ogni momento da quali allevamenti proviene, come è stato prodotto e in che tempi viene distribuito. La certificazione di filiera è un riconoscimento volontario, rilasciato da un organo certificatore esterno. Lattebusche ha ottenuto tale riconoscimento in quanto riesce a garantire in ogni momento al consumatore e all'ente di controllo l'informazione esatta su ogni elemento che entra a far parte della filiera del latte, per esempio l'alimentazione delle bovine, gli impianti di imbottigliamento e la distribuzione finale.

## **Sistema qualità**

Il costante impegno volto al miglioramento della materia prima, alla ricerca e allo sviluppo produttivo, assieme alla costante attenzione all'aggiornamento delle professionalità dei collaboratori interni ed esterni all'azienda, formalizzate in una vera e propria politica per la qualità, ha consentito di ottenere, nel novembre 1995, la Certificazione del Sistema di gestione per la Qualità UNI EN ISO 9002:94 per lo stabilimento di Busche, sede dell'azienda. Nel maggio 1997 lo stabilimento di Chioggia ottiene la certificazione del Sistema di gestione per la Qualità UNI EN ISO 9001:94. Dal novembre 2003 il CSQA, ente di valutazione italiano accreditato dal SINCERT, certifica il passaggio alle nuove norme UNI EN ISO 9001:00, conosciute come "Vision 2000", estese a tutti e tre gli stabilimenti Lattebusche, come risultato di un progetto che, iniziato nel 1991, ha visto coinvolti tutti i settori aziendali. La certificazione del sistema di gestione per la qualità UNI EN ISO 9001 riguarda l'intero ciclo di produzione che, nel caso di Lattebusche, inizia con la raccolta del latte crudo alla stalla e si conclude, dopo numerosi passaggi e attività, con la consegna del prodotto finito al punto vendita. Si tratta insomma di un obiettivo molto importante in relazione alle esigenze del mercato, perché rappresenta la garanzia di affidabilità dell'azienda che ne è titolare.

Nel luglio 2002 l'azienda ottiene la Certificazione del sistema di gestione ambientale UNI EN ISO 14001:96 per lo stabilimento di Busche. Un risultato che attesta l'impegno della nostra cooperativa nella salvaguardia dell'ambiente come risorsa primaria, uno dei punti di riferimento della missione aziendale. Nel 2005 Lattebusche ha ottenuto la conformità del Latte Fresco Intero Alta Qualità allo standard 10939:01, certificazione che garantisce la rintracciabilità del latte dalla fase di allevamento alla fase di consegna del prodotto finito ai punti vendita. Nel dicembre del 2006 lo stabilimento di Busche ha sostenuto la verifica CSQA per il rilascio dei due prestigiosi certificati internazionali, BRC e IFS. Gli Standard BRC (British Retail Consortium) e IFS (International Food Standards) hanno lo scopo di favorire l'efficace selezione dei fornitori, sulla base della loro capacità di fornire prodotti sicuri, conformi alle specifiche contrattuali e ai requisiti di legge, massimizzando i requisiti di sicurezza alimentare delle produzioni. Entrambi certificati sono stati ottenuti da Lattebusche con il massimo dei voti , BCR grade A e IFS higher level.

## 2.2. Stabilimento di Sandrigo (VI)



Figura 5: sede lattebusche di Sandrigo



Lo stabilimento di Sandrigo fa parte di Lattebusche dal 1993, anno in cui le cooperative S.Bovo di Dueville e Brega si sono fuse con Lattebusche. Nel corso degli anni altre cooperative locali si sono incorporate e attualmente costituisce lo stabilimento con maggior concentrazione di conferimento e lavorazione del latte di tutta l'area Vicentina.

Lo stabilimento di Sandrigo lavora annualmente oltre 250.000 ettolitri di latte bovino ed è adibito alla produzione dei formaggi DOP. Grana Padano e Asiago, prodotto nelle tipologie Allevo e Pressato. VI 625 è la sigla, marchiata sulle forme, che identifica l'appartenenza di Lattebusche al Consorzio di Tutela del Formaggio Grana Padano; VI 135 al Consorzio di Tutela dell'Asiago.

Alle classiche lavorazioni per la produzione dei formaggi d.o.p., dove la mano esperta dei casari è fondamentale, si affianca la moderna tecnologia del magazzino di stagionatura, nel quale le 35.000 forme di Grana Padano vengono periodicamente rivoltate e spazzolate mediante un sistema automatizzato.

## 2.3. Caratteristiche e tecnologie di produzione dell'Asiago

*Asiago pressato:* è un formaggio semicotto da tavola a latte intero di stagionatura non superiore ai 20 – 40 giorni, con forma cilindrica delle dimensioni di 30 – 40 cm. di diametro, 11 e 15 chilogrammi. La crosta è sottile e morbida, la pasta presenta occhiature e porta il sapore dolce del formaggio fresco poco stagionato. Il grasso minimo sulla sostanza secca è del 44%.

La tecnologia dell'asiago pressato può essere descritta nel

modo che segue. Viene utilizzato latte intero che si coagula a 35 – 36 °C previa aggiunta di coltura in siero di fermenti lattici. Il coagulo si forma in circa 30 minuti e la cagliata viene lavorata sino ad ottenere granuli della dimensione di un seme di mais.

Lo spуро del granulo si ottiene con l'agitazione e con l'innalzamento progressivo della temperatura sino al valore di 46 – 48 °C. La salatura del formaggio può essere effettuata a secco, o per aggiunta diretta di sale nella cagliata prima della messa negli stampi.

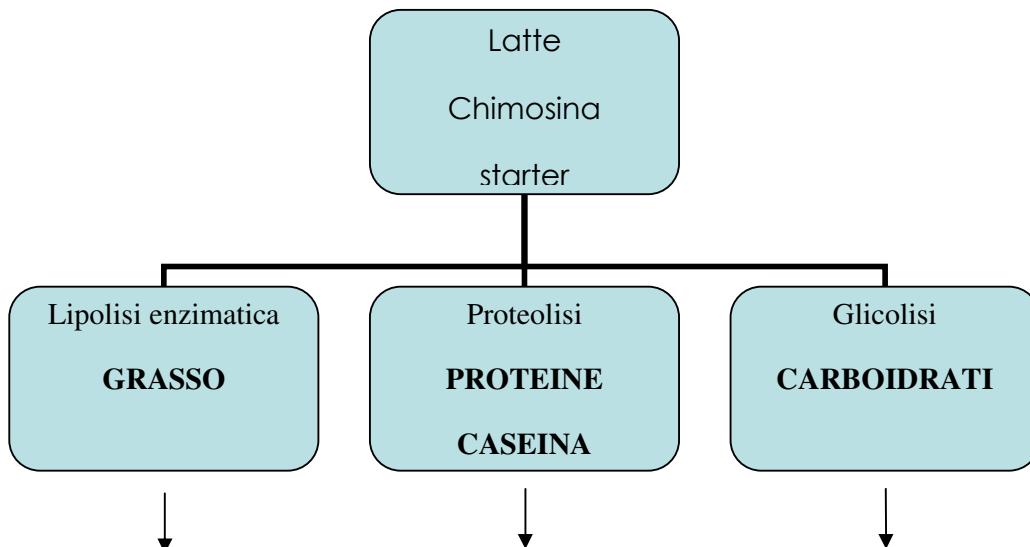
La stagionatura si prolunga per 20 – 30 giorni alla temperatura di 15 °C.

Forma di Asiago Pressato

## 2.4. Principali agenti che intervengono durante la stagionatura

- ENZIMI DEL LATTE: plasmina (proteasi termoresistente che attacca la caseina), lipoproteinlipasi (termolabile, importate nei formaggi con latte crudo).
- ENZIMI COAGULANTI
- COLTURE LATTICHE: LAB (sono proteolitici, ma poco lipolitici, raggiungono la carica massima dopo tre-quattro giorni di stagionatura, poi diminuiscono).
- COLTURE SECONDARIE: propionobatteri, schizomiceti, penicillium.

## 2.5. La maturazione del formaggio



|                     |                      |          |
|---------------------|----------------------|----------|
| Acidi grassi liberi | peptidi elevato p.m. | lattosio |
| Metil-chetoni       | peptidi basso p.m.   |          |
| chetoni             | aminoacidi           |          |
| alcoli              |                      |          |
| lattoni             |                      |          |

## **2.6. Trattamenti normalmente utilizzati dopo i 20 giorni di stagionatura per garantire la shelf - life dell' Asiago Pressato**

L'industria chimica, produce una vasta gamma di rivestimenti protettivi antimuffa per formaggi in una dispersione acquosa polimerica con eventuali possibili aggiunte di sostanze coloranti e conservanti. Il residuo secco può variare dal 35 % al 60 %. Applicato sulla superficie dei formaggi dà origine, previa asciugatura, ad una pellicola residuale che, a seconda del formulato utilizzato, può essere più o meno spessa, trasparente o colorata, lucida o opaca, più o meno permeabile, caratteristica che, oltre a condizionare la trpirazione ed il calo peso, funge da barriera nei confronti di agenti esterni contaminanti. La protezione può essere rafforzata disperdendo i conservanti ammessi per il trattamento superficiale (crosta), che lo rendono un prodotto particolarmente efficace nella lotta alle muffe, contribuendo così al miglioramento dei formaggi sotto l'aspetto estetico, sanitario e merceologico. Questa speciale composta viene formulato anche ad uso colla per etichettare i formaggi e alimenti in genere. Le superfici trattate sono da considerarsi non edibili e il suo impiego rientra nella normativa degli imballaggi alimentari. Il trattamento può avvenire per immersione, per verniciatura a spruzzo o per spalmatura; può essere effettuato manualmente o avvalendosi di apposite macchine. A seconda del tipo di trattamento viene formulato il prodotto idoneo. Il "MICROCOVERING" è una sospensione acquosa polimerica antimuffa idonea per il trattamento in superficie dei formaggi e dei salumi.

Il film che residua è invisibile e permette una totale traspirazione. Sono disponibili varie formulazioni di Microcovering che si differenziano per il diverso contenuto di conservanti a seconda della durata di protezione necessaria. I conservanti sono presenti in forma di sospensione acquosa (sono cioè insolubili e tendono a decantare se non mantiene l'agitazione), e la frazione polimerica ha la funzione di garantire l'adesione delle particelle di principio attivo alla superficie del formaggio o del salume. Microcovering non ha effetto incollante sui ripiani di appoggio. Il trattamento manuale o meccanizzato, si esegue in un'unica soluzione per immersione che garantisce la totale distribuzione di prodotto antimuffa sulla superficie del formaggio.

Il trattamento effettuato sulla superficie delle forme di formaggio ha lo scopo di addizionare degli agenti con la funzione di limitare lo sviluppo delle muffe indesiderate. L'umidità e la ricca concentrazione di sostanze nutrizionali del formaggio, infatti, rappresentano un habitat ideale per lo sviluppo delle muffe. Per tale motivo, si fa ricorso all'utilizzo di due additivi per poterne contrastare lo sviluppo: la pimaricina (o natamicina) e l'acido sorbico.

Gli additivi vengono acquistati dall'azienda Lattebusche sotto forma di soluzione liquida di color bianco, detta anche "soluzione microcovering". Il trattamento delle forme avviene per immersione in una vasca destinata solo a questa operazione, preliminarmente sanificata. L'operatore, manualmente, preleva una forma alla volta dal carrello e la immerge direttamente all'interno della vasca per pochi, secondi in modo tale che, su tutta la sua superficie si formi una sottile pellicola di microcovering. Terminato il trattamento, la forma di formaggio viene nuovamente riposta sul carrello. La normativa vigente sull'utilizzo degli additivi sui formaggi (D.M. 209 / 1996) impone dei limiti di migrazione per gli additivi utilizzati per i trattamenti superficiali. Per questo motivo, la soluzione di pimaricina e sorbato viene applicata dopo il ventesimo giorno, che è stato individuato, grazie a studi preliminari, come momento migliore per effettuare tale trattamento, senza pregiudicare la sicurezza della parte edibile. Il trattamento al ventesimo giorno di vita rappresenta, per il formaggio Asiago Pressato, l'ottimale compromesso per ottenere la miglior efficacia del microcovering nel rispetto delle normative sugli additivi seppur la propagazione delle muffe e lieviti si sviluppi già nei primi giorni di vita del prodotto.

## **2.7. Sorbati e Pimaricina: caratteristiche e meccanismo d'azione**

Il sale di potassio dell'acido trans,trans-2,4-esadienoico, o più semplicemente sale di potassio è un additivo di tipo chimico. Il suo impiego come agente per i trattamenti di superficie sui formaggi è consentito dal D.M. n 209 del 27.02.1996 (e successivi) in un quantitativo massimo pari a 1000mg/Kg.

L'effetto antimicrobico del sorbato di potassio, così come quello degli altri sorbati, è legato alla capacità di destabilizzazione dell'attività dell'ATPsi, mediante l'alterazione della forza protone-motrice, alla base del funzionamento di questo enzima. I batteri catalasi positivi, come *Salmonella*,

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio parahaemolyticus* ed *Escherichia coli* sono i microrganismi più sensibili in tal senso.

I sorbati sono in grado di inibire la germinazione di spore di *Clostridium* e *Bacillus* a pH 5,7 o inferiori, bloccando la formazione della parete cellulare. Sulle cellule vegetative di questi microrganismi, oltre all'effetto sulla forza Protone - motrice, si manifesta un'azione inibitoria anche su altri enzimi, legata alla capacità di reazione con l'amminoacido cisteina.

La resistenza ai sorbati dei microrganismi non inibiti è dovuta alla loro capacità di degradazione di queste sostanze. Tra i microrganismi dotati di questa prerogativa vi sono diversi ceppi di muffe.

Questo giustifica la necessità di affiancare ai sorbati l'utilizzo di pimaricina allo scopo di creare un'azione di trattamento di superficie a più ampio raggio d'azione.

I batteri lattici sono piuttosto resistenti ai sorbati. Il loro impiego come mezzo di conservazione sul formaggio, quindi, non altera i processi di cui essi sono protagonisti durante la fase maturazione. [20]

La pimaricina un fungicida del gruppo dei macrolidi polienici è prodotta da ceppi naturali di *Streptomyces natalensis* e da alcuni di *Streptococcus lactis*. Il suo utilizzo per i trattamenti di superficie sui formaggi è permesso dal D.M. n209 del 27.02.1996 e successivi.

Questi dispositivi legislativi impongono che la pimaricina venga impiegata esclusivamente su formaggi a pasta dura, semidura, e semimolli ed in un quantitativo massimo pari ad 1mg/dm<sup>2</sup> di superficie e non oltre 5mm dalla superficie stessa.

La funzione inibente della pimaricina è a largo spettro ed include, oltre le muffe (in particolar modo l'*Aspergillus*), anche alcune specie di lieviti, come diversi ceppi di *Candida*. L'azione inibente della pimaricina è riconducibile alla capacità di legame con l'ergosterolo delle membrane cellulari fungine.

A seguito di questa interazione, si generano dei pori che provocano la fuoriuscita di componenti cellulari e, soprattutto, di ioni potassio, causando la morte cellulare per lisi osmotica.

Nonostante la specificità di legame con l'ergosterolo, l'utilizzo di pimaricina, benché sia l'antibiotico polienico meglio tollerato dall'organismo umano, presenta una significativa tossicità anche per l'uomo, dovuta all'interazione col colesterolo di membrana. [21]

### **3.0. MATERIALI E METODI**

#### **Prova di trattamento con ozono in fase di stagionatura**

Dopo il primo giorno di vita il prodotto è stato identificato mediante placchetta di caseina e scrittura con matita copiativa, sui piatti.

Dieci forme vengono prelevate dalla produzione dell'intera giornata della stessa polivalente, 5 forme per il controllo e 5 per la sperimentazione le forme sono state posizionate su rack's di teflon precedentemente sanificati e sistemati in due celle adiacenti con stessa temperatura di 13,5°C ed umidità di 80%, controllate da un data – logger e con un'area di 120 m<sup>2</sup> per entrambe le sale.

Le celle di stagionatura adiacenti sono state separate da una porta ermetica per consentire il meno possibile lo scambio ambientale.

I rack's hanno raccolto 5 giornate di produzione, sono stati posizionati entrambi nella parte opposta all'apertura della cella.

Il prodotto nudo segue in entrambe le celle le stesse operazioni di frescura ossia ogni giorno è stato rivoltato e al quarto giorno messo nella stessa salamoia per due giorni.

La concentrazione di lieviti e muffe presenti in salamoia ha effettuato sicuramente una contaminazione ad entrambi i prodotti in quanto il contenuto di lieviti presente era di circa 34.000 ufc/ml e assenza di muffe.

A fine processo di salatura il prodotto è stato riposto nuovamente nelle 2 celle di stagionatura e rivoltato periodicamente.

E' probabile quindi che il prodotto al settimo giorno in concomitanza con il campionamento della superficie subisca un aumento del numero di microrganismi tanto nel controllo quanto nella prova con ozono.

Il formaggio di controllo verrà così conservato tal quale senza alcun trattamento per 28 giorni.

Nella cella dove invece si è realizzata la sperimentazione si sono utilizzati 4 ozonizzatori; 2 disposti nella zona di apertura della cella e 2 messi vicini al rack dove sono state posizionate le forme.

I due metodi principali di produzione di ozono sono luce - UV e scarica corona. La produzione di ozono per effetto corona è più comune al giorno d'oggi e presenta maggiori vantaggi. Tali vantaggi sono una maggiore sostenibilità dell'unità, più alta produzione di ozono e maggiore convenienza nei costi.

La radiazione UV può essere realizzabile dove e' richiesta la produzione di piccole quantità di ozono (per esempio in laboratori).

Prima di iniziare le attività previste si sono verificate le condizioni di esercizio dell'impianto, ossia abbiamo controllato mediante il rilevatore di ozono la distribuzione sulle quattro uscite in modo tale che vengano convogliati 20 grammi/ora di ozono e impostato l'attivazione dei generatori in un arco di tempo dove non ci fossero operatori all'interno nelle celle.

I cicli giornalieri di ozonizzazione sono così avvenuti dalle ore 18 alle ore 4 del mattino successivo lasciando un tempo di dissociazione prima del rientro del personale nella cella di stagionatura di 3 ore.

L'intera attività di Ozonizzazione è durata per 28 giorni periodo necessario per la maturazione del formaggio Asiago Pressato.

Tabella n. 6 Generatori di ozono utilizzati sono dotati di queste caratteristiche

| <b>Nome Apparecchiatura</b> | <b>VENTOZONE</b>    |
|-----------------------------|---------------------|
| Consumo elettrico           | 125 W               |
| Intervallo di regolazione   | 1minuto-24ore       |
| Peso netto                  | 5,5 Kg              |
| Temperatura di utilizzo     | 5 – 30 °C           |
| Concentrazione ozono emessa | 5 g/h (grammi/ora)  |
| Frequenza operativa         | 10-15KV             |
| Dimensioni                  | 36,5 x 29 x 14,5 cm |

Ogni una delle 4 unità genera 5 grammi di ozono/ora per un totale di 20 grammi/ora. con una temperatura ambiente rilevata costantemente da logger di 13°C ad una umidità dell'80% con pressione atmosferica a livello del mare.

Riguardo la frequenza operativa la struttura di Scarico a Doppia Barriera permette l'utilizzo di un'alta tensione tra 10 – 15 KV e con un'alta frequenza per sostenere l'output lineare.

L'unità richiede solo corrente mono fase 220/240 volt AC e un ventilatore e utilizza approssimativamente 125 watt a 230 volt AC 50 cicli (0,6 amps).

Il posizionamento dei Ventozone su superfici piane, asciutte e pulite a circa 1 metro di altezza da terra ed in posizione stabile.

I Ventozone aspirano l'aria dalla parte posteriore degli apparecchi rendendo così opportuno mantenere libere in entrambi i lati.

Al momento d'inizio è stato opportuno apporre il cartello di sanificazione in corso.



Figura 6: sala di stagionatura senza ozono



Figura 7: sala di stagionatura con ozono



Figura 8: ozonizzatore

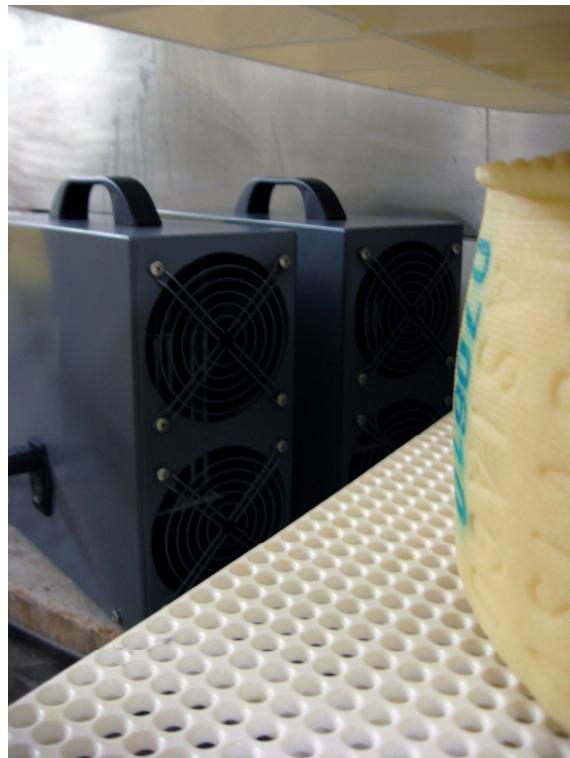


Figura 9: ozonizzatore

### **3.1. Criterio e modalità di prelievo dei campioni di Asiago**

Nelle prime tre settimane di staginatura il prelievo dei campioni di Asiago, avvengono tramite una tecnica non distruttiva con tamponi sterili.

#### MATERIALE NECESSARIO PER CAMPIONARE

- Tamponi sterili, due per forma;
- Delimitatore di superficie 10x10 cm;
- Soluzione Ringer;
- Bunsen, forfici e pinze sterili;
- Provette sterili con tappo, con 10 ml di soluzione ringer.

### **3.2. Preparazione Reagenti**

#### PREPARAZIONE SOLUZIONE RINGER

La soluzione di Ringer (concentrazione 1/4) è un diluente utilizzato nella preparazione di soluzioni in dispersione adottate per il controllo microbiologico di acque, latte, prodotti lattiero - caseari e altri prodotti alimentari. E' una soluzione isotonica che previene la comparsa dello shock osmotico, quando i batteri sono rimossi dal loro ambiente naturale. E' costituita da sodio cloruro, potassio cloruro, calcio cloruro e sodio idrogenocarbonato. Immergo una compressa di Ringer's Solution in 500 mL di acqua distillata o deionizzata e agito lentamente fino a completa soluzione. Successivamente distribuisco la soluzione formatasi in provette o matracci e li sterilizzo in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Vengono usati due tamponi per forma, uno imbevuto di soluzione Ringer e uno asciutto.

Il tampone viene inumidito nella soluzione per almeno 5 secondi

Grazie ad un delimitatore d'area delle dimensioni di 10x10 cm., posizionato sopra la forma da campionare, faccio strofinare prima il tampone imbevuto di soluzione ringer e poi quello asciutto.

Inizialmente in senso verticale, poi orizzontale e quindi in diagonale, per non meno di 20 secondi sull'intera superficie, esercitando la maggiore pressione possibile

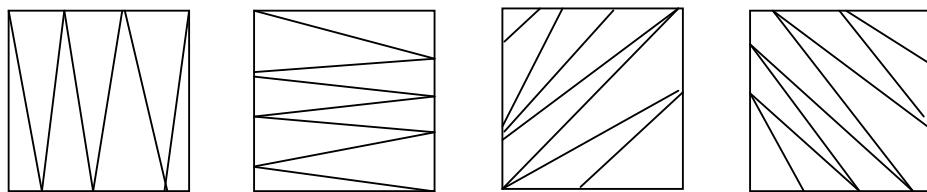


Figura 10: metodo di strisciamento del tampone

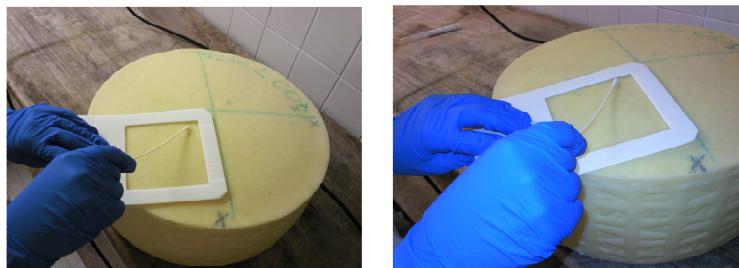


Figura 11: foto mentre effettuavo i tamponi sulle forme

I tamponi prelevati vengono poi trasferiti nelle provette con 10 ml di soluzine Ringer.

Sono stati fatti due tamponi per ogni forma uno asciutto e uno bagnato.

Il tampone è stato agitato con il vortex per almeno 10 secondi.

Dopo aver tolto i tamponi dalle provette con delle pinze sterili sono state fatte le diluizioni.

### 3.3. Terreni necessari

#### TERRENO OGYE AGAR BASE:

terreno di base per il conteggio dei lieviti e muffe negli alimenti e nei mangimi con attività dell’acqua di 0,95 e pH 6,64.

Mossel già nel 1962 segnalò che i terreni a ph acido non risultavano idonei per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti per due motivi:

1. Le cellule di lievito stressate dal calore non tollerano i pH acidi necessari all’inibizione dei contaminanti batterici;
2. La crescita dei lieviti e delle muffe è spesso limitata dalla presenza di flore batteriche acido tolleranti.

L’aggiunta di ossitetracicline ad una base neutra si dimostrò molto indicata per questo tipo di ricerca, poiché forniva conte micotiche più elevate rispetto ai terreni in cui era utilizzato il solo pH acido per sopprimere la crescita batterica.

Queste osservazioni furono confermate da Buttiaux e Catsaras e da Saincliver e Roblot. In uno studio su 4000 campioni di origine alimentare e clinica, Mossel valutò l'accuratezza dei conteggi di lieviti e muffe su Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar osservando come il terreno fosse particolarmente inibitorio nei confronti delle *Bacillaceae*. In particolari condizioni sperimentali e su determinati alimenti l'uso della sola ossitetracicline non si dimostrò comunque sufficiente ad ottenere conteggi attendibili di lieviti e muffe.

In particolare Mossel osservò che con alimenti con elevato contenuto proteico in cui vi sia presenza di Bacilli Gram negativi è necessario l'uso concomitante della ossitetracicline e gentamicina per una completa inibizione della flora contaminante.

#### TERRENO DRBCA:

terreno di base per il conteggio dei lieviti e muffe negli alimenti e nei mangimi con attività dell'acqua di 0,95 e pH 5,6.

### **3.4. Preparazione terreni**

#### MATERIALE NECESSARIO

- Pipette sterili da 1ml;
- Terreno OGYE AGAR BASE;
- Terreno DRBCA AGAR BASE;
- Supplemento antibiotico: Cloramfenicolo;
- Supplemento antibiotico: Ossitetracicline;
- Boccette sterili;
- Acqua demineralizzata;
- Acqua demineralizzata sterile.

#### PREPARAZIONE TERRENO OGYE AGAR BASE:

sospendo in bottiglia sterile 19,00 g di terreno in 500 ml di acqua demineralizzata fredda.

Procedo facendo bollire il terreno in microonde per alcuni minuti per farlo sciogliere completamente, dopodiché sterilizzo il mio terreno in autoclave a 115°C per 15

minuti e lo faccio raffreddare a bagnomaria termoregolato a una temperatura di circa a 50°C, per un ora circa.

Quando il terreno avrà raggiunto la temperatura di 50°C, aggiungo al terreno una boccetta di ossitetraciclina, fatta precedentemente reidratare con 5ml di acqua demineralizzata sterile.

La concentrazione finale di ossitetraciclina è di HCL:100 mg/L

Composizione tipica del terreno OGYE AGAR BASE:

- Estratto di lievito ..... 5,0 g/L
- Glucosio..... 20,0 g/L
- Agar..... 13,0g/L

Colore del terreno giallo pallido.

Figura 12: esempio di piastra con terreno OGYE



#### PREPARAZIONE TERRENO DRBCA:

sospendo in bottiglia sterile 15,5 g di terreno e lo idrato con 500 ml di acqua demineralizzata fredda. Procedo a farlo sciogliere completamente, in microonde per alcuni minuti, facendolo bollire, dopodiché aggiungo il contenuto di una boccetta di cloranfenicolo ricostituita precedentemente con 1.5 ml di acqua demineralizzata sterile e 1,5 ml di etanolo.

Sterilizzo in autoclave a 121°C per 15 minuti e lo lascio poi raffreddare a bagnomaria termoregolato a una temperatura inferiore a 50°C, tra 44 - 47°C per un'ora circa.

Passata un'ora il terreno è pronto per essere utilizzato.

Composizione tipica del terreno DRBCA AGAR BASE:

- Enzimi digestivi di animali e tessuti vegetali..... 5,0 g/L
- D-Glucosio..... 10,0 g/L
- Potassio deidrogenfosfato..... 1,0 g/L
- Solfato di magnesio..... 0,5 g/L
- Dicloran..... 0,002 g/L
- Rose Bengala..... 0,025g/L
- Agar..... 15,0 g/L

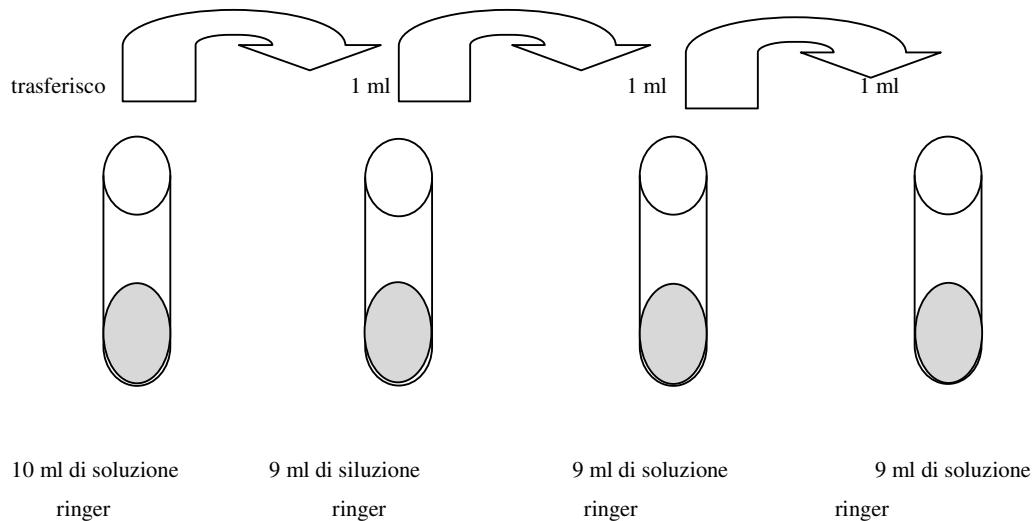


Figura 13: esempio di piastra con terreno DRBCA

### 3.5. Diluizioni

Dalla provetta madre contenente i 10 ml di soluzione ringer con il campione, prelevo 1 ml e lo trasferisco in un'altra provetta contenente 9 ml di soluzione ringer.

Faccio agitare con il vortex e dalla seconda provetta prelevo 1 ml di soluzione e lo trasferisco in un'altra provetta contenente 9 ml di soluzione ringer e continuo fino ad ottenere le diluizioni desiderate.



Per quanto riguarda le forme sono state fatte quattro diluizioni ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ), per le superfici invece ho fatto tre diluizioni ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ), sia per la sala trattata con ozono che in quella senza ozono.

### **3.6. Procedura d'analisi sulla crosta**

MATERIALE NECESSARIO:

- Coltello sterile
- Guanti sterili
- Sacchetti sterili
- Pinze sterili
- Pipette sterili
- Stomacher
- Soluzione Ringer

#### **PRELIEVO DELLA CROSTA**

Nell'ultima settimana di stagionatura del formaggio sono state effettuate anche delle analisi sulla crosta per valutare la presenza di lieviti e muffe nella parte sottostante.

Utilizzando un coltello sterile, sono stati prelevati, 25 g di crosta spessa più o meno 2 mm sia nella sala con ozono che nella sala senza ozono.

In laboratorio poi in sacchetti sterili, ai 25 g di crosta sono stati aggiunti 225 ml di soluzione Ringer e con lo STOMACHER si è proceduto con la frantumazione della crosta. Dopo averla lasciata riposare per 15 min è stato prelevato 1 ml dal tal quale per la produzione delle diluizioni seriali (concentrazione  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ) piastra Petri sterile. Di seguito sono stati versati 10 - 15 ml di terreno reso omogeneo con movimenti circolari. La piastra è stata lasciata a solidificare su una superficie fredda.

### **3.7. Piastratura**

Dopo aver preparato il terreno e dopo aver effettuato le necessarie diluizioni dei campioni si procede alla piastratura con il metodo seguente:

- Dopo aver agitato con il vortex, per almeno 10 secondi, la provetta con il mio campione, prelevo con una pipetta sterile 1 ml della soluzione da campionare e lo trasferisco nella piastra Petri corrispondente;

- Di seguito verso circa 15 ml di terreno (OGYE o DRBCA) e faccio mescolare bene il campione con il terreno, procedendo con lenti movimenti rotatori in senso orario e poi antiorario;
- Lascio che il terreno si solidifichi, a quel punto metterò le piastre ad incubare in un incubatore termoregolato a 25°C per 5 giorni;
- Trascorsi i 5 giorni procederò alla lettura delle piastre, contando le colonie di lieviti e muffe che saranno presenti. [5]

Da 3 a 5 giorni si sono esaminate le piastre dopo incubazione e scelte per il conteggio quelle con non meno di 15 colonie e non più di 100 colonie.

La morfologia macroscopica risulta molto variegata sia nell'aspetto della superficie, nella colorazione della superficie e del retro della colonia.

Alcune si sono sviluppate rapidamente con aspetto cotonoso e colore oliva, blu - verde, bianco, rosso.

### **3.8. Conteggio delle piastre**

Appropriati tempi e temperature di incubazione sono importanti per assicurare una corretta crescita anche alle colonie di lieviti e muffe più sensibili.

A questo proposito è consigliato di incubare a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 3 - 5 giorni.

Esaminare le piastre appena rimosse dal termostato.

LIEVITI:

- colonie piccole,
- bordo definito,
- colore biancastro,
- colonie in rilievo,
- colore uniforme.

Quando il numero delle colonie è superiore a 100, si consiglia di procedere ad un conteggio stimato, ottenibile determinando il numero medio di colonie presenti in un quadretto significativo di terreno.

In casi come questo, se si desidera contare le colonie occorre diluire ulteriormente il campione.

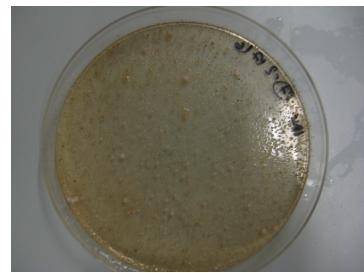
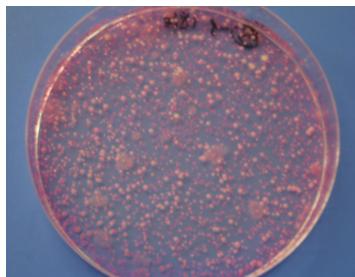


Figura 14: esempio di piastre con terreni DRBCA e OGYE con lieviti

#### MUFFE:

- colonie grandi,
- bordo diffuso,
- colore variabile per la presenza di pigmenti propri nelle muffe,
- area centrale di colore più scuro.

le colonie di muffe sono riconoscibili per la loro notevole dimensione, colorazione variabile, bordo diffuso e zone centrale più marcata.

Data la dimensione, le colonie di muffe possono confluire, in questo caso, la zona centrale più scura di ogni colonna, facilita il conteggio delle stesse.

Quando il numero delle colonie di muffe è elevato il conteggio (stimato) si può effettuare facendo riferimento alle zone centrali più scure.

Anche in questi casi, un'ulteriore diluizione del campione facilita notevolmente il conteggio.



Figura 15: esempio di muffe su terreno OGYE



figura 16: esempio di muffe su terreno DRBCA.

## **4.0.RISULTATI E DISCUSSIONE**

Nelle tabelle seguenti sono riportati i risultati relativi alle prove effettuate sintetizzando, i valori medi (si sono effettuati 2 campioni analizzati su 2 terreni per ciascuna superficie e formaggio campionati)

Tabella n. 7: riassunto delle analisi sulle muffe

| Analisi muffe UFC/cm <sup>2</sup>                 | Arco temporale dei rilevamenti   |                                  |                                  |                                  |                                  |
|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|   | Giorno 0                         | Giorno 7                         | Giorno 14                        | Giorno 21                        | Giorno 28                        |
|   | Valore medio UFC/cm <sup>2</sup> |
| <b>Superfici senza trattamento</b>                |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Superfici Asiago Pressato data 07/06/2010         | 7                                | 58                               | 283                              | 382                              | 1970                             |
| Superfici Asiago Pressato data 08/06/2010         | 16                               | 53                               | 256                              | 310                              | 96                               |
| Superfici Asiago Pressato data 09/06/2010         | 5                                | 336                              | 39195                            | 45108                            | 20403                            |
| Superfici Asiago Pressato data 10/06/2010         | 1                                | 43                               | 135                              | 133                              | 153                              |
| Superfici Asiago Pressato data 11/06/2010         | 1                                | 283                              | 1314                             | 471                              | 77                               |
|   |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| <b>Formaggio senza trattamento</b>                |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 07/06/2010 | 18                               | 1                                | 18                               | 185                              | 1566                             |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 08/06/2010 | 75                               | 1                                | 68                               | 110                              | 245                              |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 09/06/2010 | 1                                | 1                                | 35                               | 39                               | 49                               |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 10/06/2010 | 2                                | 31                               | 75                               | 59                               | 60                               |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 11/06/2010 | 0                                | 26                               | 135                              | 71                               | 98                               |

|                               | Giorno 0 | Giorno 7 | Giorno 22 | Giorno 30 |  |
|-------------------------------|----------|----------|-----------|-----------|--|
| <b>Aria senza trattamento</b> |          |          |           |           |  |
| 10 litri                      | 17       | 0        | Non.eff.  | Non.eff.  |  |
| 20 litri                      | 13       | 2        | 0         | Non.eff.  |  |
| 50 litri                      | 19       | 7        | 1         | Non.eff.  |  |
| 100 litri                     | 51       | 2        | 0         | 28        |  |
| 200 litri                     | Non.eff. | Non.eff. | Non.eff.  | 108       |  |

Dalla tabella 7 risulta chiaramente che la presenza di muffe nelle superfici e sul formaggio è molto contenuta all'inizio, aumenta al settimo giorno all'uscita dalla salamoia e fino al ventottesimo giorno la muffa rimane costante o aumenta.

Nel caso dell'aria si ha una diminuzione della muffa causata dalle due celle di stagionatura adiacenti tra loro che nelle ore di produzione vengono messe in comunicazione tramite l'apertura del portone per la movimentazione dei rack di formaggio.

Tabella n.8: riassunto delle analisi dei lieviti

| Analisi lieviti UFC/cm <sup>2</sup>               | Arco temporale dei rilevamenti   |                                  |                                  |                                  |                                  |
|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|   | Giorno 0                         | Giorno 7                         | Giorno 14                        | Giorno 21                        | Giorno 28                        |
|   | Valore medio UFC/cm <sup>2</sup> |
| <b>Superfici senza trattamento</b>                |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Superfici Asiago Pressato data 07/06/2010         | 1                                | 218                              | 5223                             | 3638                             | 4425                             |
| Superfici Asiago Pressato data 08/06/2010         | 1                                | 474                              | 59025                            | 5099                             | 1903                             |
| Superfici Asiago Pressato data 09/06/2010         | 26002                            | 31752                            | 41505                            | 29800                            | 11568                            |
| Superfici Asiago Pressato data 10/06/2010         | 2201                             | 4075                             | 10000                            | 29450                            | 26550                            |
| Superfici Asiago Pressato data 11/06/2010         | 0                                | 50058                            | 48853                            | 35190                            | 21684                            |
|   |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| <b>Formaggio senza trattamento</b>                |                                  |                                  |                                  |                                  |                                  |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 07/06/2010 | 22                               | 208                              | 2975                             | 1750                             | 32000                            |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 08/06/2010 | 61                               | 743                              | 5738                             | 2660                             | 21750                            |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 09/06/2010 | 24                               | 1158                             | 10175                            | 11000                            | 50600                            |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 10/06/2010 | 76                               | 20000                            | 59000                            | 72250                            | 161250                           |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 11/06/2010 | 36                               | 32750                            | 78750                            | 115500                           | 96300                            |

Analoghe considerazioni si possono fare per quanto riguarda il conteggio dei lieviti sulle superfici e sui formaggi come evidenziato nella tabella 8.

Al rilevamento del giorno 7 i campioni possono risultare più inquinati derivanti dalla salamoia, e i valori al passare del tempo diventano sempre più elevati.

Si verifica una progressione di sviluppo ai ventotto giorni di stagionatura sino a superare i limiti tollerabili, tanto da raggiungere, particolarmente, valori dell'ordine di  $10^5$  ufc/cm<sup>2</sup>.

Tabella n. 9: riassunto delle analisi sulle muffe

| Analisi muffe UFC/cm2                             |  | Arco temporale dei rilevamenti |                            |                            |                            |                            |
|---|--|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|   |  | Giorno 0                       | Giorno 7                   | Giorno 14                  | Giorno 21                  | Giorno 28                  |
|   |  | Valore<br>medio<br>UFC/cm2     | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 |
| <b>Superfici con trattamento ozono</b>            |  |                                |                            |                            |                            |                            |
| Superfici Asiago Pressato data 07/06/2010         |  | 42                             | 0                          | 0                          | 0                          | 1                          |
| Superfici Asiago Pressato data 08/06/2010         |  | 255                            | 0                          | 0                          | 0                          | 2                          |
| Superfici Asiago Pressato data 09/06/2010         |  | 5                              | 0                          | 0                          | 0                          | 1                          |
| Superfici Asiago Pressato data 10/06/2010         |  | 1                              | 0                          | 0                          | 0                          | 1                          |
| Superfici Asiago Pressato data 11/06/2010         |  | 0                              | 1                          | 0                          | 0                          | 0                          |
|   |  |                                |                            |                            |                            |                            |
| <b>Formaggio con trattamento ozono</b>            |  |                                |                            |                            |                            |                            |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 07/06/2010 |  | 28                             | 5                          | 0                          | 0                          | 0                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 08/06/2010 |  | 9                              | 0                          | 1                          | 0                          | 2                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 09/06/2010 |  | 2                              | 1                          | 0                          | 0                          | 2                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 10/06/2010 |  | 0                              | 0                          | 6                          | 0                          | 1                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 11/06/2010 |  | 0                              | 4                          | 0                          | 0                          | 0                          |
|   |  |                                |                            |                            |                            |                            |
|   |  | Giorno 0                       | Giorno 7                   | Giorno 22                  | Giorno 30                  |                            |
| <b>Aria con trattamento ozono</b>                 |  |                                |                            |                            |                            |                            |
| 10 litri  |  | 74                             | 5                          | Non.eff.                   | Non.eff.                   |                            |
| 20 litri  |  | 108                            | 6                          | 3                          | Non.eff.                   |                            |
| 50 litri  |  | Non cont.                      | 6                          | 5                          | Non.eff.                   |                            |
| 100 litri   |  | Non cont.                      | Non.eff.                   | 1                          | 76                         |                            |
| 200 litri   |  | Non.eff.                       | Non.eff.                   | Non.eff.                   | 105                        |                            |

Dalla tabella 9 risulta chiaramente che la presenza di muffe nelle superfici e sul formaggio esistente anche se molto contenuta , si riduce fino ad eliminazione.

Al settimo giorno quindi dopo l'uscita dalla salamoia e fino al ventottesimo giorno la muffa rimane costantemente inibita.

Nel caso dell'aria si ha una diminuzione e poi un aumento della muffa causata dalle celle di stagionatura che sono comunicanti ed adiacenti tra loro.

Nelle ore di produzione le stanze vengono messe in comunicazione tramite l'apertura del portone che le separa per la movimentazione dei rack di formaggio e per effettuare le operazioni di rivoltamento.

Si osserva lo sviluppo di alcune colonie di muffa su formaggi e superfici al ventottesimo giorno causate dall'aria della stanza che per affetto di cross contamination dal magazzino adiacente e dalla cella senza trattamento ozono pervadono anche la cella ozonizzata.

Il prelievo dei campioni viene eseguito proprio in concomitanza di queste fasi critiche ma andando a rifare le analisi il giorno successivo i risultati dei formaggi e delle superfici dopo il trattamento notturno ritornano ad essere negativi.

Tabella n. 10: riassunto delle analisi dei lieviti

| Analisi lieviti UFC/cm2                           | Arco temporale dei rilevamenti |                            |                            |                            |                            |
|---|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
|   | Giorno 0                       | Giorno 7                   | Giorno 14                  | Giorno 21                  | Giorno 28                  |
|   | Valore<br>medio<br>UFC/cm2     | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 | Valore<br>medio<br>UFC/cm2 |
| <b>Superfici con trattamento ozono</b>            |                                |                            |                            |                            |                            |
| Superfici Asiago Pressato data 07/06/2010         | 758                            | 11                         | 0                          | 0                          | 0                          |
| Superfici Asiago Pressato data 08/06/2010         | 17                             | 0                          | 1                          | 6                          | 0                          |
| Superfici Asiago Pressato data 09/06/2010         | 42255                          | 455                        | 1                          | 0                          | 0                          |
| Superfici Asiago Pressato data 10/06/2010         | 543                            | 0                          | 0                          | 0                          | 0                          |
| Superfici Asiago Pressato data 11/06/2010         | 24                             | 51                         | 9                          | 0                          | 0                          |
| <b>Formaggio con trattamento ozono</b>            |                                |                            |                            |                            |                            |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 07/06/2010 | 211                            | 44                         | 20                         | 0                          | 1                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 08/06/2010 | 27                             | 304                        | 30                         | 6                          | 0                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 09/06/2010 | 329                            | 735                        | 7                          | 0                          | 0                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 10/06/2010 | 35                             | 320                        | 26                         | 2                          | 0                          |
| Forme Asiago Pressato Lotto produzione 11/06/2010 | 80                             | 5225                       | 221                        | 1                          | 0                          |

Dalla tabella 10 risulta chiaramente che l'andamento dei lieviti delle superfici e sul formaggio nel corso della stagionatura si riducono completamente.

Al rilevamento del giorno 7 i campioni possono risultare più inquinati derivanti dalla salamoia, ma i valori al passare del tempo diminuiscono.

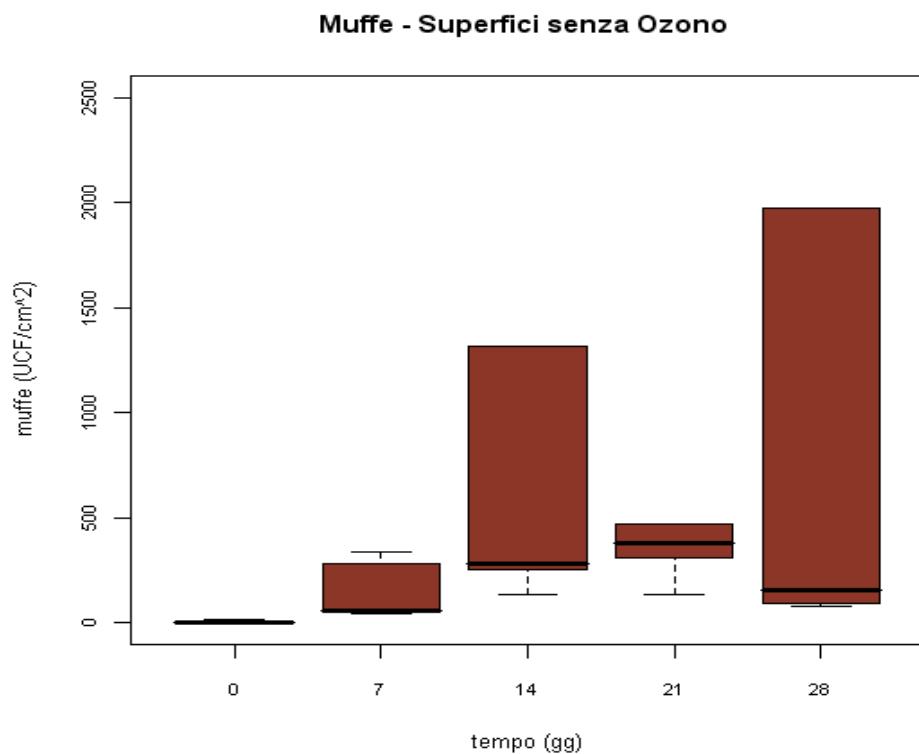
## 4.1. Analisi statistica

I dati relativi alle tabelle descritte sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) utilizzando **R**, un ambiente di sviluppo specifico per l'analisi statistica.

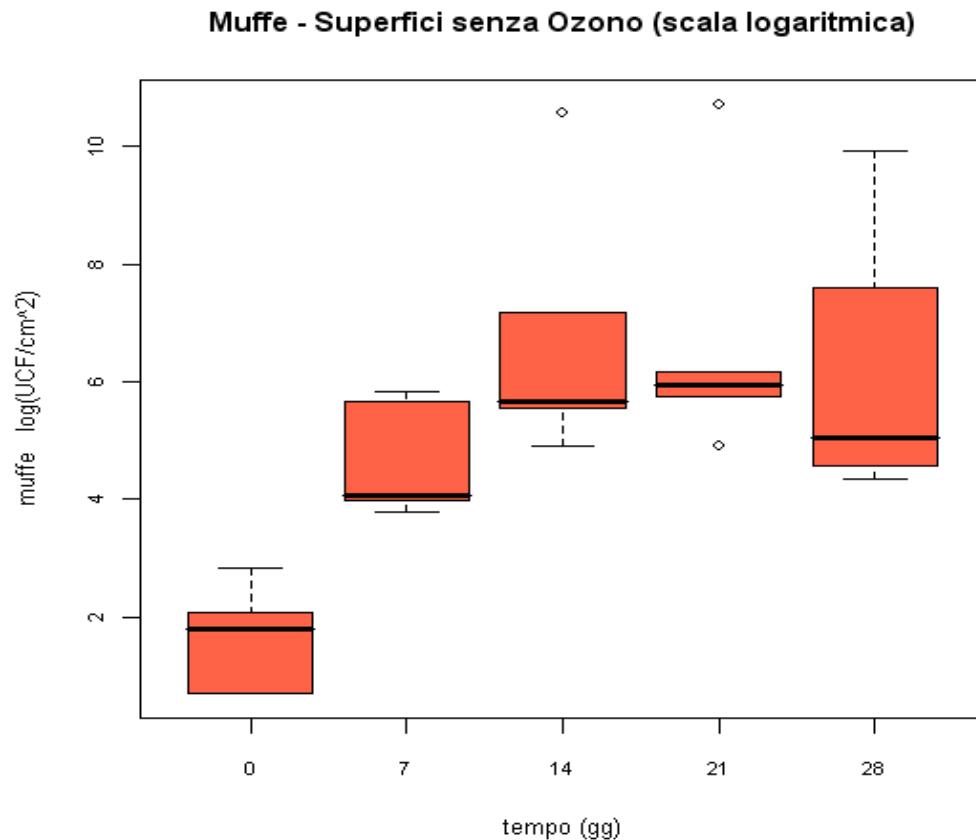
R fu sviluppato da Ross Ihaka e da Robert Gentleman presso l'Università di Auckland in Nuova Zelanda, e proprio per le sue celebri origini è chiamato anche (soprattutto dagli appassionati degli ambienti free-ware) GNU S.

R è ampiamente utilizzato nei settori della ricerca, e da anni ormai riscuote sempre maggiori apprezzamenti dagli analisti operanti in tutti i settori della scienza.

Nel boxplot sottostante sono state evidenziate le muffe sulle superfici rispetto ai vari momenti temporali di rilevazione (e su tutti i 5 lotti).



Le muffe presenti sulle superfici in scala logaritmica

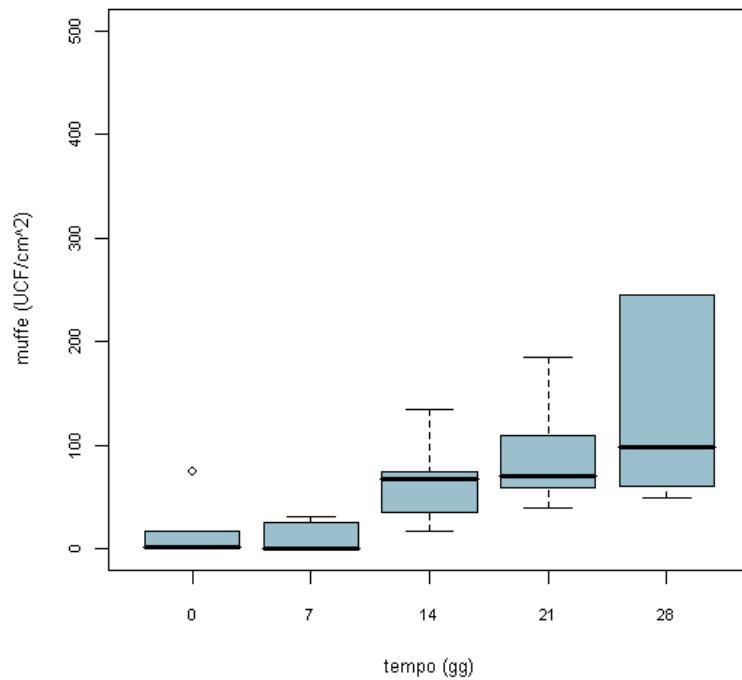


Al fine di rendere la distribuzione dei valori più simmetrica (rispetto al valore centrale) e per rendere la variabilità maggiormente simile ; sono i due requisiti per applicare l'analisi della varianza e si procede con una trasformazione dei dati originari.

Le superfici senza trattamento con ozono (su scala logaritmica è stata aggiunta di una unità ai dati originari poiché il logaritmo di 0 risulta – infinito).

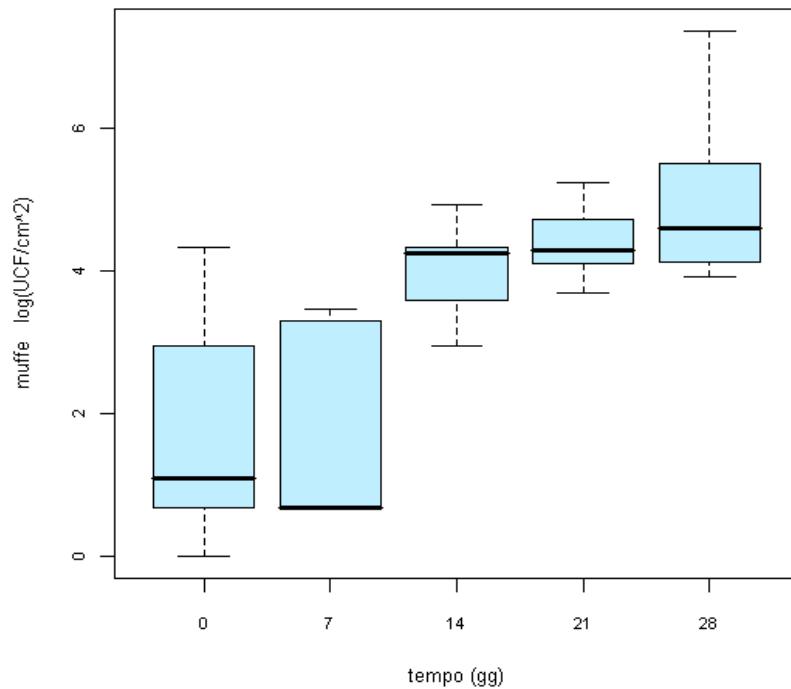
Nei boxplot sottostanti sono state evidenziate le muffe sui formaggi a cui non è stato applicato il trattamento con ozono rispetto ai vari momenti temporali di rilevazione (e su tutti i 5 lotti) costantemente in aumento.

### Muffe - Formaggio senza Ozono

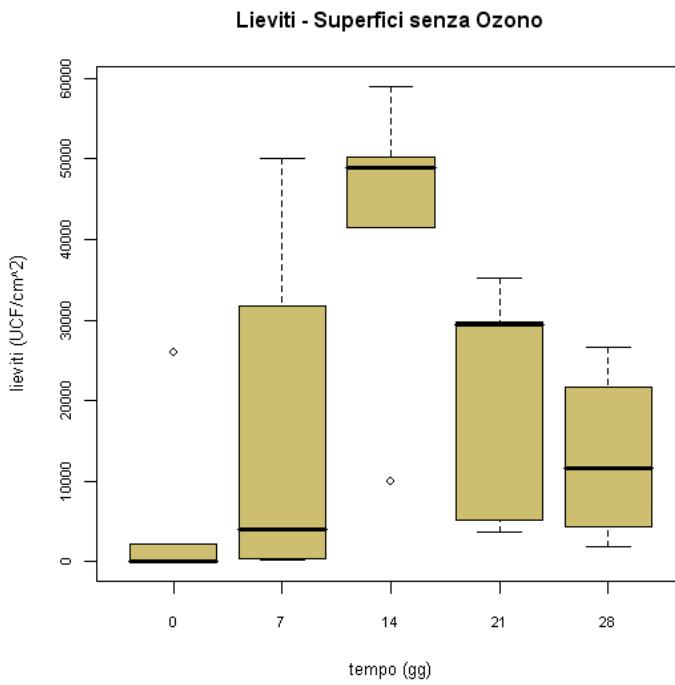


Le muffe presenti sul formaggio in scala logaritmica.

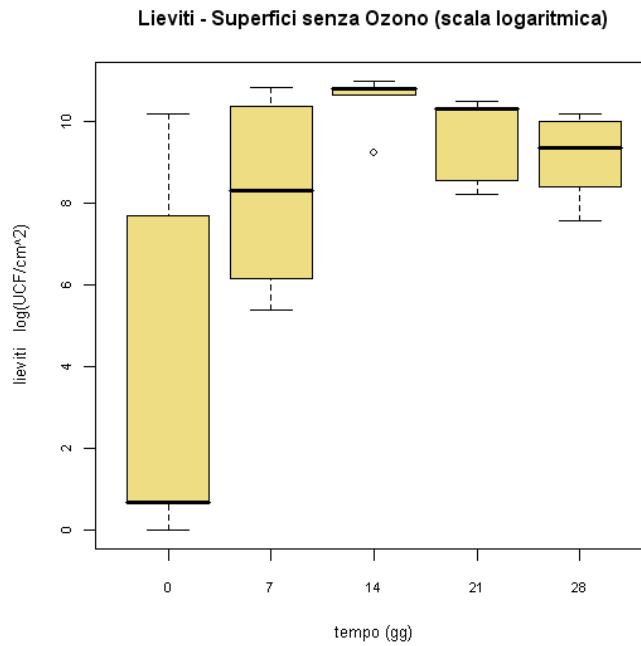
**Muffe - Formaggio senza Ozono (scala logaritmica)**



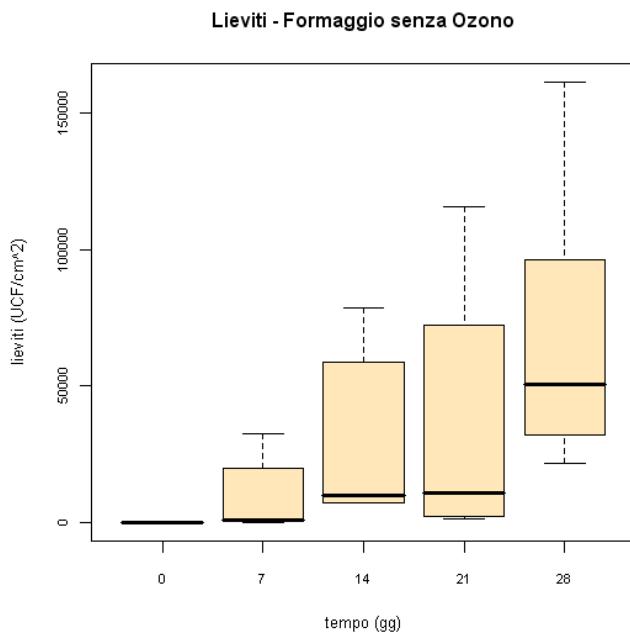
Nei boxplot sottostanti sono state evidenziati i lieviti sulle superfici a cui non è stato applicato il trattamento con ozono rispetto ai vari momenti temporali di rilevazione (e su tutti i 5 lotti) costantemente in aumento o presenti in misure molto significative.



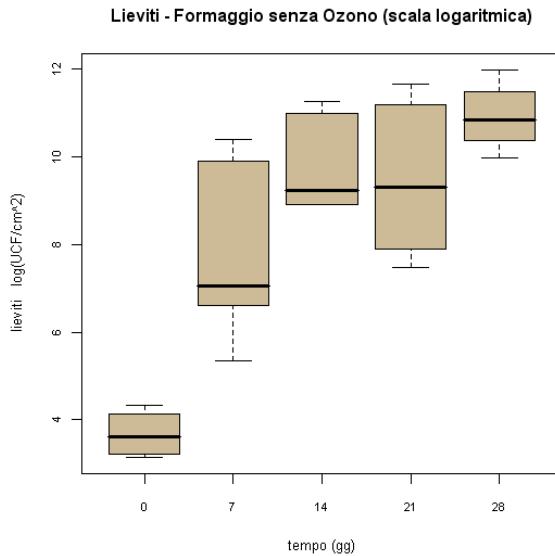
I lieviti presenti sulle superfici in scala logaritmica.



Nei boxplot sottostanti sono state evidenziati i lieviti sul formaggio a cui non è stato applicato il trattamento con ozono rispetto ai vari momenti temporali di rilevazione (e su tutti i 5 lotti) costantemente in aumento e presenti in misure molto significative.

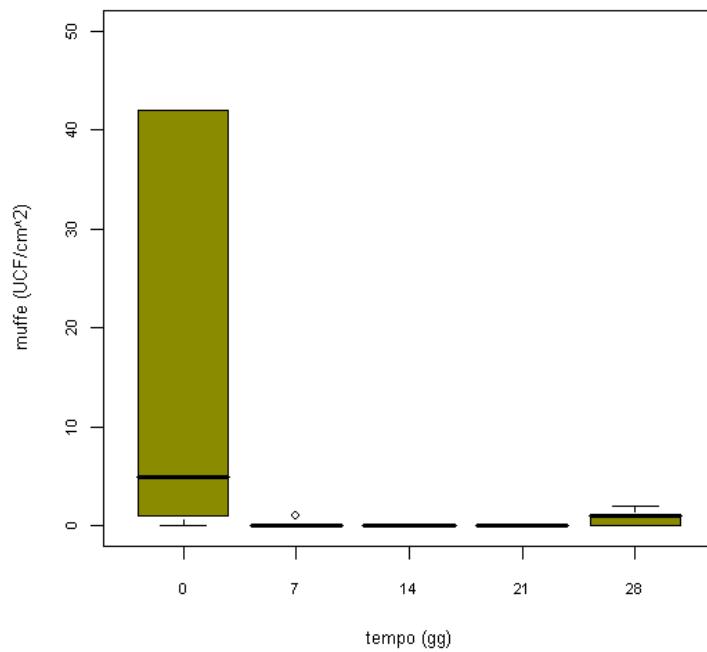


I lieviti presenti nel formaggio in scala logaritmica.



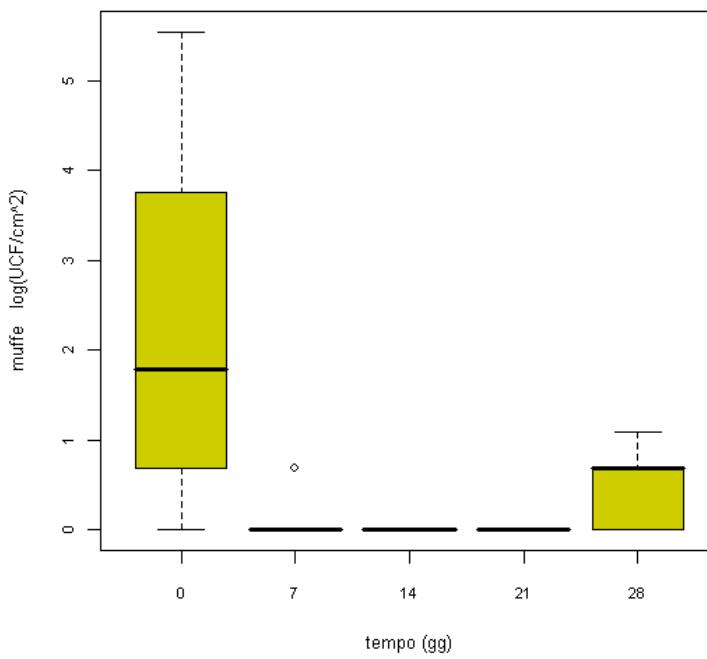
Analisi grafica esplorativa su superfici per la variabile muffe dove è stato applicato il trattamento con ozono.

**Muffe - Superfici con Ozono**

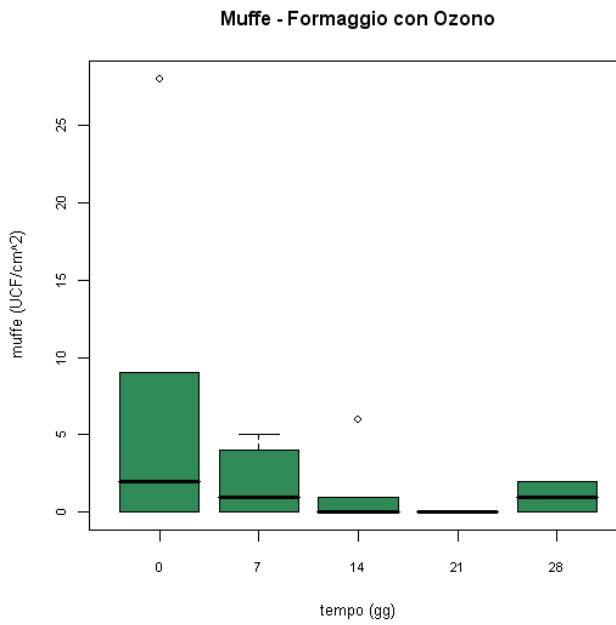


Le muffe presenti sulle superfici in scala logaritmica.

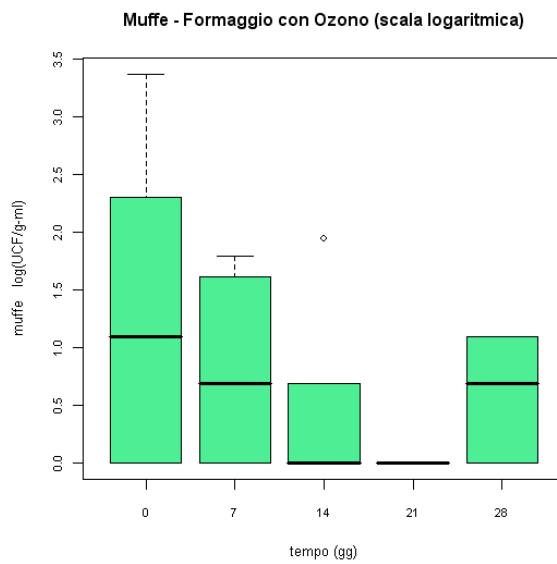
**Muffe - Superfici con Ozono (scala logaritmica)**



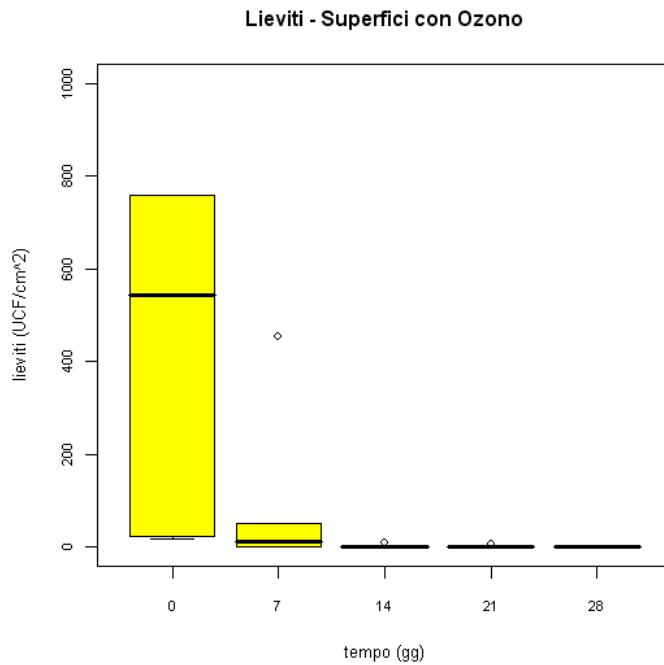
Si evidenziano le muffe sul formaggio che hanno subito il trattamento rispetto ai vari momenti temporali di rilevazione (e su tutti i 5 lotti).



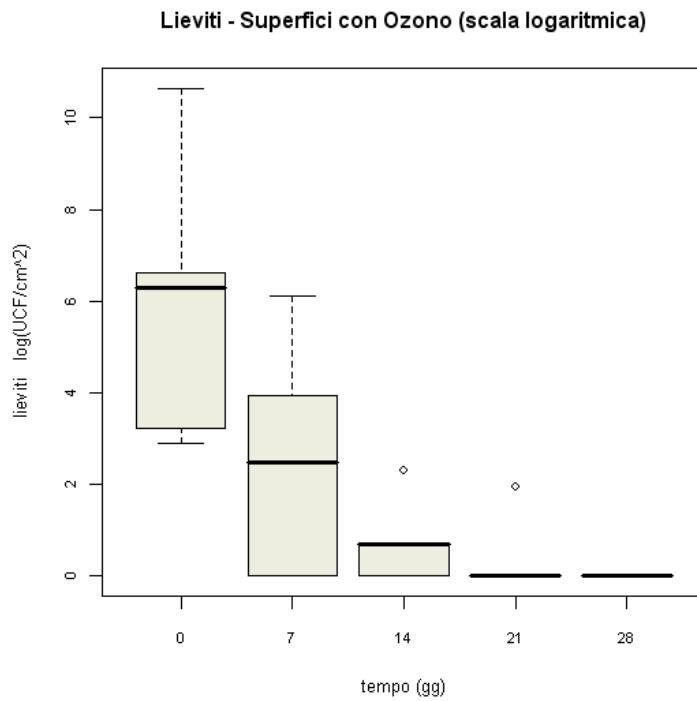
Al fine di rendere la distribuzione dei valori più simmetrica (rispetto al valore centrale) e per rendere la variabilità maggiormente simile si sono applicati i due requisiti per svolgere l'analisi della varianza procedendo con una trasformazione dei dati originari utilizzando così il ricavato dei dati con trattamento ozono (su scala logaritmica e aggiunta di una unità ai dati originari poiché il logaritmo di 0 risulta – infinito...).



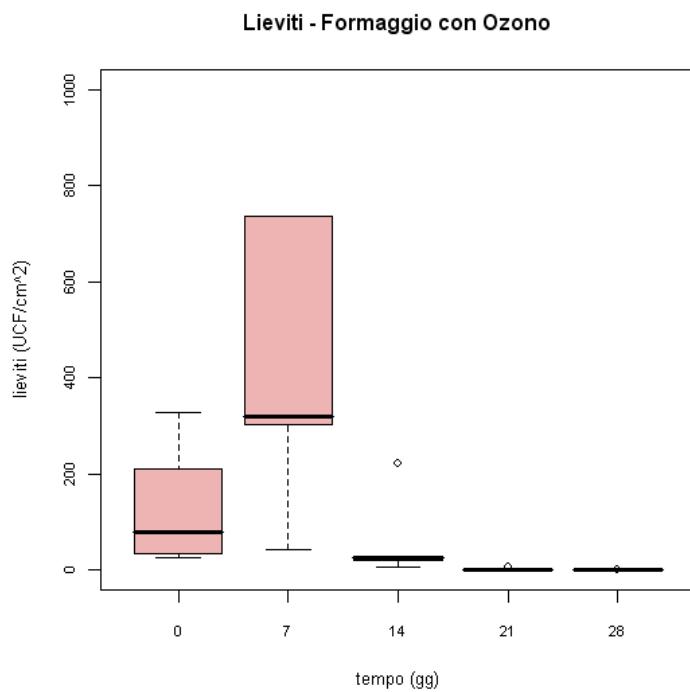
Si evidenziano i lieviti sulle superfici a cui è stato effettuato il trattamento con ozono rispetto ai vari momenti temporali di rilevazione (e su tutti i 5 lotti).



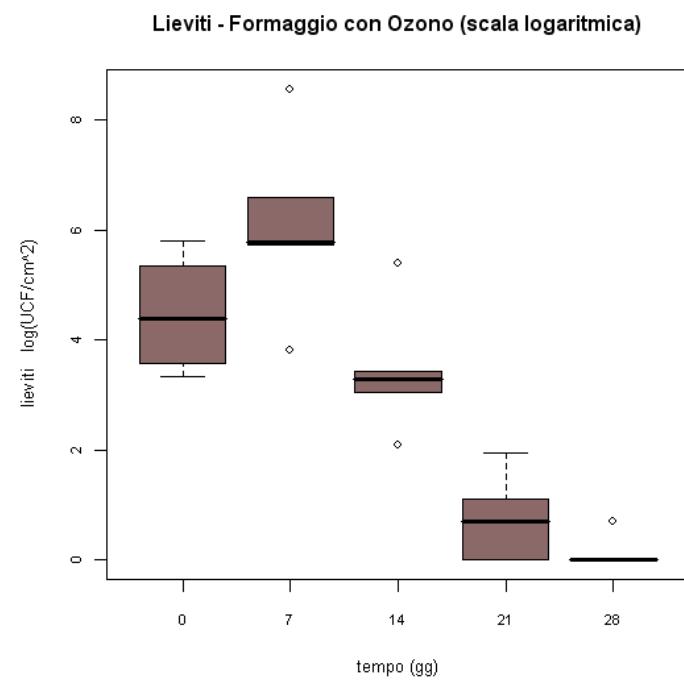
I lieviti presenti sulle superfici in scala logaritmica.



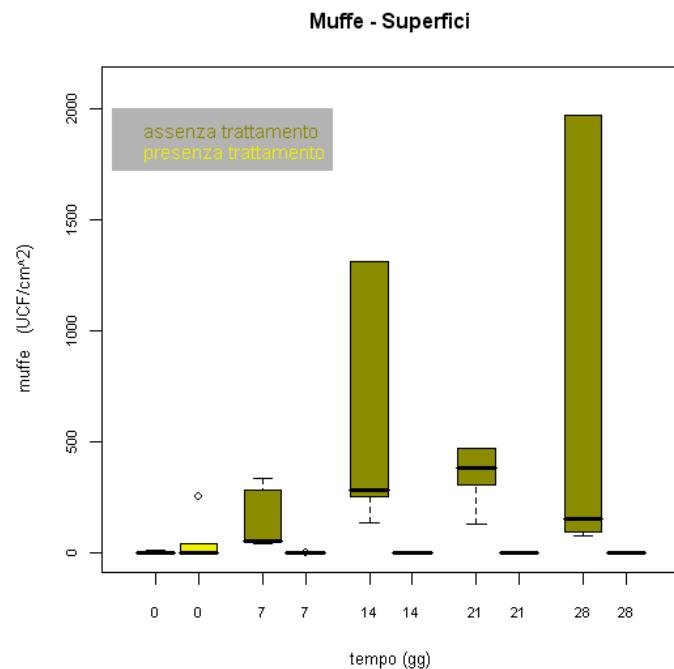
Si evidenziano i lieviti sul formaggio a cui è stato effettuato il trattamento con ozono rispetto ai vari momenti temporali di rilevazione (e su tutti i 5 lotti).



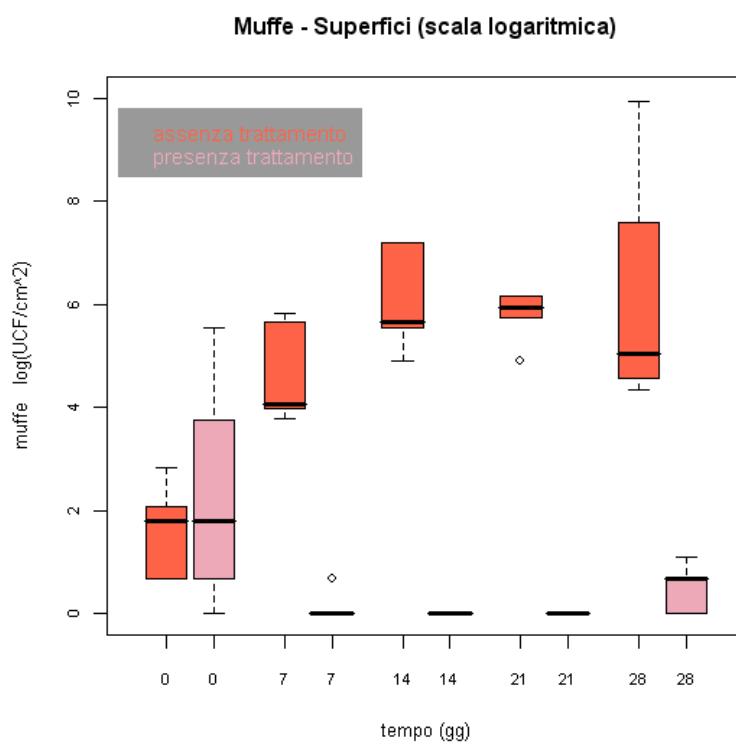
Le muffe presenti sulle superfici in scala logaritmica.



Visti assieme, utilizzando la stessa scala per visualizzare immediatamente il diverso andamento con e senza trattamento.



Le muffe presenti sulle superfici in scala logaritmica.



Analisi della Varianza sulle muffe presenti nelle superfici (con 1 e 48 gradi di libertà).

(mettendo assieme i dati relativi ai 5 lotti)

Summary (aov (muffe\_s ~ trattamento) )

|             | Df | Sum Sq     | Mean Sq   | F value | Pr(>F)    |
|-------------|----|------------|-----------|---------|-----------|
| Trattamento | 1  | 245448599  | 245448599 | 3.366   | 0.07276 . |
| Residuals   | 48 | 3500187282 | 72920568  |         |           |
| ---         |    |            |           |         |           |

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

L'ipotesi della diversità delle medie dei valori delle muffe con e senza il trattamento NON può essere accettata ad un livello di significatività pari allo 0,05.

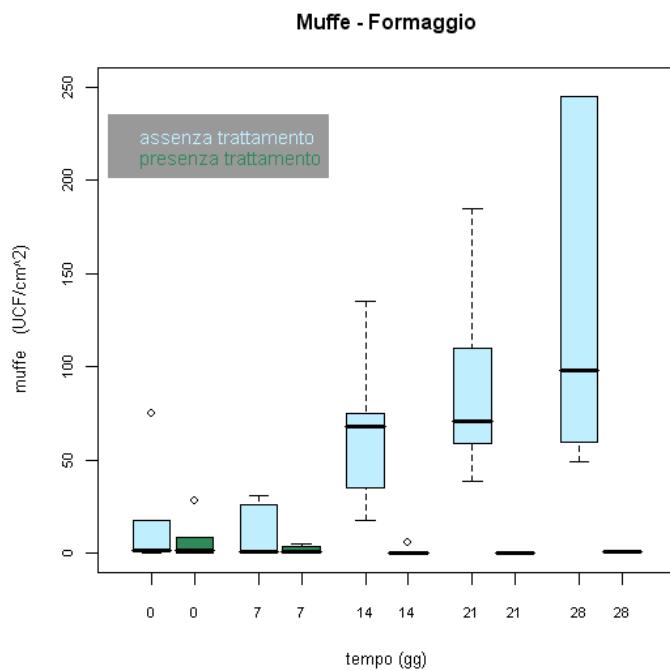
Il problema nasce dalla palese violazione delle ipotesi che sottendono all'applicazione del test (stessa variabilità tra i gruppi, omoschedasticità più precisamente); infatti se valutiamo il test sui dati trasformati mediante logaritmo per cui si ha una violazione molto minore dell'ipotesi (resta difficile da riscontrare l'altra ipotesi di normalità dei dati) - si verifica che esiste l'effetto dovuto al trattamento ad un livello di significatività pari allo 0,001.

Summary (aov (log.muffe\_s1 ~ trattamento) )

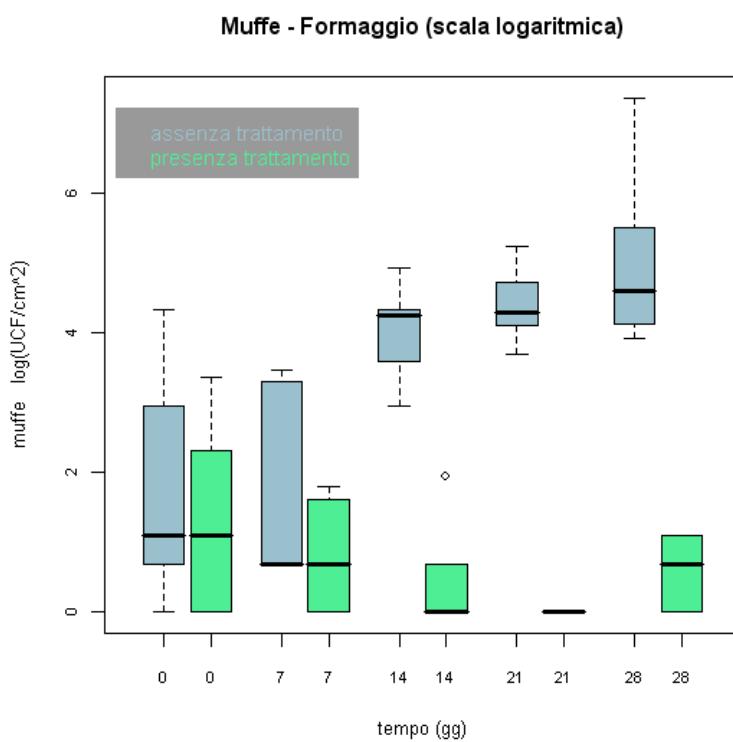
|             | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F)        |
|-------------|----|---------|---------|---------|---------------|
| Trattamento | 1  | 265.639 | 265.639 | 60.766  | 4.495e-10 *** |
| Residuals   | 48 | 209.831 | 4.371   |         |               |
| ---         |    |         |         |         |               |

Signif. codes: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

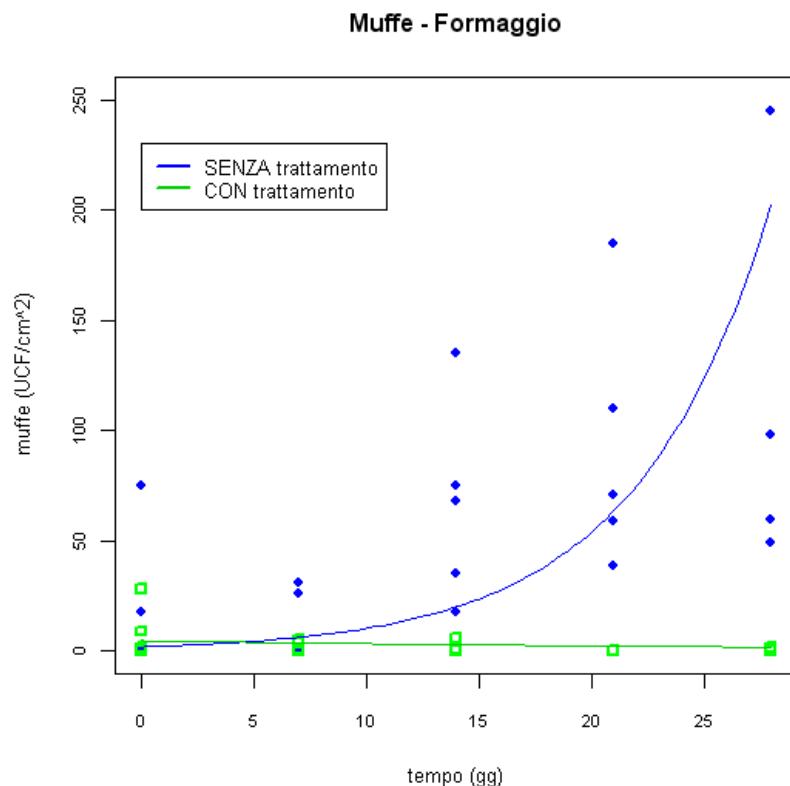
Nei boxplot sottostanti sono riportati dati visti assieme, utilizzando la stessa scala per visualizzare immediatamente il diverso andamento con e senza trattamento.



Le muffe presenti sul formaggio in scala logaritmica.



E' stato utilizzato il modello di analisi della covarianza per valutare la relazione tra il tempo e il numero ( $UCF/cm^2$ ) relativo alle muffe considerando le due situazioni di assenza (punti e linea di tendenza blu) in e presenza (quadrati e linea di tendenza verde) del trattamento con ozono.



Nell'analisi della Varianza sulle muffe presenti nel formaggio (con 1 e 48 gradi di libertà).

(mettendo assieme i dati relativi ai 5 lotti)

Summary (aov ( muffe\_f ~ trattamento ) )

|             | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F)    |
|-------------|----|---------|---------|---------|-----------|
| Trattamento | 1  | 169129  | 169129  | 3.576   | 0.06466 . |
| Residuals   | 48 | 2270181 | 47295   |         |           |

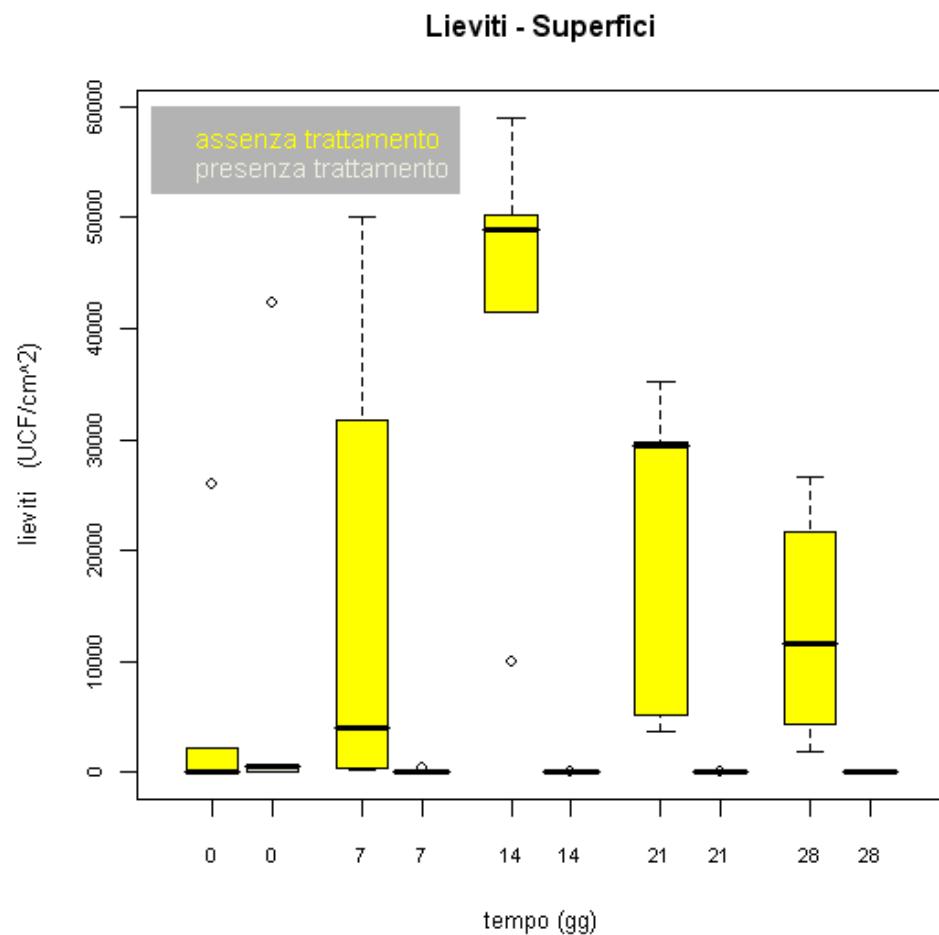
L'ipotesi della diversità delle medie dei valori delle muffe con e senza il trattamento NON può essere accettata ad un livello di significatività pari allo 0,05.

Il problema nasce dalla palese violazione delle ipotesi che sottendono all'applicazione del test (stessa variabilità tra i gruppi di omoschedasticità più precisamente); infatti se valutiamo il test sui dati trasformati mediante logaritmo -per cui si ha una violazione molto minore dell'ipotesi (resta difficile da riscontrare l'altra ipotesi di normalità dei dati) - si verifica che esiste l'effetto dovuto al trattamento ad un livello di significatività pari allo 0,001.

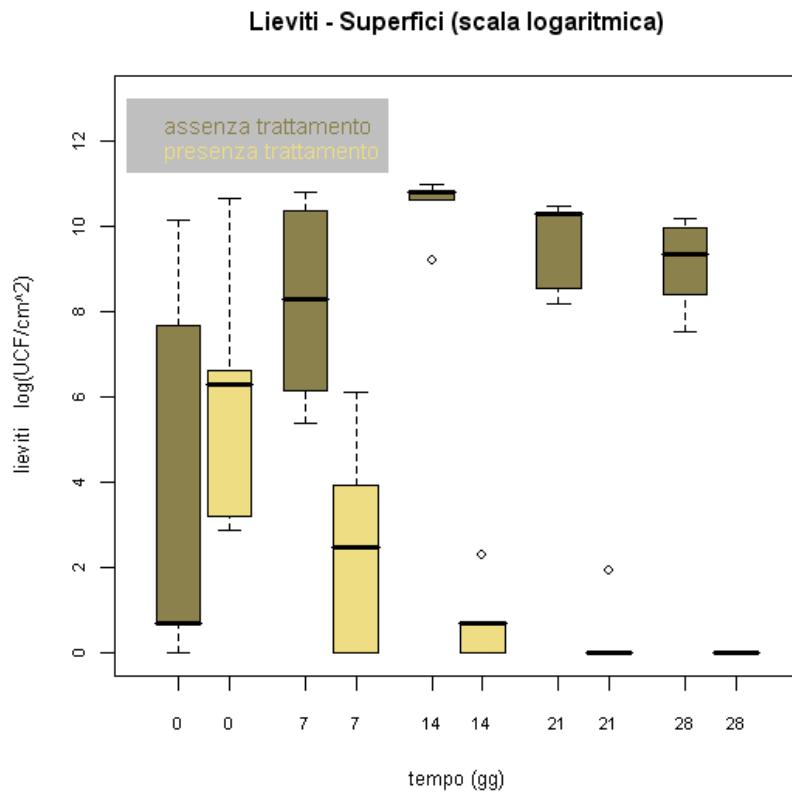
Summary (aov (log.muffe\_f1 ~ trattamento) )

|   | Df | Sum Sq  | Mean Sq | F value | Pr(>F)        |
|---|----|---------|---------|---------|---------------|
| Trattamento   | 1  | 95.211  | 95.211  | 45.452  | 1.830e-08 *** |
| Residuals   | 48 | 100.548 | 2.095   |         |               |
| ---   |    |         |         |         |               |
| Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 |    |         |         |         |               |

Nei boxplot sottostanti sono riportati i dati visti assieme, utilizzando la stessa scala per visualizzare immediatamente il diverso andamento con e senza trattamento.



I lieviti presenti sulle superfici in scala logaritmica.



Viene svolta l'analisi della varianza sui lieviti presenti nelle superfici (con 1 e 48 gradi di libertà).

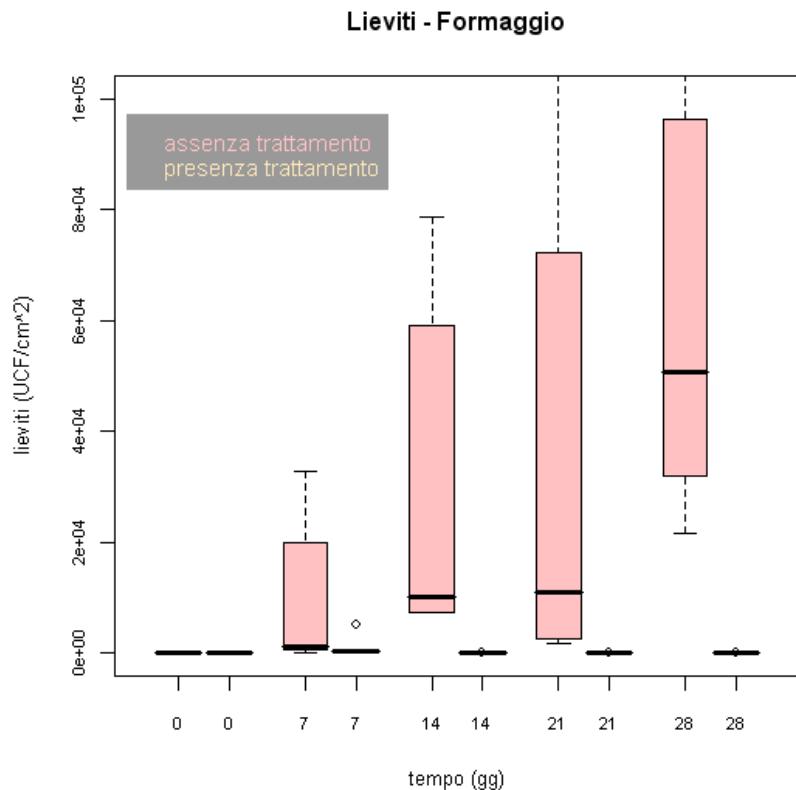
(mettendo assieme i dati relativi ai 5 lotti)

Summary (aov (muffe\_s ~ trattamento) )

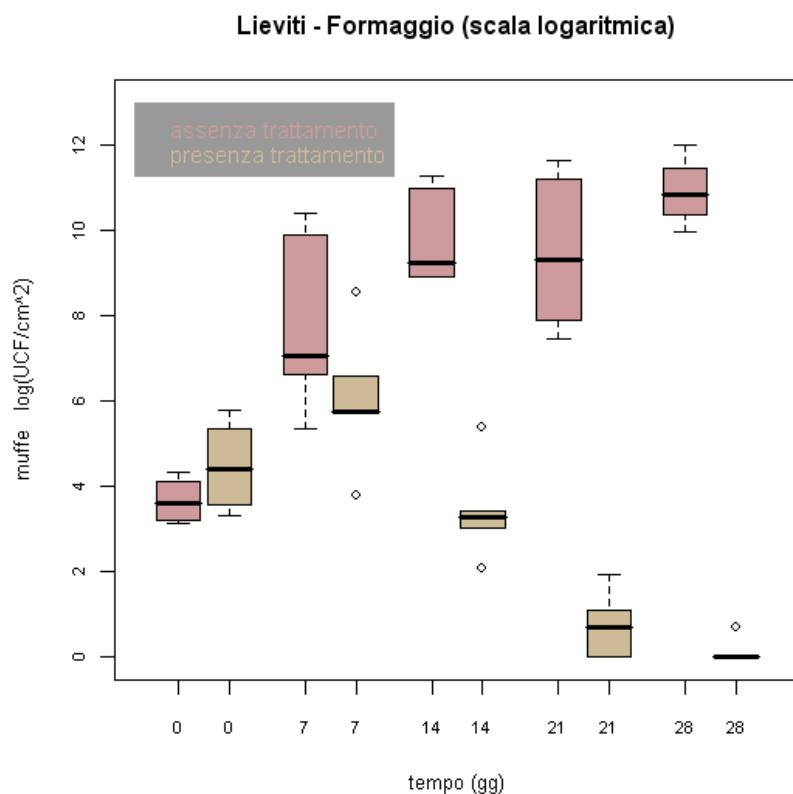
|   | Df | Sum Sq     | Mean Sq    | F value | Pr(>F)        |
|---|----|------------|------------|---------|---------------|
| Trattamento   | 1  | 4.0422e+09 | 4.0422e+09 | 18.046  | 9.853e-05 *** |
| Residuals   | 48 | 1.0752e+10 | 2.2399e+08 |         |               |
| ---   |    |            |            |         |               |
| Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 |    |            |            |         |               |

Il test conferma al livello di significatività dello 0.001 che esiste un effetto dovuto al trattamento per i lieviti.

Nei boxplot sottostanti sono riportati i dati visti assieme, utilizzando la stessa scala per visualizzare immediatamente il diverso andamento con e senza trattamento.



I lieviti presenti sul formaggio in scala logaritmica.



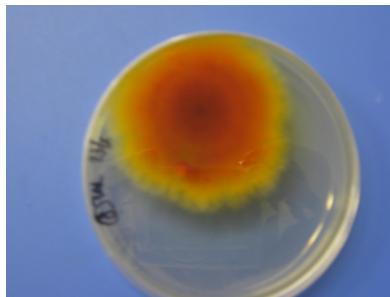
Viene effettuata l'analisi della varianza sui lieviti presenti sul formaggio.

L'ipotesi dell'effetto dovuto al trattamento viene accettata ad un livello di significatività pari allo 0,001.

Summary (aov (lieviti\_f ~ trattamento) )

|   | Df | Sum Sq     | Mean Sq    | F value | Pr(>F)        |
|---|----|------------|------------|---------|---------------|
| Trattamento   | 1  | 1.2022e+10 | 1.2022e+10 | 12.851  | 0.0007871 *** |
| Residuals   | 48 | 4.4902e+10 | 9.3547e+08 |         |               |
| <hr/>   |    |            |            |         |               |
| Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1 |    |            |            |         |               |

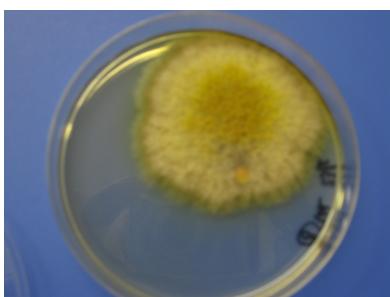
## Foto di alcune muffe ottenute



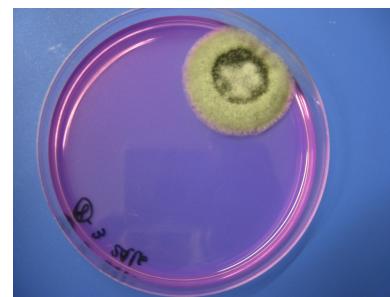
Muffa su terreno OGYE



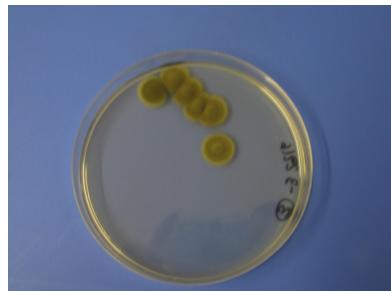
Muffe su terreno DRBCA



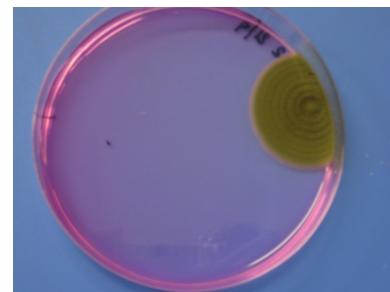
Muffa su terreno OGYE



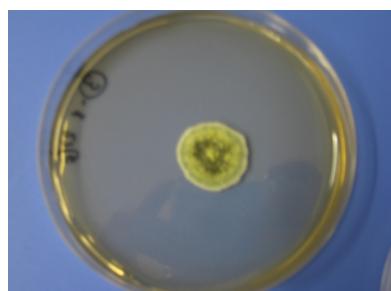
Muffe su terreno DRBCA



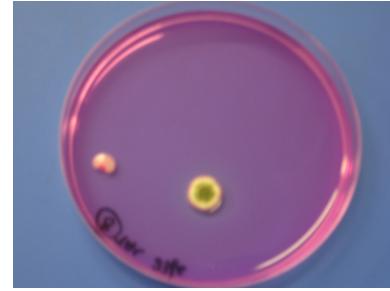
Muffa su terreno OGYE



Muffe su terreno DRBCA



Muffa su terreno OGYE



Muffe su terreno DRBCA

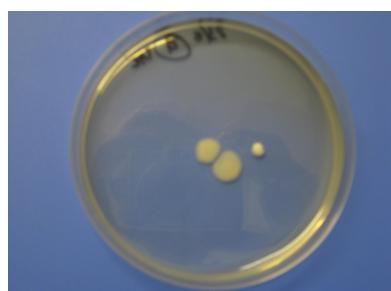
#### 4.2. Foto di alcuni lieviti ottenuti



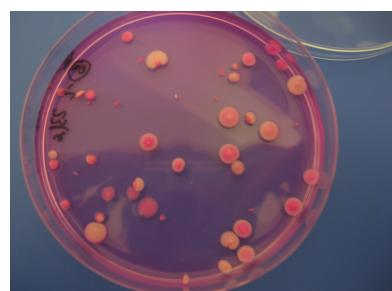
Lieviti su terreno OGYE



Lieviti su terreno DRBCA



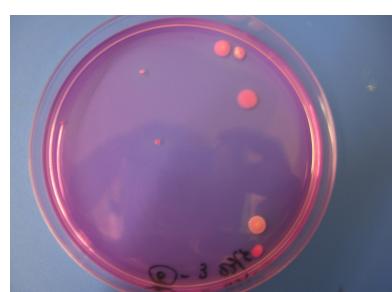
Lieviti su terreno OGYE



Lieviti su terreno DRBCA



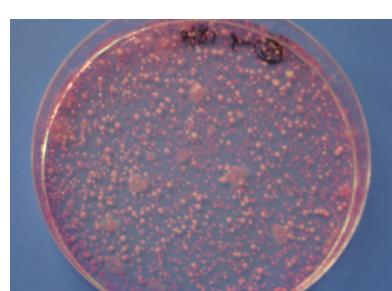
Lieviti su terreno OGYE



Lieviti su terreno DRBCA



Lieviti su terreno OGYE



Lieviti su terreno DRBCA

La finalità del lavoro di tesi consisteva nella sperimentazione di una tecnologia potenzialmente capace di migliorare la self – life di un formaggio a breve stagionatura com’è l’Asiago Pressato. La tecnologia in questione deve essere capace di conservare il prodotto a forma intera per circa 30 giorni contrastando la crescita di muffe e lieviti che si possono sviluppare durante il processo di maturazione.

La sperimentazione è stata condotta in campo, presso un struttura produttiva di dimensioni industriali quale Lattebusche s.c.a.

L’impiego dell’ozono per la conservazione degli alimenti è una pratica in continua diffusione che ha trovato applicazione in diversi settori produttivi.

La diffusione nell’impiego è legata alla mancanza di residui nell’alimento il che esclude pericoli per l’uomo.

L’ozono immesso nell’aria svolge il suo effetto battericida e fungicida ma non rimane alcuna traccia sul prodotto.

Non lasciando alcun residuo chimico, l’ozono è assolutamente ecologico. A riprova di ciò, l’ozono è stato definito come un agente sicuro “GRAS” dall’Ente statunitense Food and Drug Administration (F.D.A.). Nel Luglio 1996 con Protocollo n. 24482, il Ministero della Sanità ha riconosciuto l’ozono come “PRESIDIO NATURALE PER LA STERILIZZAZIONE DI AMBIENTI”

L’applicazione di trattamenti ad ozono a formaggi freschi a pasta pressata come l’Asiago potrebbe rappresentare una strategia innovativa per sostituire parzialmente o completamente i trattamenti superficiali tramite antimicrobici a base chimica nel periodo di stagionatura.

L’ozono infatti ha permesso in maniera efficace alle forme trattate di creare un ambiente sfavorevole allo sviluppo superficiale di muffe e lieviti.

Nei riguardi dei microrganismi e muffe l’ozono agisce con intensità variabile da specie a specie.

Jin-Gab Kim, Ahmed E.Yousef e Sandhya Dave (1999) confermarono che anche a basse concentrazioni e brevi periodi di tempo sono sufficienti per rendere inattivi batteri, muffe, lieviti, parassiti e virus. Comunque i livelli di inattività sono più grandi nei sistemi che contengono sostanze organiche mediamente ossidabili.

La suscettibilità all’azione dei microrganismi trattati con ozono varia a seconda dello stato della cultura, pH medio, temperature, UR e additivi (es. acidi, zuccheri, surfactanti).

Le applicazioni dell'ozono nell'industria alimentare sono per lo più per la decontaminazione della superficie del prodotto e trattamento dell'acqua. L'ozono è stato usato con successi alterni per inattivare la microflora contaminante la carne bovina, pollame, uova, pesce, frutta, verdura e cibi secchi. È anche utilizzato per detossificare ed eliminare micotossine e residui di pesticidi dai prodotti agricoli. L'eccessivo uso dell'ozono può causare ossidazione sulla superficie del cibo, questo comporta la perdita di colore e deterioramento del gusto. [6]

Per quanto riguarda la resistenza e/o la distruzione delle spore del *Bacillus Subtilis* in presenza di ozono liquido, S.B. Young e P. Setlow (2004) stabilirono che l'ozono non distruggeva le spore ma danneggiava il loro DNA e sembra che renda la spora stessa incapace di germinare, dovuto forse al danno causato alla membrana interna della spora. La resistenza all'ozono sembrava fosse dovuto al rivestimento della spora. [8]

Stefano Morandi, Milena Brasca, Roberta Lodi e Giovanna Battelli (2009) valutarono la possibilità di impiego di ozono di *Lysteria monocytogenes* in diversi prodotti caseari ad alto rischio di contaminazione e l'eventuale formazione di composti di ossidazione che possono alterare le caratteristiche sensoriali del prodotto. I test di sensibilità, , dimostrano che applicando una concentrazione di ozono pari a 4 ppm per 8 minuti si ottiene una riduzione del numero di microrganismi sempre superiore al 99%. L'attività battericida nei confronti di *L. monocytogenes* è stata valutata quindi su Ricotta Salata, Gorgonzola DOP e Taleggio DOP. L'inoculo delle porzioni di formaggio è avvenuto a diversi tempi di stagionatura, con 2 diversi livelli di contaminazione. Il numero di *L. monocytogenes* è stato determinato prima e dopo il trattamento con ozono a distanza di 7 giorni.

Su Ricotta Salata l'ozono si è rivelato in grado di ridurre la contaminazione al di sotto di 10 UFC/g anche dopo 7 giorni di conservazione in condizioni refrigerate. Per il Taleggio DOP e Gorgonzola DOP l'efficacia del trattamento è risultata soddisfacente a 6 e 3 giorni di stagionatura, mentre in tempi successivi si evidenzia una minore riduzione del numero di listerie. Si è inoltre verificato l'effetto del trattamento sulle caratteristiche sensoriali del formaggio, ovvero se il flavor del formaggio risulti modificato per un diverso biochimismo durante la maturazione o per la presenza di prodotti di ossidazione. Questi ultimi non sono stati rilevati nel

sottocrosta, ma si è riscontrata una ridotta presenza di composti derivati dalla lipolisi. [23]

Anche Ginny Moore, Chris Griffith e Adrian Peters (2000) hanno testato l'efficacia dell'ozono in laboratorio, inoculando differenti microorganismi, importanti per l'industria alimentare su piastre e incubate a temperature e UR diverse fino a quattro ore. La sopravvivenza microbica è stata comparata con piastre identiche esposte però all'ozono con concentrazione di 2 ppm per quattro ore.

Quelle incubate con ozono evidenziavano una riduzione microbica con valori, in base al tipo di microrganismo, di 7,56 a 2,41 log.

In ogni caso per tutti i microrganismi si è riscontrato una perdita di vitalità maggiore in quelli esposti con ozono.

I batteri Gram negativi risultavano essere più sensibili dei Gram positivi e comunque i batteri erano più sensibili dei lieviti.

L'esposizione all'ozono (2 ppm per 4 ore) con temperature molto elevate (UHT) evidenziava nel latte una diminuzione microbiologica con valori di 5,4 a 1,65 log.

I risultati dei test evidenziarono che se applicato in maniera adeguata, l'ozono può essere un efficace disinfettante. [13]

Dalla nostra sperimentazione si riscontra una riduzione quasi totale delle muffe e dei lieviti presenti nelle superfici delle tavole e nel formaggio ad un livello di significatività pari allo 0,001 rafforzando questo valore all'aumentare del tempo di stagionatura.(2007), effettuarono uno studio per controllare la crescita di funghi sul formaggio Grana, sulle superfici degli scaffali e nell'aria, riscontrando dopo 60 giorni una significativa diminuzione della carica fungina ( $0,74 \log_{10}$ ) sulla superficie delle forme, sulle superfici degli scaffali ( $0,91 \log_{10}$ ) e nell'aria ( $0,5 \log_{10}$ ). [15]

## **5.0. CONCLUSIONI**

Affinché l'ozono come composto antimicotico possa dare risultati di un certo significato pratico nel trattamento superficiale dei formaggi, in base alle prove svolte si possono trarre le seguenti conclusioni:

1. è necessaria una elevata concentrazione 20 - 40 g/h di ozono;
2. il periodo del tempo di saturazione della stanza deve essere molto veloce (qualche ora al massimo);
3. il tempo di contatto con le superfici e i prodotti deve perdurare per diverse ore nel nostro caso è durato per 10;
4. il trattamento deve essere giornaliero, continuativo per tutto il ciclo di maturazione del prodotto da stagionare; meglio se anticipato di qualche settimana a cella vuota per bonificare già l'aria interna;
5. la prevenzione è il solo mezzo atto ad eliminare lo sviluppo dei lieviti e delle muffe nel corso della commercializzazione poiché il potere anti - micotico dell'ozono attivato nella cella di stagionatura non permane in ambienti contaminati;
6. è possibile ridurre o eliminare i conservanti immessi sul formaggio nel caso il prodotto a fine trattamento con ozono venga immediatamente porzionato e confezionato sotto vuoto o in atmosfera modificata garantendo così una shelf - life maggiore.

Considerando la crosta del formaggio non perfettamente liscia e regolare bensì formata da micro fessurazioni dopo i 28 giorni oltre ai normali tamponi si sono effettuate delle indagini prelevando la crosta e il sottocrosta per 2 millimetri di spessore, rilevando, solo in due lotti una traccia di alcune colonie < 5 ufc/ml rimaste vitali a causa della scarsa penetrabilità che ha questo impianto da noi utilizzato.



Figura n°17 : forma non trattata con ozono a 30 giorni.



Figura n°18 : forma trattata con ozono a 30 giorni.



Figura n°20 : forma di dsinistra senza trattamento forma di destra con trattamento 30 giorni.

Considerato l'effetto riscontrato in tutte le prove si ha ragione di ritenere valido l'uso dell'ozono come possibile metodo alternativo per il controllo da inquinamento di muffe e lieviti.

Il trattamento con ozono risulta un promettente metodo per aumentare sicurezza e shelf - life in prodotti caseari ad alto rischio di contaminazione o come fase di sanificazione preconfezionamento del prodotto.

## **BIBLIOGRAFIA:**

1. <http://www.lenntech.it>
2. Franco Ottaviani, "Tecniche di laboratorio per la ricerca e l'identificazione di lieviti e muffe negli alimenti e nell'aria confinata".
3. Gianfranco Tieco, "Igiene e tecnologia alimentare", Calderini ed agricole. Abigail A. Salyers, Dixie D. Whitt, "Microbiologia", Zanichelli.
4. [www.lattebusche.it](http://www.lattebusche.it)
5. [www.biolifeit.com](http://www.biolifeit.com)
6. Jin-Gab Kim, Ahmed E. Yousef and Sandhya Dave. Jurnal of food protection, Vol 62, n° 9, 1999, pagg. 1071 - 1087, "Application of Ozono for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Food: A Review" .
7. <http://www.poliambulatorioberdan.it>
8. S.B. Young and P. Setlow. Mechanisms of *Bacillus subtilis* spore resistance to and killing by aqueous ozone Department of Molecular, Microbial and Structural Biology, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT, USA. Journal of Applied Microbiology 2004, 96, pagg. 1133 - 1142.
9. Ainsworth e Sussman, 1965, 1966, 1968; Ainsworth et al., 1973 a, 1973 b.
10. Luiz Carlos do NASCIMENTO, Luiz Carlos de Oliveira LIMA, Roberta Hilsdorf PICOLLI, João Evangelista FIORINI, Stella Maris da Silveira DUARTE, José Maurício Schneedorf Ferreira da SILVA, Nelma de Mello Silva OLIVEIRA, Sandra Maria de Oliveira Morais VEIGA. Ozone and ultrasound: alternative processes in the treatment of fermented coffee. Ciência e tecnologia de alimentos, 28 (2) pagg. 282 - 294.
11. Mohammad B. Habibi Najafi , M.H. Haddad Khodaparast. Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Technology, Mashhad, Iran. Efficacy of ozone to reduce microbial populations in date fruits. Food control 20 (2009) pagg. 27 - 30.
12. C. Zambonelli, E. Papa, P. Romano, G. Suzzi, L.Grazia. Microbiologia dei salumi. Edagricole.

13. Ginny Moore, Chris Griffith e Adrian Peters. Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal Disinfectant. Jurnal of Food Protection, Vol. 63 n.8, 2000, pagg. 1100 - 1106.
14. Benjamas Thonomsus, Vipavee Anupunpisit, Silchai Chanphetch, Thanomrat Watcharachaipong, Raksawan Poonkhum e Chuda Srisukonth. Jurnal Gen. Appl. Microbiol, 48,(2002), pagg. 193 - 199.
15. Andrea Troller Pinto, Verônica Schmidt, Suely Aparecida Raimundo & Fábio Raihmer. Moulds control by ozonation in ripening cheese room. Acta Scientiae Veterinariae. 35(3) 2007, pagg. 333 - 337.
16. [www.bioter.it/prova/approfondimenti.html](http://www.bioter.it/prova/approfondimenti.html)
17. [www.ozonecleaning.eu/Default.aspx?Id=3](http://www.ozonecleaning.eu/Default.aspx?Id=3)
18. Petrella F., Nebbioso G., ASL Napoli 3 SUD, ASL Napoli1. Valutazione dell'efficacia degli ozonodi nel processo di riparazione tissutale di lesioni croniche cutanee dermo - epidermiche ad eziologia venosa. Acta vulnologica, n. 2, 2009.
19. <http://wpage.unina.it/villani/eMA2.html>
20. <http://www.unibas.it>
21. Fieschi A., Pannacciulli I., Boccaccio P. (1994). Terapia chemioantibiotica: aspetti generali di alcuni tipi di trattamento, in terapia medica, Piccin,Padova, 89-90.
22. Pirani S., Bersani C., Cantoni C., Dipartimento di Scienze e Tecnologie Veterinarie per la Sicurezza Alimentare, Università di Milano.
23. Stefano Morandi, Milena Brasca, Roberta Lodi e Giovanna Battelli. Impiego di Ozono per il controllo di *Listeria monocytogenes* in diverse tipologie di formaggio. Scienza e tecnica lattiero - casearia, 60 (2) 2009.
24. Carlo Cantoni e Silvia Pirani, impiego dell'ozono per la sicurezza e qualità degli alimenti. Rassegna e dati sperimentali. Qualità e sicurezza Agroalimentare, Aprile 2008
25. Agenzia per la Protezione Ambientale (EPA)
26. [www.eunionline.com](http://www.eunionline.com)

27. Kaess, G., and J.F. Weidemann. 1968. Ozone treatment of chilled beef. I. effect of low concentrations of ozone on microbial spoilage and surface color of beef. *J. Food Technol.* 3:325 – 334.
28. Kaess, G., and J.F. Weidemann. 1973. Effects of ultraviolet irradiation on the growth of microorganisms on chilled beef slices. *J. Food Technol.* 8:59 – 69.
29. Rusch, A., and Kraemer. 1989. Influence of instruments for elimination of microorganisms on surface bacterial contamination of fresh meat and on airborne microorganisms in cold stores with increased RH. *Arch. Lebensmittelhyg.* 40 : 61 - 65.
30. Dondo, A., C. Nachtman, L. Doglione, A. Rosso, and A. Genetti. 1992. Foods: their preservation by combined use of refrigeration and ozone. *Ing. Aliment. Conserve Anim.* 8 : 16 – 25.
31. Whistler, P. E., and B. W. Sheldon. 1989. Bactericidal activity, egg – shell conductance, and hatchability effects of ozone versus formaldehyde disinfection. *Poult. Sci.* 68: 1074 – 1077.
32. Rudavskaya, A. B., and E. V. Tishchenko. 1978. Effect of ozonation on the quality and keeping characteristics of retail eggs. *Tovarovedenie* 11: 43 – 46.
33. Haraguchi, T., U. Simidu, and K. Aiso. 1969. Preserving effect of ozone on fish. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 35: 915 – 919.
34. Naitoh, S. 1992. Studies on the application of ozone in food preservation: effects of metalloozolites and ascorbic acid on the inactivation of *Bacillus subtilis* spores with gaseous ozone. *J. Antibact Antifung. Agents* 20: 629 – 632.
35. Zagon, J., L. I. Dehne, J. Wirz, B. Linke, and K. W. Boegl. 1992. Ozone treatment for removal of microorganism from spices as an alternative to ethylene oxide fumigation or irradiation? Results of a practical study. *Bundesgesundheitsblatt.* 35: 20 – 23.
36. Faitel'berg – Blank, V. R., E. V. Bykove, A. V. Orlava, L. G. Ostapenko, and V. A. Stepanenko. 1979. Improvement of keeping quality of potatoes and onions by means of ionized air. *Vestn. S'kh. Nauki* : 110 – 112.
37. Kim, M. J., Y. A. Oh, M. H. Kim, M. K. Kim, and S. D. Kim. 1993. Fermentation of Chinese cabbage kimchi inoculated with *Lactobacillus acidophilus* and containing ozone – treated ingredients. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 22: 165 – 174.