

**DERIVATI DEL POMODORO.  
ASPETTI MICROBIOLOGICI**

**REPORT N. 5**



## SOMMARIO

---

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>06</b>
ARGOMENTI GENERALI	
Note sulla microbiologia delle conserve alimentari acide e dei derivati del pomodoro in particolare	<b>08</b>
Indagine sulle cause di alterazione microbiologica di conserve alimentari negli anni 1991-2001	<b>13</b>
Nota tecnica – Stabilizzazione termica di derivati non concentrati del pomodoro	<b>22</b>
BATTERI LATTICI E LIEVITI	
Sviluppo di metaboliti e alterazioni chimiche causate da alcuni tipi di microrganismi in derivati vegetali. Nota 1- Passato di pomodoro	<b>25</b>
Attività gasogena di batteri lattici omofermentanti in derivati del pomodoro	<b>32</b>
ENTEROBATTERI	
Capacità di sviluppo di enterobatteri in derivati del pomodoro a diversa concentrazione	<b>39</b>
Caratterizzazione di alterazioni microbiologiche in derivati del pomodoro (II): enterobatteri	<b>45</b>
<i>BACILLUS</i>	
Individuazione di alcuni parametri inibenti la crescita di <i>Bacillus</i> in passata e in concentrato di pomodoro	<b>53</b>
Livelli d'inquinamento del pomodoro da spore di <i>Bacillus coagulans</i>	<b>57</b>
Capacità di sviluppo in derivati del pomodoro a diversa concentrazione di un ceppo di <i>Bacillus coagulans</i> isolato da un caso di flat sour. Nota 1 - Passato di pomodoro	<b>60</b>
Capacità di sviluppo in derivati del pomodoro a diversa concentrazione di un ceppo di <i>Bacillus coagulans</i> isolato da un caso di flat sour Nota 2 - Pomodoro concentrato a residuo ottico 12, 18, 28%	<b>65</b>



---

---

*BACILLUS*

Caratterizzazione di alterazioni microbiologiche  
in derivati del pomodoro (III): flat-sour **71**

Termoresistenza di *Bacillus coagulans* in passato di pomodoro **85**

Termoresistenza e capacità di accrescimento successiva a  
trattamenti termici di *Bacillus coagulans* in passato di pomodoro **89**

*CLOSTRIDIUM*

Livelli d'inquinamento del pomodoro da spore di clostridi butirrici **95**

Termoresistenza di clostridi butirrici in funzione del pH **98**

Caratterizzazione di clostridi butirrici responsabili dell'alterazione  
di prodotti acidi **102**

Termoresistenza di clostridi butirrici responsabili dell'alterazione  
di prodotti acidi **113**

Livelli d'inquinamento del pomodoro da spore di clostridi termofili **119**

Caratterizzazione di alterazioni microbiologiche in derivati del  
pomodoro: batteri termofili anaerobi gasogeni (I) **122**

Clostridi termofili: caratterizzazione e termoresistenza  
in succo di pomodoro **133**

*ALICYCLOBACILLUS*

Caratterizzazione e studio di aliciclobacilli isolati  
da derivati del pomodoro **143**

Valutazioni sul comportamento di *Alicyclobacillus* sp.  
in prodotti acidi **155**

Ricerca di marker di alterazione di *Alicyclobacillus* specie **159**

Applicazione del metodo rapido PCR Real-Time per la ricerca  
di *Alicyclobacillus acidocaldarius* e *acidoterrestris* in derivati del  
pomodoro non concentrati e bevande di frutta acide **174**

Caratterizzazione mediante metodi molecolari di *Alicyclobacillus*  
spp. da pomodoro **182**

I processi industriali di sterilizzazione termica delle conserve alimentari hanno come scopo la stabilizzazione microbiologica ed enzimatica dei prodotti, al fine di permettere la conservazione a temperatura ambiente e, quindi, il consumo differito.

La stabilità microbiologica delle conserve alimentari è condizionata dall'efficacia dei trattamenti termici applicati, dall'ermeticità dei contenitori e dalle temperature di conservazione. L'alterazione di una conserva alimentare, quindi, è conseguenza di un trattamento termico inefficace, di un'insufficiente ermeticità dei contenitori o di un raffreddamento delle confezioni non idoneo e/o loro magazzinaggio a temperature elevate.

Nel primo caso, una frazione della popolazione microbica sopravviverà e si svilupperà nel prodotto; nel secondo caso, microrganismi presenti nell'ambiente esterno (acqua di raffreddamento, aria, superfici, ecc.) penetreranno nei contenitori e inquineranno l'alimento. Il permanere delle confezioni a temperature elevate può causare l'accrescimento dei batteri termofili sopravvissuti al trattamento termico.

La stabilizzazione microbiologica di un prodotto sterilizzato deve essere valutata in termini di probabilità di sopravvivenza dei microrganismi presenti prima del trattamento termico. Non è possibile, infatti, ottenere la sterilità assoluta di una popolazione microbica attraverso trattamenti termici poiché l'inattivazione con il calore dei microrganismi segue una legge esponenziale.

Per questi motivi è stato introdotto il concetto di "sterilità commerciale" che è ottenuta quando la probabilità di sopravvivenza dei microrganismi capaci di accrescersi nel prodotto considerato e, quindi, la possibilità di alterazione della conserva alimentare viene ridotta a livelli considerati accettabili.

L'individuazione dei parametri di un trattamento termico idoneo alla stabilizzazione microbiologica di un prodotto prevede almeno due tipi di valutazione:

- a. stabilire quali microrganismi sono generalmente presenti nelle materie prime che entrano nella formulazione del prodotto e quali tra di essi possono accrescersi nell'alimento così da richiederne l'inattivazione mediante trattamento termico. La possibilità di accrescimento dei microrganismi in un prodotto alimentare è condizionata dalle caratteristiche chimiche e fisiche del mezzo. In particolare, è necessario conoscere i valori di pH e di  $A_w$ , la presenza e concentrazione di sostanze inibitrici o battericide, la temperatura di magazzinaggio e di commercializzazione. Le condizioni limite di accrescimento dei microrganismi di interesse sono in parte reperibili nella letteratura scientifica o diversamente devono essere determinate nelle singole tipologie di prodotto.
- b. stabilire quali microrganismi sono determinanti per giudicare l'efficacia del trattamento di sterilizzazione. Per questa scelta vengono considerate la patogenicità, la termoresistenza e la massima concentrazione riscontrata nelle materie prime. La termoresistenza microbica indica la capacità di sopravvivenza dei mi-

croorganismi all'azione del calore. Per ciascun microrganismo, in un dato ambiente, la termoresistenza può essere definita da due parametri:

- $D_T$  = (tempo di riduzione decimale) tempo necessario a inattivare, alla temperatura costante T, il 90% delle cellule o spore microbiche inizialmente esistenti;
- z = intervallo di variazione della temperatura di mantenimento T, per il quale il valore  $D_T$  aumenta o diminuisce di 10 volte.

Si parlerà pertanto di effetto sterilizzante sufficiente a garantire per il prodotto considerato il conseguimento della sterilità commerciale e/o della sicurezza sanitaria; esso può essere calcolato utilizzando la seguente formula:

$$= D_T \times (\text{Log } N_0 - \text{Log } N_f) = D_T \times n$$

con

$N_0$  = concentrazione microbica iniziale determinata o presunta;

$N_f$  = probabilità di sopravvivenza considerata accettabile;

n = numero di riduzioni decimali conseguenti.

I prodotti alimentari conservati sono generalmente suddivisi in due tipologie in base al pH: acidi con  $\text{pH} \leq 4,60$  e non acidi con  $\text{pH} > 4,60$  in relazione alla diversa capacità di sviluppo e alla differente termoresistenza dei microrganismi in funzione di questo parametro.

Ai due gruppi così differenziati vengono impartiti trattamenti termici di diversa entità.

Per le **conserve alimentari aventi  $\text{pH} \leq 4,60$**  il trattamento termico viene effettuato a temperature, in genere, non superiori a 100°C; esso ha lo scopo d'inattivare le spore (oltre che le cellule) dei microrganismi di alterazione, capaci, cioè, di svilupparsi ai bassi valori di pH ma non le spore dei microrganismi non in grado di germinare in tali ambienti acidi. Alle **conserve alimentari con  $\text{pH} > 4,60$**  viene applicato il trattamento termico di sterilizzazione, più drastico, che ha lo scopo d'inattivare tutte le spore presenti nel prodotto in quanto potenzialmente in grado di svilupparsi in esso poiché il valore di pH non ha funzione inibitoria della germinazione sporale; tutte le cellule vegetative, naturalmente, saranno inattivate data la loro minore resistenza termica.

L'impiego di diversi trattamenti termici è dovuto fondamentalmente alla diversa possibilità di sviluppo, in funzione del valore di pH, del batterio patogeno *Clostridium botulinum*, microrganismo di enorme rilevanza sanitaria in quanto responsabile di intossicazioni letali dovute all'ingestione di neurotossine prodotte in seguito allo sviluppo del batterio nell'alimento.

Dati scientifici attestano che lo sviluppo (germinazione) di spore di *C. botulinum* non si verifica a pH pari o inferiore a 4,60; peraltro, le cellule vegetative di *C. botulinum*, così come le cellule di tutti gli altri microrganismi presenti negli alimenti, sono completamente inattivate da trattamenti termici di intensità non particolarmente elevata.

L'effetto sterilizzante (o effetto letale) è funzione, quindi, del valore di pH della conserva alimentare; esso è calcolato

alla temperatura di riferimento di:

- 121°C (F<sub>121</sub>) per le conserve alimentari con pH > 4,60;
- 100°C (F<sub>100</sub>) per le conserve alimentari con 4,20 ≤ pH ≤ 4,60;
- 85°C (F<sub>85</sub>) per le conserve alimentari aventi pH < 4,20.

Nei derivati del pomodoro possono svilupparsi quasi esclusivamente microrganismi poco resistenti al calore (lieviti, batteri lattici, muffe, enterobatteri) fatta eccezione, nei prodotti non concentrati, per alcune specie di sporigeni quali clostridi butirrici (*C. pasteurianum*, *C. butyricum*, *C. acetobutylicum*, ecc.), *Bacillus coagulans* e, più raramente, *B. macerans*, *B. polymixa*, *Alicyclobacillus* spp. e *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*.

La stabilizzazione microbiologica dei derivati del pomodoro non concentrati può essere ottenuta soltanto inattivando e/o inibendo le spore di tali batteri.

I microrganismi responsabili di alterazione per reinquinamento dei derivati del pomodoro appartengono ai gruppi dei batteri lattici, enterobatteri, lieviti, muffe; in casi piuttosto rari, le conserve di pomodoro possono essere reinquinata anche da batteri sporigeni quali clostridi butirrici, *Bacillus coagulans* e altre specie del genere *Bacillus*. I batteri termofili causano alterazione quando le temperature di fine raffreddamento e/o magazzinaggio sono sufficientemente elevate da permetterne lo sviluppo; nei derivati non concentrati del pomodoro è relativamente frequente l'alterazione da *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* e, in anomale condizioni di aerobiosi, *Alicyclobacillus* spp.

Tutti i microrganismi capaci di svilupparsi in tali prodotti conservati sono anche responsabili di degradazione più o meno evidente delle materie prime, con perdita/diminuzione delle loro peculiari caratteristiche qualitative, durante gli stadi di lavorazione precedenti il confezionamento e il trattamento termico. Batteri non sporigeni come i batteri lattici sono presenti sulle linee di lavorazione in modo massivo; i lieviti sono presenti in misura di poco inferiore. Minori concentrazioni cellulari riguardano, muffe, enterobatteri e *B. coagulans*.

Un caso particolare di insufficiente trattamento termico si verifica in caso di scarsa igiene di riempitrici e/o tappatrici di contenitori in vetro; spore batteriche (in genere, *Bacillus*) possono inquinare la superficie libera dei prodotti all'atto del riempimento e alterarli. Qualora siano presenti condizioni di anaerobiosi a temperatura ambiente (ad es. *tank* in linea di mantenimento temporaneo dei prodotti), è possibile lo sviluppo di clostridi butirrici mentre a temperature prossime a 50°C si sviluppa *T. thermosaccharolyticum*. In condizioni di aerobiosi, se le temperature sono superiori ai 30-37°C può verificarsi accrescimento di aliciclobacilli assimilabili alla specie *Alicyclobacillus acidocaldarius*, non produttori di guaiacolo ma in grado di sviluppare odori anomali. Si tratta di un microrganismo sporigeno, aerobio, termofilo facoltativo (cresce in un intervallo di temperatura compreso tra 30-37°C e 70°C), acidofilo.

La preservazione della qualità iniziale delle materie prime e la prevenzione delle alterazioni presuppongono quindi, la conoscenza delle caratteristiche dei microrganismi responsabili dell'alterazione e del depauperamento qualitativo: in particolare, la presenza e la concentrazione cellulare

e/o sporale, le caratteristiche fisiologiche e metaboliche, la resistenza al calore, la capacità di sviluppo in presenza di diverse caratteristiche chimiche e fisiche dei prodotti, di trattamenti termici non letali o in condizioni di produzione non controllate.

Il presente "Quaderno tecnico" raccoglie numerosi lavori sperimentali realizzati al fine di chiarire e spiegare l'insieme degli aspetti sopra considerati; essi hanno avuto origine dallo studio di cause di alterazione di conserve di derivati del pomodoro e rappresentano un contributo fondamentale ai fini della qualità e sicurezza della produzione industriale.

Per una agevole consultazione i diversi articoli sono stati suddivisi in sei capitoli:

1. ARGOMENTI GENERALI in cui vengono affrontate le problematiche di natura microbiologica dei diversi derivati del pomodoro e vengono fornite indicazioni circa i trattamenti termici idonei alla stabilizzazione dei derivati non concentrati.
2. BATTERI LATTICI E LIEVITI microrganismi più frequentemente ritrovati come causa d'alterazione dei derivati del pomodoro: sono stati studiati i metaboliti prodotti in seguito al loro sviluppo.
3. ENTEROBATTERI dove viene valutata la capacità di crescita di diversi ceppi di enterobatteri (coliformi) in derivati del pomodoro in funzione del residuo ottico, del pH e della concentrazione microbica e dove vengono caratterizzati ceppi isolati da prodotti alterati.
4. *BACILLUS* in cui viene studiato *Bacillus coagulans*: livelli di inquinamento del prodotto, caratterizzazione del microrganismo, capacità di crescita in funzione del residuo ottico, del pH e della concentrazione sporale, termoresistenza.
5. *CLOSTRIDIUM* in cui vengono studiati i clostridi butirrici e i clostridi termofili: livelli di inquinamento del prodotto, caratterizzazione dei microrganismi, capacità di crescita in funzione del residuo ottico, del pH e della concentrazione sporale, termoresistenza.
6. *ALICYCLOBACILLUS* dove vengono studiati e caratterizzati ceppi di aliciclobacilli isolati da derivati del pomodoro.